

Untersuchung verschiedener Einflussfaktoren auf die Generierung  
und Leistungsanalyse von monoklonalen Antikörpern sowie die  
Übertragbarkeit von Ergebnissen erstellt durch monoklonale  
Antikörper in der Immunhistochemie

Dissertation

Zur Erlangung der Würde des Doktorgrades der Fakultät für  
Mathematik, Informatik und Naturwissenschaften im Fachbereich  
Biologie der Universität Hamburg

Vorgelegt von  
Lisa Hornsteiner  
aus Darmstadt

Hamburg 2025

Vorsitzender der Prüfungskommission:

Herr Prof. Dr. Tobias Lenz

1. Gutachter:

Herr Prof. Dr. Markus Glatzel

2. Gutachter:

Herr Prof. Dr. Ronald Simon

Tag der Disputation: 07.11.2025

# Inhaltsverzeichnis

|                                                                         |           |
|-------------------------------------------------------------------------|-----------|
| <b>1. Einleitung</b>                                                    | <b>7</b>  |
| 1.1 Bedeutung des Proteinnachweises in der pathologischen Diagnostik    | 7         |
| 1.2 Antikörper                                                          | 8         |
| 1.2.1 Das Immunsystem und Antikörper-Reifung                            | 8         |
| 1.2.2 Antikörper, Antigene und Epitope                                  | 11        |
| 1.2.3 Antikörper Herstellung im Labor                                   | 14        |
| 1.2.4 Stabilität von Antikörpern                                        | 16        |
| 1.3 Immunhistochemie                                                    | 18        |
| 1.3.1 Prinzip                                                           | 18        |
| 1.3.2 Formalin-Fixierung                                                | 20        |
| 1.3.3 Antigen-Demaskierung                                              | 21        |
| 1.3.4 Erstellung von Gewebe-Mikroarrays                                 | 22        |
| 1.4 Qualitätsparameter der Immunfärbung                                 | 22        |
| 1.4.1 Qualität des Antikörpers (Stabilität, Einflussfaktoren, Vorgehen) | 22        |
| 1.4.2 Qualität des Färbeprotokolls                                      | 23        |
| 1.4.3 Qualität des Gewebes                                              | 25        |
| 1.5 Validierung von Antikörpern                                         | 26        |
| 1.5.1 Antikörper als Medizinprodukte                                    | 26        |
| 1.5.2 Verfahren zur Validierung von Antikörpern                         | 26        |
| 1.6 Ziel der Arbeit                                                     | 27        |
| <b>2. Material und Methoden</b>                                         | <b>28</b> |
| 2.1 Material                                                            | 28        |
| 2.1.1 Zellkultur Medien und Reagenzien                                  | 28        |
| 2.1.2 Zusammensetzung der Reagenzien                                    | 29        |
| 2.1.3 Reagenzien                                                        | 30        |
| 2.1.4 Zelllinien                                                        | 32        |
| 2.1.5 Antikörper                                                        | 35        |
| 2.1.6 Kits                                                              | 38        |
| 2.1.7 Verbrauchsmaterial                                                | 39        |
| 2.1.8 Geräte                                                            | 40        |
| 2.1.9 Software                                                          | 40        |
| 2.2 Methoden                                                            | 41        |
| 2.2.1 Immunisierung Mäuse                                               | 41        |
| 2.2.2 Fusionierung                                                      | 42        |
| 2.2.3 ELISA-Testung zur Antikörperproduktion                            | 42        |
| 2.2.4 IHC-Testung zur Antikörperproduktion                              | 43        |
| 2.2.5 Subklonierung                                                     | 45        |
| 2.2.6 B-Zell Panning                                                    | 46        |
| 2.2.7 Semi-solid Methode                                                | 46        |
| 2.2.8 IHC-Färbung der Zellen aus dem Panning                            | 47        |
| 2.2.9 Auswertung IHC-Scans                                              | 48        |
| 2.2.10 Zellkultur                                                       | 49        |
| 2.2.11 Wegfrieren und Auftauen von Zellen                               | 50        |
| 2.2.12 Generierung von Zelllinien-Blöcken                               | 50        |
| 2.2.13 Erstellung des Gewebe – oder Zelllinien-Mikroarrays              | 51        |

|           |                                                                                                                |            |
|-----------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------|
| 2.2.14    | Färbung von IHC-Schnitten .....                                                                                | 52         |
| 2.2.15    | Stabilitätstestung von Antikörpern.....                                                                        | 53         |
| 2.2.16    | Erstellung von Lysaten für Western Blot .....                                                                  | 55         |
| 2.2.17    | Proteinkonzentrationsbestimmung .....                                                                          | 57         |
| 2.2.18    | Western Blot .....                                                                                             | 58         |
| 2.2.19    | RNA Extraktion und cDNA Erstellung.....                                                                        | 60         |
| 2.2.20    | Realtime -PCR (RT-PCR).....                                                                                    | 62         |
| <b>3.</b> | <b>Ergebnisse.....</b>                                                                                         | <b>63</b>  |
| 3.1       | Antikörper-Herstellung .....                                                                                   | 63         |
| 3.1.1     | Einfluss der Peptid Auswahl .....                                                                              | 63         |
| 3.1.1.1   | Einfluss der Lokalisation und Komposition der verwendeten Peptide in der Proteinsequenz<br>64                  |            |
| 3.1.1.2   | Einfluss des ELISA-Wertes auf die Stärke der Immunfärbung und dem weiteren Verlauf der<br>Hybridomaklone ..... | 71         |
| 3.1.2     | Einfluss des Fusionsverfahrens .....                                                                           | 77         |
| 3.1.2.1   | Effizienzbewertung B-Zell Panning .....                                                                        | 77         |
| 3.1.2.2   | Immunhistologische Analyse von gepannten Zellen .....                                                          | 78         |
| 3.1.3     | Einfluss Klonierungsverfahren .....                                                                            | 84         |
| 3.2       | Einfluss der Puffer-Zusammensetzung auf die immunhistologische Färbung.....                                    | 86         |
| 3.2.1     | Einfluss des Puffersalzes (PBS/TBS) bzw. pH .....                                                              | 86         |
| 3.2.2     | Einfluss von Trägerprotein.....                                                                                | 88         |
| 3.2.2.1   | Einfluss von BSA .....                                                                                         | 88         |
| 3.2.2.2   | Einfluss von Ziegenserum .....                                                                                 | 89         |
| 3.2.2.3   | Einfluss von FCS.....                                                                                          | 90         |
| 3.2.2.4   | Einfluss weitere Antikörper .....                                                                              | 92         |
| 3.2.3     | Einfluss von anderen Chemikalien .....                                                                         | 93         |
| 3.2.3.1   | Einfluss von Caprylsäure .....                                                                                 | 93         |
| 3.2.3.2   | Einfluss Trehalose .....                                                                                       | 94         |
| 3.2.4     | Einfluss weiterer Puffer.....                                                                                  | 95         |
| 3.3       | Einfluss der Pufferart auf Antikörper-Haltbarkeit.....                                                         | 96         |
| 3.4       | Haltbarkeit von Antikörpern .....                                                                              | 100        |
| 3.5       | Antikörper-Validierung 1: Western Blot .....                                                                   | 107        |
| 3.5.1     | Gewebelysate.....                                                                                              | 107        |
| 3.5.1.1   | Antikörper die eine Bande in erwarteter Größe zeigten .....                                                    | 108        |
| 3.5.1.2   | Antikörper die neben der richtigen Bande zusätzliche Banden zeigten .....                                      | 110        |
| 3.5.2     | Humane Zelllinien .....                                                                                        | 114        |
| 3.5.2.1   | Antikörper die eine Bande in erwarteter Größe zeigten .....                                                    | 115        |
| 3.5.2.2   | Antikörper die neben der richtigen Bande immer noch zusätzliche Banden zeigten .....                           | 116        |
| 3.5.3     | Nebenbanden durch bekannte Protein-Isoformen .....                                                             | 120        |
| 3.5.4     | Vergleich Gewebelysate mit Zelllinien-Lysaten .....                                                            | 122        |
| 3.6       | Antikörper-Validierung 2: Kreuzreaktivität.....                                                                | 125        |
| 3.6.1     | PRSS2 vs. Andere PRSS-Proteine.....                                                                            | 125        |
| 3.6.2     | Kreuzreaktivität in verschiedenen Spezies .....                                                                | 134        |
| 3.7       | Antikörper-Validierung 3: Vergleich mit mRNA-Expression in Zelllinien.....                                     | 136        |
| <b>4.</b> | <b>Diskussion.....</b>                                                                                         | <b>140</b> |
| 4.1       | Antikörper-Herstellung .....                                                                                   | 140        |
| 4.1.1     | Peptid Auswahl für die Antikörper-Herstellung.....                                                             | 140        |

|            |                                                                                  |            |
|------------|----------------------------------------------------------------------------------|------------|
| 4.1.2      | Einfluss des Fusionsverfahrens .....                                             | 146        |
| 4.2        | Einfluss der Puffer-Zusammensetzung auf die immunhistologische Färbung.....      | 150        |
| 4.3        | Einfluss der Pufferart auf die Antikörper-Haltbarkeit.....                       | 152        |
| 4.4        | Haltbarkeit von Antikörpern .....                                                | 154        |
| 4.5        | Antikörper-Validierung 1: Western Blot .....                                     | 156        |
| 4.6        | Antikörper-Validierung 2: Kreuzreaktivität.....                                  | 160        |
| 4.7        | Antikörper-Validierung 3: Vergleich mit mRNA-Expression in Zelllinien .....      | 162        |
| <b>5.</b>  | <b>Zusammenfassung.....</b>                                                      | <b>165</b> |
| <b>6.</b>  | <b>Literaturverzeichnis.....</b>                                                 | <b>167</b> |
| <b>7.</b>  | <b>Abbildungsverzeichnis .....</b>                                               | <b>181</b> |
| <b>8.</b>  | <b>Tabellenverzeichnis .....</b>                                                 | <b>185</b> |
| <b>9.</b>  | <b>Abkürzungsverzeichnis .....</b>                                               | <b>187</b> |
| <b>10.</b> | <b>Eidesstattliche Versicherung: .....</b>                                       | <b>188</b> |
| <b>11.</b> | <b>Danksagung.....</b>                                                           | <b>189</b> |
| <b>12.</b> | <b>Anhang .....</b>                                                              | <b>190</b> |
| 12.1       | Chemische Analyse zweier kommerzieller Verdünnungspuffer .....                   | 190        |
| 12.1.1     | Puffer 1 (IHC Select Antibody Diluent Solution, prediluted, Sigma Aldrich) ..... | 190        |
| 12.1.2     | Puffer 2 (Antikörper-Diluent grün, Carl Roth) .....                              | 191        |
| 12.2       | Beispielhaftes Layout von Zelllinien- und Gewebe-Mikroarrays.....                | 192        |
| 12.2.1     | Beispielhaftes Layout eines Zelllinien-Mikroarrays.....                          | 192        |
| 12.2.2     | Beispielhaftes Layout eines Gewebe-Mikroarrays.....                              | 196        |
| 12.3       | Unterlagen zum Tierversuch zur Erstellung monoklonaler Antikörper in Mäusen..... | 200        |
| 12.3.1     | Tierversuchsantrag.....                                                          | 200        |
| 12.3.2     | Genehmigung des Tierversuchsantrags .....                                        | 201        |
| 12.3.3     | Score Sheet des Tierversuchs.....                                                | 202        |

# 1. Einleitung

## 1.1 Bedeutung des Proteinnachweises in der pathologischen Diagnostik

Die Krankheits-abwehrenden Eigenschaften von Antikörper wurde 1749 von Edward Jenner bei der Immunisierung von Menschen gegen Kuhpocken beschrieben und stellte einen Meilenstein in der Medizingeschichte dar (Riedel, 2005). Diese Beobachtung, gemeinsam mit den darauffolgenden Forschungserkenntnissen, führte zu einem tiefergehenden Verständnis über das menschliche Immunsystem und der Rolle von Antikörpern. Erst später wurde von Paul Ehrlich erkannt, dass Antikörper Peptid-spezifisch Proteine erkennen können (Ehrlich, 1900). Dies eröffnete neue Möglichkeiten und Methoden zur spezifischen Detektion von Proteinen in organischem Material und somit die Grundlage der Immunhistochemie.

Auch heute noch wird diese Eigenschaft von Antikörpern in der Forschung, Diagnostik, Prognose und Therapie zur Adressierung und Detektion von Zielproteinen auch außerhalb des Körpers genutzt (Coons et al., 1951; Ehrlich, 1910). Durch die Immunhistochemie kann zuverlässig die Abwesenheit oder Überexpression von Proteinen detektiert werden, welche gemeinsam mit anderen etablierten Methoden, wie der Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH), eines der Grundpfeiler der Diagnostik darstellt. Antikörper-basierte Methoden, wie Western Blot oder Enzym-linked-Immunosorbent-Assay (ELISA), sind in der Forschung die Standardwerkzeuge der täglichen Arbeit. Bei all diesen Methoden werden Antikörper verwendet, welche zuverlässig und spezifisch an ein bestimmtes Protein binden, selektiv dieses Protein aus einem Proteingemisch detektieren und, je nach Methode, darstellen. Es ist daher unbedingt notwendig, dass die Funktionalität der verwendeten Antikörper gewährleistet ist und eine Validierung der Antikörper in Bezug auf ihre Spezifität, also ihrer Fähigkeit der Detektion des Zielproteins ohne Detektion weiterer Proteine, stattgefunden hat. Eine Leistungsbewertung von neuen Antikörpern ist laut der EU-Richtlinie zur Inbetriebnahme von In-vitro-Diagnostika (IVDR, Europäisches Parlament and Rat der Europäischen Union, 1998) zwingend voraus gesetzt. Vor der Inbetriebnahme von neuen Antikörpern ist jedoch die Qualität dieser Validierung variabel. So sollten mehrere validierte Antikörper für dasselbe Zielprotein dieselben Ergebnisse erzielen. Vergleich man die Literatur, so findet man meist eine Spannweite an Ergebnissen für die prozentuale Menge an Zielprotein-positiven Tumoren (Büyücek et al., 2024; Gorbokon et al., 2024; Lennartz et al., 2024; Menz et al., 2023).

Dies zeigt, dass für eine zuverlässige Anwendung von Antikörpern in der Diagnostik, Prognose, Therapie und Forschung eine vollständige und umfassende Validierung der Antikörper in allen ihren Einsatzbereichen stattfinden muss um ein zuverlässiges Produkt zu erhalten.

## 1.2 Antikörper

### 1.2.1 Das Immunsystem und Antikörper-Reifung

Das menschliche Immunsystem dient zur Abwehr von eindringenden Pathogenen, sowie der Eliminierung krankhafter Körperzellen und hat sich während der Evolution mit verschiedenen Mechanismen an ihre Aufgabe der Immunabwehr angepasst. Hierbei besteht die angeborene Immunabwehr aus physiologischen Barrieren und allgemeinen entzündlichen Reaktionen für eine schnelle und unspezifische Immunabwehr. Die spezifische Immunabwehr entwickelt sich individuell bei Infektionen mit einem Pathogen, und besteht aus zellulären (z.B. Granulozyten, natürliche Killerzellen, T-Lymphozyten) sowie humoralen Bestandteilen (Antikörper, Interleukine) (Delves et al., 2017; Frank, 2002). Antikörper erkennen Peptide sehr spezifisch und werden vom Immunsystem verwendet, um Körper-fremde Organismen durch entsprechende Peptidsequenzen zu erkennen. Durch die hohe Spezifität kann so zwischen körpereigenen und körperfremd unterschieden werden und eine Abwehr der fremden Organismen zielgerichtet eingeleitet werden.

Der hohe Grad an Sensitivität und Spezifität der Antikörper wird durch den Prozess der Generierung der jeweiligen Antikörper ermöglicht. Die erste Form der B-Lymphozyten entstammt in der Oontogenese aus pluripotenten hematopoetischen Stammzellen, welche sich im Knochenmark zu lymphatischen Vorläuferzellen (common lymphatic progenitor, CLP) differenzieren. Diese CLPs differenzieren sich im Folgenden zu pro- B-Lymphozyten und durch Re-Arrangierung der schweren Ketten weiter zu pre-B-Lymphozyten, welche sich anschließend durch Re-Arrangierung der leichten Ketten zu unreifen B-Lymphozyten mit Oberflächen-Immunglobulinen an der Zelloberfläche entwickeln (surface immunglobulins, slg) (Akashi et al., 2000; Kondo et al., 1997; Seita and Weissman, 2010).

Diese unreifen B-Lymphozyten differenzieren sich anschließend weiter zu reifen B-Lymphozyten mit IgM- und IgD-Expression, welche zunächst auf Reaktion gegen körpereigene Antigene getestet werden (zentrale Toleranz) und bei nicht vorhandener Reaktion in das Knochenmark und die Milz einwandern (Murphy and Weaver, 2018; Ollila and Vihinen, 2005; Wang, 2020).



Die reifen B-Zellen exprimieren ihre Antikörper auf der Oberfläche als Teil des B-Zell Rezeptors. Dieser Rezeptor besteht aus dem Antikörper, sowie dem Proteinkomplex CD79. Der Antikörper dient zur Liganden-Bindung, der Proteinkomplex aus CD79A und CD79B dient zur Signalweiterleitung. Bei einer Reaktion mit körpereigenen Antigenen, welche nur in der Peripherie des Körpers vorhanden sind, werden auch diese B-Lymphozyten vernichtet (periphere Toleranz). Findet eine Anbindung eines körperfremden Antigens an den Antikörper-Anteil des B-Zell Rezeptors über die Präsentation des Antigens durch T-Helferzellen statt, kommt es zur Heterodimerisierung der CD79-Proteine und zu einer Signalkaskade ins Innere der B-Zelle. Das führt zur Aktivierung der Zelle durch Expression von Genen zur B-Zell Proliferation, Differenzierung und Antikörperproduktion (Hirsch-Kauffmann and Schweiger, 1992; Kurosaki, 2002; Ollila and Vihinen, 2005). Zunächst werden IgM Antikörper produziert und es kommt zum Wechsel der Antikörperklasse zu IgG (Blandino and Baumgarth, 2019). Hierbei werden zunächst bei der primären Immunantwort vor allem IgM- und nur wenige IgG-Antikörper durch die B-Lymphozyten erstellt, bei einer wiederholten Interaktion mit dem Antigen erfolgt die sekundäre Antikörperantwort mit einer starken IgG- und geringen IgM-Produktion. Die Produktion der Antikörper wird hier von B-Gedächtniszellen übernommen, welche sich während der primären Antikörperantwort gebildet haben (Bandilla et al., 1969).

Das Re- und Neuarrangieren der Immunglobulin-Gene ist ein essenzieller Bestandteil der Generierung der B-Zell Diversität. Hierbei werden die variablen Anteile der schweren und leichten Ketten der Antikörper durch Rekombination der Genabschnitte neu angeordnet. Genauer werden hierbei die VDJ-Anteile in den schweren Ketten und die VJ-Anteile in den leichten Ketten durch somatische Rekombination und somatische Hypermutation modifiziert (Wang, 2020). Die somatische Rekombination erfolgt hierbei zwischen den Rekombinationssignalsequenzen (recombination signal sequences, RSS), welche alle VDJ- bzw VJ-Anteile der schweren und leichten Ketten flankieren. Hierhin werden die Proteine RAG1, RAG2, HMGB1 und HMGB2 rekrutiert, welche einen Doppelstrangbruch initiieren (Wang, 2020). Bei der somatischen Hypermutation kommt es zu mehrfachen Substitutionen einzelner Nukleotide in und um die VDJ-Anteile, sodass noch mehr Varianz in den entstehenden Antikörpern generiert wird (Neuberger and Milstein, 1995).

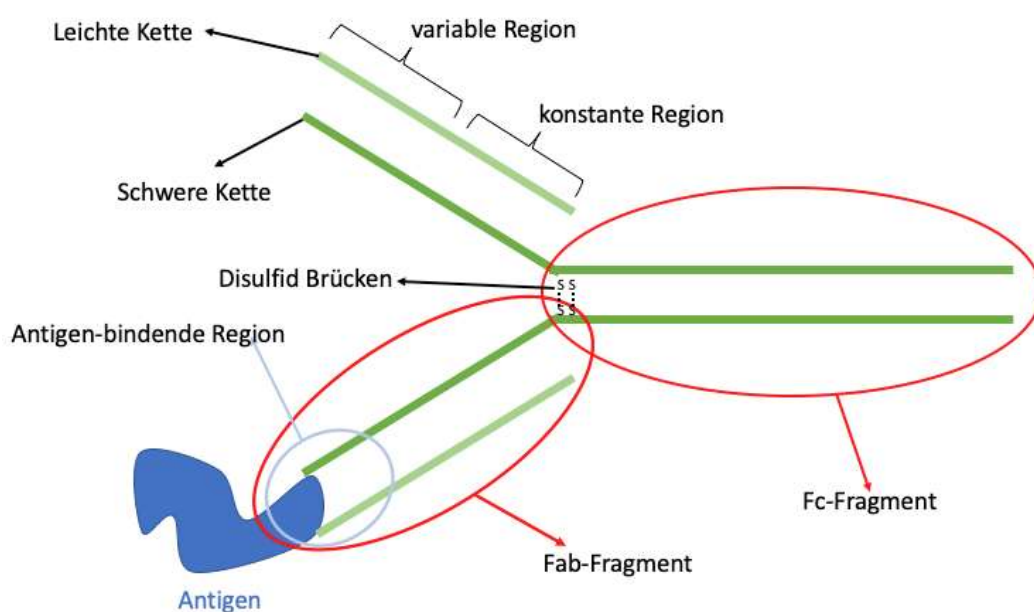
Im Folgenden wird durch die Formierung einer Haarnadelstruktur ein Teil der Gensequenz ausgeschnitten und die Sequenz durch nicht-homologe Endverknüpfung miteinander

verbunden. Zudem kommt es bei der erneuten Verbindung der DNA-Endstücke zu fehlerhaften Reparaturen, Entfernung von Nukleotiden durch Exonukleasen oder Einbau von Nukleotiden durch die terminale Dideoxynukleotidtransferase (TdT), sodass hier eine weitere Diversität in den Genabschnitten eingebaut wird (Wang, 2020). Es wird durch Allelausschluss nur eine der beiden Allele der schweren und leichten Kette für den erstellten Antikörper verwendet (Schatz and Ji, 2011; Vettermann and Schlissel, 2010). Der konstante Anteil (C) der schweren und leichten Ketten wird hierbei nicht re-arrangiert, jedoch bestimmt dieser Anteil den Immunglobulin-Isotyp. Da das Re-arrangieren ungerichtet und zufällig ist, ist eine Selektion der entstandenen Antikörper zwingend notwendig, um eine Reaktivität der Antikörper gegen körpereigene Antigene zu verhindern und nur solche Antikörper zu vermehren, welche eine hohe Spezifität gegen das Zielantigen haben (Meffre et al., 2000). Dies erfolgt zunächst durch Präsentation der unreifen schweren Kette im prä-B-Zell-Rezeptor durch die klonale Deletion: Sollte die schwere Kette nicht kompatibel sein, wird das andere Allel getestet – sind keine der beiden Allele kompatibel, geht die pre-B-Zelle zugrunde (Apoptose) (Murphy and Weaver, 2018). Bei funktionierender schwerer Kette wird das nicht genutzte, zweite Allel der schweren Kette inaktiviert (Allelausschluss). Die Rekombination der Genbereiche für die leichten Ketten wird initiiert und auch dessen Funktionalität wird überprüft. Das nicht genutzte Allel der leichten Kette wird inaktiviert (Isotypenausschluss) und nur B-Lymphozyten mit funktionierenden schweren und leichten Ketten werden zu unreifen B-Lymphozyten, alle anderen B-Lymphozyten sterben zuvor (Monroe, 2004). Des Weiteren werden solche B-Lymphozyten, deren Antikörper eine sehr geringe Affinität gegen körpereigene Antigene zeigen, durch verminderte Expression des B-Zell Rezeptors inaktiviert. Als Folge sind diese zwar noch vorhanden, werden aber nicht aktiviert, um eine Immunantwort zu induzieren (Anergie). Da sie inaktiviert sind, haben sie eine geringe Konkurrenzfähigkeit gegenüber anderen, hoch reaktiven B-Lymphozyten und sterben dadurch bald ab oder verbleiben in sehr geringer Zahl im Körper, wo sie aber aufgrund ihrer geringen Affinität gegen das Körper-eigene Antigen nur ein zu geringes aktivierendes Signal induzieren können (immunologische Ignoranz) (Goodnow et al., 1988; Wang, 2020).

### 1.2.2 Antikörper, Antigene und Epitope

Antikörper, auch Immunglobuline genannt, bestehen aus je zwei leichten und zwei schweren Ketten, welche durch Aneinanderlagerung eine Y-förmige Struktur bilden. Die schweren Ketten können in folgenden Klassen unterteilt werden:  $\gamma$ ,  $\delta$ ,  $\alpha$ ,  $\mu$  und  $\epsilon$ . Diese unterschiedlichen schweren Ketten bilden so die verschiedenen Immunglobuline IgG, IgD, IgA, IgM und IgE, welche sich in ihrer Struktur und Aufgabe unterscheiden (Murphy and Weaver, 2018). Die leichten Ketten können weiter in die Gruppe der Kappa ( $\kappa$ ) oder der Lambda ( $\lambda$ ) Immunglobulin Loci unterteilt werden, welche sich nur in wenigen Aminosäuren unterscheiden und beide in einem gewissen Verhältnis im Menschen vorliegen (Katzmann et al., 2002).

Im Antikörper lagern sich die Ketten über Disulfidbrücken so zusammen, dass am unteren Ende des Y die beiden schweren Ketten C-Terminal das Fc-Fragment (Fragment, crystallisable) entsteht. Dieses Fc-Fragment dient zum Anbinden anderer Antikörper (wie auch in der Immunhistochemie genutzt, siehe Kapitel 1.3.1) sowie dem Komplementsystem und anderen Immunzellen. Die beiden oberen Enden des Y werden jeweils durch Aneinanderlagerung einer leichten und einer schweren Kette gebildet, sie bilden so jeweils das Fab-Fragment (Fragment, antigen binding). Die beiden Fab-Fragmente dienen zur Anbindung des Antikörpers an das Epitop im Zielprotein und werden als Paratop beschrieben. Die leichten Ketten werden im C-terminalen Bereich als C<sub>L</sub>-Fragment (Constant, light chain) beschrieben, im N-terminalen Bereich werden sie V<sub>L</sub> (Variable, light chain) genannt (Abbildung 1).



Adaptiert nach: Ramos-Vara et al., 2005

**Abbildung 1:** Schematische Darstellung des Aufbaus eines IgG-Antikörpers (adaptiert nach Ramos-Vara et al., 2005)

Antikörper erkennen mit ihrem Antigen-erkennenden Bereich das Antigen in ihrem Zielprotein anhand einer Sequenz von 5-21 Aminosäuren, welches auch Epitop genannt wird (Delves et al., 2017). Dieses Epitop kann sowohl als lineares Epitop oder durch Faltung des Proteins als konformationelles Epitop vorliegen (Bogen et al., 2009). Die Unterscheidung der Epitope ist vor allem bei Antikörpern relevant, welche sowohl in der Immunhistochemie als auch im Western Blot verwendet werden. In der Immunhistochemie liegen die Proteine zum Großteil in ihrer nativen, gefalteten Form vor, im Western Blot hingegen werden die Proteine denaturiert, sodass sie nur linear vorliegen. Als Paratop wird der Bereich des Antikörpers genannt, welcher bei der Bindung des Antikörpers an das Epitop anbindet.

Die Anbindung des Antikörpers an das Epitop erfolgt durch schwache nicht-kovalente Bindungen (hydrophobe Kräfte, van-der-Waals Kräfte und elektrostatische Wechselwirkungen), daher ist die Bindung reversibel und nicht sehr stabil. Die Stärke der Anbindung des Antikörpers an ein einzelnes Epitop wird auch als Affinität des Antikörpers beschrieben und wird durch die Aminosäure-Komposition des Epitops und Paratops bestimmt. Eine hohe Affinität korreliert hierbei mit einer hohen Spezifität des Antikörpers. Als Avidität wird die Summe der Affinitäten aller Antikörper, welche an Epitope des Antigens binden, bezeichnet (Hewitt, 2011).

Die Klonalität des Antikörpers beschreibt die Abstammung des Antikörpers und ist in der Verwendung ein wichtiger Faktor. Polyklonale Antikörper entstammen aus vielen verschiedenen B-Lymphozyten-Klonen, welche zwar alle dasselbe Zielprotein erkennen, jedoch an unterschiedlichen Epitopen anbinden sowie gegebenenfalls auch andere ähnliche Epitope in anderen Proteinen detektieren (geringe Spezifität) (Nelson, 2000). Durch die Mischung verschiedener Antikörper mit verschiedenen Ziel-Epitopen ist es nicht möglich die Kreuzreaktivität mit anderen Proteinen genauer zu charakterisieren, sodass diese Antikörper durch ihre Unspezifität vor allem für die Immunhistochemie und Western Blot nicht präferiert werden. Zudem haben diese Antikörper eine starke Variabilität von Lot-zu-Lot (Lot entspricht einer Einheit, die gleichzeitig während der Produktion erstellt wurde). Aufgrund der verschiedenen Epitope haben die Antikörper eine hohe Sensitivität gegenüber geringsten Mengen des Antigens; es liegt aber nur eine geringe Spezifität gegenüber dem Epitop vor, da mehrere Epitope erkannt werden. Die Herstellung dieser Antikörper ist kostengünstig und schnell. Jedoch werden bei jedem neu immunisierten Tier andere Antikörper hergestellt, sodass die Vergleichbarkeit gering ist (Busby et al., 2016). Monoklonale Antikörper werden

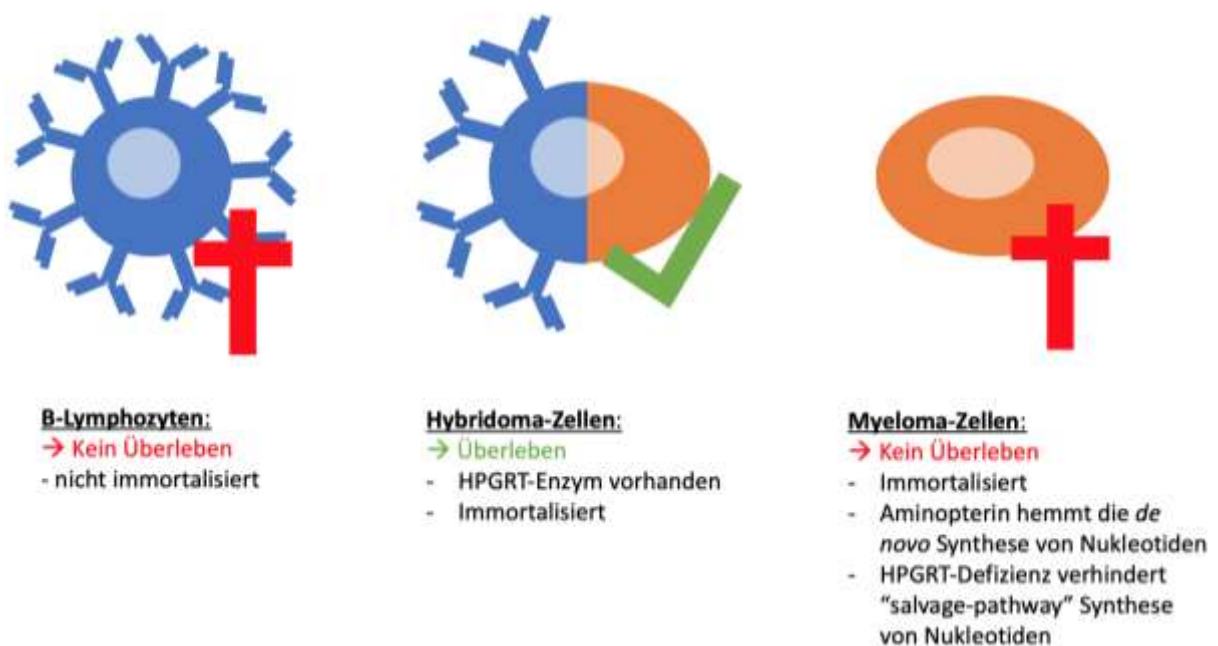
von B-Lymphozyten produziert, welche alle auf einen einzigen B-Lymphozyten Klon zurückgehen (Monoklonalität). Dies garantiert, dass die Antikörper alle gegen das gleiche Epitop gerichtet sind und auch die unspezifischen Interaktionen des Antikörpers identisch sind. Eine vollständige Charakterisierung des Antikörpers ist so möglich. Bei immunhistologischen Färbungen kann somit zwischen spezifischen und unspezifischen Färbungen des Antikörpers unterschieden werden. Die Verwendung von monoklonalen Antikörpern ist vor polyklonalen Antikörpern bevorzugt, da hier eine geringere Variabilität und Kreuzreaktivität zu erwarten ist. Durch die Erstellung von Hybridoma-Zellen zur Produktion der monoklonalen Antikörper ist die Produktion des Antikörpers (nahezu) unendlich. Jedoch neigen Hybridoma-Zellen zu Mutationen, sodass die produzierten Antikörper im Laufe der Zeit potenziell Veränderungen aufweisen können (Kromenaker and Srienc, 1994). Die Herstellung der monoklonalen Antikörper ist im Vergleich zu polyklonalen Antikörpern langwieriger und teurer, zudem ist die Sensitivität des Antikörpers geringer, da nur ein Epitop erkannt wird (Peters et al., 1990). Eine weitere Möglichkeit ist die Generierung von rekombinanten Antikörpern. Diese Antikörper werden biotechnologisch erstellt, indem die gewünschte Antikörper-Gensequenz in ein Expressionsvektor einer Zelle eingebracht wird und diese daraufhin exakt diesen Antikörper monoklonal exprimiert. Die gewünschte Gensequenz muss durch Sequenzierung oder andere bioinformatische Methoden gefunden werden. Bei einer Sequenzierung werden zumeist traditionelle monoklonale Antikörper verwendet. Dies zieht zunächst mehr Arbeitsaufwand bei der Erstellung und Sequenzierung monoklonaler Antikörper mit sich. Jedoch haben rekombinante Antikörper den Vorteil der sehr hohen Lot-zu-Lot Konsistenz, Skalierbarkeit der Expression in der Zellkultur, die Möglichkeit zur Veränderung der Gensequenz und eine geringere Gefahr der Sequenz-Mutation im Vergleich zu monoklonalen Antikörpern (Andreeff et al., 1985; Bartal and Hirshaut, 1987; Bradbury et al., 2018; Hanack et al., 2019; Y. Li et al., 2018).

### 1.2.3 Antikörper Herstellung im Labor

Wie zuvor beschrieben, sind monoklonale Antikörper die präferierte Quelle für primäre Antikörper in der Immunhistochemie, sowie für vielen weitere biologische Methoden (z.B. Western Blot). Die Generierung von Antikörpern im Allgemeinen erfolgt zumeist durch Immunisierung von Versuchstieren (Maus oder Kaninchen) mit dem Zielpeptid, welche im Folgenden Antikörper gegen dieses Zielpeptid generieren. Der Antikörper kann direkt aus dem Serum des Versuchstiers gewonnen werden, sodass polyklonale Antikörper gegen das Zielprotein vorliegen. Es können jedoch auch B-Lymphozyten der immunisierten Tiere isoliert und immortalisiert werden. Diese Zellen werden durch mehrere Subklonierungen bis zum Ursprung aus einer B-Zelle (daher monoklonal) selektiert, die spezifischen Eigenschaften des Antikörpers der B-Zelle werden evaluiert und die immortalisierten B-Lymphozyten werden zur Produktion der monoklonalen Antikörper weiter verwendet.

Zur Generierung dieser monoklonalen Antikörper wird seit der ersten Erwähnung 1975 von Köhler et al. die Hybridoma-Technologie verwendet (G. Köhler 1975). Hierbei wird Mäusen das Zielprotein (Antigen) sowie zusätzliches Adjuvants zur Verstärkung der Immunantwort injiziert. Durch die Injektion von Antigen und Adjuvant kommt es zu einer Immunantwort und somit zur Antikörper-Generierung gegen das verwendete Antigen. Nach zwei Wiederholungen der Immunisierung (Boost) zur Erhöhung der Menge an gebildetem Antikörper wird der Maus die Milz entnommen. Die Milz wird im folgenden Schritt zerkleinert, sodass unter anderem die enthaltenen B-Lymphozyten frei gelegt werden und mit den Myelomazellen X63AG8.653 mittels Polyethylenglycol fusioniert werden können. Hierbei entstehen unter anderem Hybridoma-Zellen als eine Fusion aus B-Lymphozyten und Myelomazellen, sowie Fusionierungen aus nur Myelomazellen oder B-Lymphozyten und nicht-fusionierte Zellen. Zur Selektion der entstandenen Fusionszellen und aller Nebenprodukte wird das Hypoxanthin-Aminopterin-Thymidin (HAT) Medium verwendet. Dieses Medium nutzt die Eigenschaft, dass Myelomazellen defizient für das Enzym Hypoxanthin- Guanin- Phosphoribosyltransferase (HPGRT) sind, welches zur Synthese von Hypoxanthin und Thymidin im „*salvage pathway*“ in der DNA-Synthese benötigt wird. Das Aminopterin des HAT-Mediums blockiert in den Myelomazellen die „*de novo*“ Synthese der DNA. Durch die HPGRT-Defizienz können aber auch über den „*salvage pathway*“ keine DNA-Bausteine generiert werden woraufhin die Zelle stirbt. B-Lymphozyten hingegen besitzen das HPGRT-Enzym, sind aber als isolierte primäre Zellen im unfusionierten Zustand nicht lange überlebensfähig. Nur durch eine Fusion aus

Myeloma- und B-Zelle entsteht eine Hybridomazelle, welche langfristig überleben kann und eine Selektion mit HAT-Medium überlebt, da das HPGRT-Enzym in der Zelle durch die Fusion vorliegt (Abbildung 2). Nach etwa einer Woche wird der Überstand der Zellkultur der Hybridomazellen verwendet, um auf spezifische, ins Medium sezernierte, Antikörpern gegen das Zielantigen zu testen. Hierbei wird die ELISA-Methode (enzyme-linked immunosorbent assay) verwendet, wobei das Zielantigen am Boden der Testplatte über Avidin fixiert wird und der Zellüberstand hinzugegeben wird. Die angebundenen Antikörper werden nun durch einen sekundären Antikörper detektiert, welcher mit der Meerrettichperoxidase gekoppelt ist. Bei Anbindung des Antikörpers sollte bei Zugabe des Substrates Luminol ein Farbumschlag stattfinden, welcher nun ausgelesen und quantifiziert werden kann. Durch die Quantifizierung der vorhandenen Antikörpermengen im Zellüberstand kann für jeden Hybridomaklon Rückschlüsse auf die Effektivität der Klonierung und der daraus folgenden Antikörperproduktion geschlossen werden und besonders effiziente Hybridomazellen durch Vereinzelung in eine monoklonale Kultur gebracht werden und weiter kultiviert werden. Diese Methode wird nun vor jedem Subkultivierungsschritt wiederholt, sodass letztendlich nur monoklonale Klone mit hoher und vor allem spezifischer Antikörperproduktion übrigbleiben sollten.



**Abbildung 2:** Effekt des HAT-Selektionsmediums auf die verschiedenen vorliegenden Zellen nach der Fusionierung:  
Nach der Fusionierung können fusionierte Hybridoma- Zellen sowie unfusionierte B-Lymphozyten oder Myeloma-Zellen vorliegen. Jedoch überleben nur Hybridoma-Zellen langfristig in HAT-Medium, da nur diese Zellen sowohl immortalisiert sind als auch das HPGRT-Enzym zu Nukleotidsynthese besitzen

Leider ist diese Methode zwar verlässlich, jedoch nicht sehr effizient in der Generierung von spezifischen Antikörper-produzierenden Klonen. Daher wurden weitere Optimierungen der Methode etabliert, wie das B-Zell Panning. Beim B-Zell Panning findet eine positive Selektion für solche B-Lymphozyten statt, welche Antigen-spezifische Antikörper produzieren, sodass die Fusionierung effizienter wird und mehr Hybridoma-Klone generiert werden, welche den gewünschten Antikörper produzieren (Wysocki and Sato, 1978). Hierfür werden die Milzzellen nach Entnahme aus der Maus und Vereinzelung der Zellen auf eine Platte gegeben, an welche zuvor das Zielantigen angebunden wurde. Da die B-Lymphozyten ihre produzierten Antikörper (zeitweise) auf der Oberfläche tragen, binden somit nur solche B-Lymphozyten an, welche zum Antigen passende Antikörper produzieren. Nicht-bindende B-Lymphozyten werden weggespült. Die Häufigkeit der Waschschrte steigert die Selektivität und Avidität (Bindungsstärke) der nun noch angebundenen Antikörper. Anschließend werden die noch gebundenen Antikörper abgelöst und für die Fusionierung wie zuvor beschrieben weiterverwendet.

#### 1.2.4 Stabilität von Antikörpern

Antikörper sind Proteine, welche die Fähigkeit haben, spezifisch an andere Zielproteine zu binden. Wie alle Proteine zerfallen sie mit der Zeit und ihre spezifischen Bindungseigenschaften verändern sich oder gehen ganz verloren. Aus diesem Grund haben Antikörper nur eine gewisse Haltbarkeit. Nur innerhalb dieses Zeitraums kann ein Hersteller die Funktionsfähigkeit des Antikörpers garantieren, dies bestimmt die Mindesthaltbarkeit des Antikörpers. Diese ist vor allem durch die garantierte Intaktheit des Antikörpers selbst bestimmt, jedoch können auch weitere Faktoren Einfluss auf die Funktionalität des Antikörpers in der Anwendung haben. Hierbei hat unter anderem die Antikörper-Konzentration Einfluss auf die Stabilität und Haltbarkeit des Antikörpers in Lösung (Hernández-Jiménez et al., 2018; Ishii et al., 2015). Auch der verwendete Verdünnungspuffer kann einen hohen Einfluss auf die Stabilität des Antikörpers über die Zeit haben, da manche Zusätze (wie Bovines Serum Albumin) stabilisierend auf Antikörper wirken (Chavez et al., 2016; Pandit et al., 2022). Ziel ist hierbei, einen Verdünnungspuffer zu erstellen, welcher in der Anwendung den Antikörper in Lösung bringt, die Degradation des Antikörpers bis zur Verwendung verhindert und einen Probenverlust bzw. eine unspezifische Bindung mit anderen Proteinen verhindert. Hierbei wird ein Puffer verwendet, meist eine Phosphat-gepufferte Salzlösung (phosphate-buffered saline, PBS) oder ein TRIS-Puffer



(Tris(hydroxymethyl)aminomethan). Des Weiteren wird zur verbesserten Durchdringung des Gewebes ein Detergens (z.B. Tween-20) oder Lösungsmittel (z.B. Dimethylsulfoxid (DMSO)) verwendet (Abcam, 2024a). Um den Probenverlust zu vermindern und die Proteinstabilität zu erhöhen, wird zudem ein Trägerprotein verwendet (z.B. Serum) (Roohi, 2006). Die Quelle des Serums unterscheidet sich: mögliche Quellen sind Eselserum, Ziegenserum, Bovines Serumalbumin (BSA) oder fetales Kälberserum (FCS), welche sich in Qualität und Preis zum Teil unterscheiden. Zur Konservierung werden häufig noch Biozide wie Natriumazid hinzu gegeben (Walls and Loughran, 2017). Zur besseren farblichen Unterscheidung wird häufig ein grüner Farbstoff zugegeben (Abcam, 2024b; Carl Roth, 2024). Der pH-Wert liegt meist bei pH 7-8 (Chang and Lamm, 2003).

Die Verdünnungspuffer werden zumeist nicht vom Anwender selbst hergestellt, sondern fertig von Firmen gekauft, um so ein standardisiertes Produkt zu erhalten. Dies ist jedoch im Anbetracht der geringen Komplexität der Pufferzusammensetzung sehr teuer. In

Tabelle 1 ist die Zusammensetzung kommerziell erwerblicher Verdünnungspuffer gelistet:

**Tabelle 1:** publizierte Inhaltsstoffe kommerzieller Antikörper Verdünnungspuffer für die Immunhistochemie

|                |                | Thermo Fisher                             | Sigma Aldrich                                                | Carl Roth                   | Abcam               | PTwH           | PTwH           |
|----------------|----------------|-------------------------------------------|--------------------------------------------------------------|-----------------------------|---------------------|----------------|----------------|
|                |                | CytoVista™<br>Antibody<br>Dilution Buffer | IHC Select<br>Antibody<br>Diluent<br>Solution,<br>prediluted | Antikörper-<br>Diluent grün | Antibody<br>Diluent | Corning Rezept | Corning Rezept |
|                |                | V11305                                    | 21544-M                                                      | 0070.1                      | ab64211             | online Rezept  | Online Rezept  |
| Puffer         | PBS            | ja                                        | ja                                                           | -                           | -                   | ja             | ja             |
|                | TRIS           | -                                         | -                                                            | ja                          | ja                  | -              | -              |
| Zugänglichkeit | Tween-20       | 0,2 %                                     | 0,2 %                                                        | -                           | Wahrscheinlich      | 0,2 %          | 0,2 %          |
| Gewebe         | DMSO           | 5,0 %                                     | -                                                            | -                           |                     | 5,0 %          | 5,0 %          |
| Trägerprotein  | Heparin        | ja                                        | -                                                            | -                           | Wahrscheinlich      | 0,001 %        | 0,001 %        |
|                | Eselserum      | 3,0 %                                     | -                                                            | -                           | Wahrscheinlich      | 3,0 %          | -              |
|                | BSA            | -                                         | -                                                            | -                           |                     | -              | 1,5 %          |
| Biozid         | ProClin<br>300 | -                                         | 0,1 %                                                        | -                           | -                   | -              | -              |
|                | NaN3           | -                                         | -                                                            | ja                          | 0,05 %              | 0,05 %         | 0,05 %         |
| Farbstoff      |                | -                                         | -                                                            | ja                          | ja                  | -              | -              |
| pH             |                | 7,7                                       | unbekannt                                                    | 7,4                         | 7,0                 | unbekannt      | unbekannt      |

Im Anwendungsvergleich zeigen die Verdünnungspuffer der verschiedenen Hersteller jedoch teilweise sehr unterschiedliche Ergebnisse. Das lässt vermuten, dass noch weitere Inhaltsstoffe enthalten sind, welche unterhalb der noch anzugebenden Menge sind. Eine chemische Analyse des Puffers von Carl Roth und Dako zeigte hierbei die Anwesenheit von Caprylsäure (siehe Anhang, Abbildung 61 und Abbildung 62), eine Literaturanalyse verwies auf die mögliche Verwendung von Zuckern, wie zum Beispiel Glucose, Sorbitol oder Trehalose (Bhambhani et al., 2012).

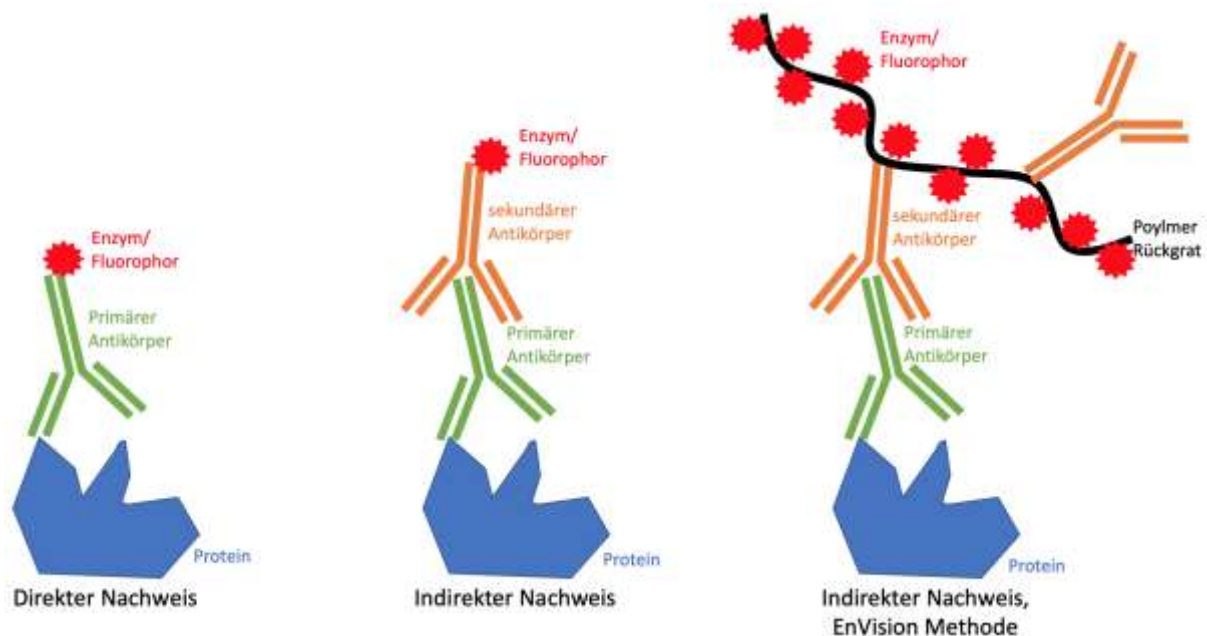
### 1.3 Immunhistochemie

#### 1.3.1 Prinzip

Die Immunhistochemie (IHC) ist eine seit langem etablierte Methode, jedoch ist sie auch heute noch eine der wichtigsten Methoden in der Biologie sowie Medizin (Coons et al., 1941). Aufgrund ihrer hohen Zuverlässigkeit und Sensitivität wird diese Methode auch heute noch als Goldstandard zur Diagnostik und Grundlagenforschung verwendet. Sie hat den Vorteil, dass sowohl die Präsenz als auch die Lokalisation eines Proteins *in situ* detektiert werden kann. Bei Verwendung von Fluorophoren können zudem mehrere Antikörper zeitgleich am Schnitt verwendet werden und so die räumliche Präsenz mehrerer Zielproteine gleichzeitig analysiert werden (Ramos-Vara and Miller, 2014).

Das Prinzip der Immunhistochemie ist die direkte oder indirekte Detektion des Zielproteins im fixierten Gewebe oder Zellen durch Antikörper, welche durch ein Detektionssystem visualisiert werden. Hierbei wird das Gewebe in sehr dünne Scheiben (Schnitte) aufgeschnitten. Durch die Behandlung mit Hitze und entsprechenden Puffern werden die Zielproteine zugänglich gemacht (siehe 1.3.3 Antigen-Demaskierung). Bei der direkten Methode wird ein markierter Antikörper (z.B. mit einem angekoppelten Enzym oder Fluorophor) zugegeben, welcher das Zielprotein detektiert und durch die Markierung direkt visualisiert. Bei der indirekten Methode ist der Antikörper, welcher gegen das Zielprotein gerichtet ist, nicht markiert. Es braucht hier einen sekundären Antikörper, welcher gegen die Ursprungsspezies des primären Antikörpers gerichtet ist und nun entweder ein Fluorophor oder häufiger ein Enzym angekoppelt hat. Dieser sekundäre Antikörper kann nun durch Zugabe des Enzymsubstrats bzw. des entsprechenden Lichts aktiviert werden und visualisiert werden (Janardhan et al., 2018).

Die indirekte Nachweismethode ist die am häufigsten verwendete Methode, da hier keine Markierung aller verwendeter Primärantikörper notwendig ist, sondern kostengünstigere gekoppelte sekundäre Antikörper verwendet werden können und individuell zusammen gestellt werden können. Bei der EnVision Methode sind sowohl der sekundäre Antikörper (gerichtet gegen die Spezies des primären Antikörpers) sowie mehrere Enzyme bzw Fluorophore an ein Polymer-Rückgrat gekoppelt sodass es bei der Anbindung des sekundären Antikörpers an den primären Antikörper es zur Umsetzung einer Großzahl an Enzymsubstraten und somit chromogenem Signal kommt bzw. bei Fluorophoren eine Vielzahl an Fluorophoren aktiviert werden und es so zu einer Signalverstärkung kommt (Abbildung 3) (Hewitt, 2011; Wiedorn et al., 2001).



**Abbildung 3:** Vergleich der Nachweismethoden in der Immunhistochemie:

Das Zielprotein (Blau) wird über ein spezifisches Epitop von einem primären Antikörper (Grün) detektiert. Bei der direkten Nachweismethode ist an den primären Antikörper direkt das Enzym oder Fluorophor (Rot) gekoppelt, welches bei Zugabe des Enzymsubstrats bzw. entsprechender Wellenlänge des Lichts zu einer farblichen Detektion führt. Beim indirekten Nachweis wird das Enzym/Fluorophor an einen sekundären Antikörper (Orange) gekoppelt, der sekundäre Antikörper detektiert den primären Antikörper anhand seiner Ursprungsspezies. Beim indirekten Nachweis mit der EnVision Methode ist an den sekundären Antikörper ein Polymer-Rückgrat (Schwarz) mit vielen Enzymen/Fluorophoren angekoppelt, sodass eine Signalverstärkung der enzymatischen Umsetzung des Enzymsubstrats bzw. bei entsprechender Wellenlänge des Lichts stattfindet.

### 1.3.2 Formalin-Fixierung

Zur Konservierung von Geweben und Zellen wird zumeist auf die Formalin-Fixierung zurückgegriffen. Die Fixierung mit Formalin verursacht eine Kreuzvernetzung der Proteine. Hierbei bindet Formalin an die Aminosäuren Lysin, Tyrosin, Asparagin, Tryptophan, Histidin, Arginine, Cystein und Glutamin und verursacht eine Kreuzvernetzung durch Methylenbrücken und Brücken über Schiff'sche Basen (Dapson, 1993). Dies verursacht eine Stabilisierung der Primär- und Sekundärstruktur der Proteine. Jedoch wird die Tertiär- und Quartärstruktur dadurch verändert, sodass zur Freilegung der Antigene die Formalin-Fixierung durch die Antigen Demaskierung teilweise rückgängig gemacht werden muss (siehe Kapitel 1.3.3 Antigen-Demaskierung). Da die Fixierung durch Formalin ein langsamer Prozess (1 mm/h) ist, muss die Fixationszeit ausreichend lang sein. Sie darf aber nicht zu lang sein: Bei einer Überfixierung des Gewebes findet eine zu starke Kreuzvernetzung der Proteine statt, sodass Antigene für Antikörper unerkennbar werden (Hayat, 2002). Wird die minimal notwendige Fixierungszeit jedoch nicht eingehalten, ist die Fixierung im Inneren des Gewebestücks nicht vollständig abgeschlossen und die Färbung durch die Immunhistochemie kann Artefakte wie Färbungsgradienten, falsch-positive Ergebnisse oder Gewebeschädigung durch die Antigen Demaskierung zeigen (Hewitt, 2011).

Durch die Formalin-Fixierung wird das Gewebe bzw. die Zellen in ihrer Form und Struktur erhalten, jedoch wird durch die Kreuzvernetzung der Proteine die Stabilität und Haltbarkeit erhöht. Durch die Fixation wird die Degradation durch Inaktivierung zelluläre Enzyme verhindert (Hayat, 2002).

### 1.3.3 Antigen-Demaskierung

Die Antigen Demaskierung ist ein wichtiger Schritt in der Vorbereitung zur immunhistologischen Färbung, da durch die Formalin-Fixierung Kreuzvernetzungen der Proteine stattgefunden haben, welche auch Antigene (bzw. die Epitope) verdecken könnten. Daher werden die Proben entweder enzymatisch oder durch Hitze demaskiert, sodass die Kreuzverbindungen aufgebrochen und die Antigene (Epitope) wieder zugänglich gemacht werden.

Bei einer Demaskierung durch Enzyme (enzymatisch induzierte Antigen-Demaskierung) werden durch Proteinverdau mittels Trypsin, Proteinase K, Pronase, Ficin oder Pepsin die Proteine und somit auch Kreuzvernetzungen unspezifisch verdaut, wobei Zeit, Temperatur und pH-Wert Einfluss auf die Intensität der Demaskierung haben (Battifora and Kopinski, 1986; Miettinen, 1989; Pinkus et al., 1985). Das Problem der enzymatischen Demaskierung ist jedoch die Gefahr der Zerstörung der Gewebemorphologie oder der Epitope (Ordóñez et al., 1988).

Heute wird häufiger die hitzeinduzierte Epitop- Demaskierung verwendet. Hierbei wird der Vorgang der Kreuzvernetzung durch hohe Hitze oder alkalische Hydrolyse zum großen Teil reversibel gemacht, die genauen mechanistischen Vorgänge sind noch unbekannt (Krenacs et al., 2010). Durch die Behandlung liegen die Primär- und Sekundärstruktur der Proteine wieder in der ursprünglichen Form vor, die Tertiär- und Quartärstruktur kann durch die Behandlung verändert werden. Dies ist selten ein Problem da die meisten Antikörper, die in der Immunhistochemie verwendet werden, auf lineare Epitope abzielen (Bogen et al., 2009; Fraenkel-Conrat et al., 1947; Sompuram et al., 2006).

Zur hitzeinduzierten Epitop- Demaskierung wird meist ein Autoklav verwendet, da hier eine gleichmäßige, hohe ( $>100^{\circ}\text{C}$ ) Temperaturverteilung garantiert ist, anders als bei der Verwendung einer Mikrowelle oder eines Wasserbads (Kanai et al., 1998; Pileri et al., 1997; Shi et al., 1991). Die Gewebeschnitte werden hierbei in einem Puffer gelagert, welcher meist ein Citratpuffer mit einem pH-Wert von 3-8 ist. Je nach Antigen muss der optimale pH-Wert ausgetestet werden, es kann nicht genau vorhergesagt werden welcher pH-Wert für das jeweilige Antigen und Antikörper optimal ist (Morgan et al., 1994; Shi et al., 1997).

#### 1.3.4 Erstellung von Gewebe-Mikroarrays

Gewebe-Mikroarrays (engl. Tissue-Microarray, TMA) sind eine Weiterentwicklung des klassischen Gewebeblocks aus FFPE-Gewebe und wurde erstmals durch Kononen et al. 1998 beschrieben (Kononen et al., 1998). Bei dieser Methode werden kleine Stanzen verschiedener Gewebe- oder Zelllinienblöcke in einen neuen Paraffin-Block transferiert, sodass der erstellte Mikroarray letztendlich eine Sammlung vieler verschiedener Gewebeausschnitte darstellt, welche auf Protein-, DNA- oder RNA-Ebene untersucht werden können (Torhorst et al., 2001). Eine Zusammenstellung von bis zu 1.000 Gewebestücken pro Block zu erstellen und gleichzeitig in einem Schnitt zu analysieren (Mirlacher and Simon, 2010).

Entsprechend des Papers von Mirlacher und Simon werden zur Erstellung eines TMA zunächst durch eine Hohlneedle von zumeist 0,6mm (bis zu 2mm Durchmesser) ein Stück FFPE-fixiertes Gewebe („Stanze“) aus dem Donorblock entnommen. Dieses Stück Gewebe wurde nun in einen neuen Rezipienten-Paraffinblock, welchem zuvor ein entsprechendes Stück Paraffin entnommen wurde, eingeführt. Durch Andrücken der eingeführten Stanzen, sowie abschließender Inkubation für 10 Minuten bei 40° C werden die Stanzen mit dem Paraffinblock verbunden. Der erstellte TMA-Block kann nun, wie ein normaler Paraffin-Block, bei Raumtemperatur mit einem Mikrotom geschnitten und regulär wie ein Großschnitt für die Immunfärbung verwendet werden. Mittels der zugewiesenen Koordinaten auf dem TMA kann die entsprechende Stanze einem Patienten zugeordnet werden (Mirlacher and Simon, 2010). Aufgrund der geringen Gewebsgröße ist es hierbei relevant, dass ein Pathologe im Gewebe relevante Gewebsbereiche markiert, sodass Stanzen aus dem gewünschten Bereich entnommen werden können.

### 1.4 Qualitätsparameter der Immunfärbung

#### 1.4.1 Qualität des Antikörpers (Stabilität, Einflussfaktoren, Vorgehen)

Antikörper werden spezifisch gegen ein Antigen erstellt und, bei monoklonalen Antikörpern durch Subklonierung, nach den besten Färbe- und Bindungseigenschaften in den erwünschten Methoden (z.B. IHC, Western Blot) selektiert. Hierbei ist es wichtig, dass der Antikörper in der Immunhistochemie eine spezifische Färbung für das Zielprotein möglichst ohne Hintergrundfärbung zeigt. Im Western Blot sollte nur das Zielprotein als eine einzige Bande bei erwarteter Größe des Zielproteins erkannt werden bzw. beobachtete Nebenbanden sollten durch Isoformen etc. erklärbar sein (siehe 4.5 Antikörper-Validierung 1: Western Blot,

4.6: Antikörper-Validierung 2: Kreuzreaktivität). Daher ist es essenziell, neu erworbene bzw. generierte Antikörper auf ihre Eigenschaften zu testen (siehe 1.5 Validierung von Antikörpern).

In der Anwendung der Antikörper in der Immunhistochemie ist nach einer erfolgreichen Testung der Färbereigenschaften auch das Handling mit dem Antikörper ausschlaggebend für eine verlässliche Färbung. Es wurde zuvor in der Literatur und wird auch in dieser Dissertation dargestellt, dass die Lagerungsbedingungen der Antikörper einen starken Einfluss auf die Funktionalität des Antikörpers haben (0 Haltbarkeit von Antikörpern, Kukis et al., 1999; Michaut et al., 2014). Eine Lagerung der Antikörper bei zu geringer Temperatur führt zu einer schnelleren Degradation der Antikörper, wiederholtes Auftauen der Antikörper hat weitere negative Effekte auf die Haltbarkeit der Antikörper. Eine Mindesthaltbarkeit der Antikörper ist somit zwar durch jeden Hersteller angegeben, jedoch führt eine unsachgemäße Lagerung und Handhabung zu einer verfrühten verminderten Leistung. So wird von Herstellern eine Lagerung in Aliquots des unverdünnten Antikörpers empfohlen, sodass wiederholtes Auftauen vermieden werden kann (Abcam, 2024c; Cell Signaling, 2024). Eine Lagerung in unverdünnter Form ist zudem zu empfehlen, da ein Ausfallen des Antikörpers bei zu geringer Proteinkonzentration ein bekanntes Problem ist (Großhans et al., 2019). Alternativ kann die Zugabe von BSA (Bovinem Serum Albumin) als Stabilisierungsprotein dieses Problem mindern (Chavez et al., 2016; Pandit et al., 2022). Dies ist jedoch nicht für jede Antikörper-Anwendung möglich, sodass auch BSA-freie und somit Temperatur-sensitivere Antikörper auf dem Markt sind.

#### 1.4.2 Qualität des Färbeprotokolls

Ein weiterer wichtiger Punkt in der Verwendung von Antikörpern zur immunhistologischen Färbung ist das Färbeprotokoll. Wie auch im Institut für Pathologie des Universitätsklinikums Eppendorf liegen oft etablierte Färbeprotokolle vor, welche für die jeweilig verwendeten Antikörper im jeweiligen Labor optimiert sind. Da die Immunhistochemie an sich eine recht einfache, aber Fehler-empfindliche Methode ist, ist es hierbei wichtig, dass das Färbeprotokoll mit Sorgfalt erstellt, notfalls angepasst und durchgeführt wird, um so vergleichbare Ergebnisse zu erhalten.

So muss für jeden Antikörper spezifisch der optimale pH-Wert des Demaskierungspuffers während der hitzeinduzierten Antigen-Demaskierung, sowie die Verdünnung des Antikörpers

getestet und optimiert werden. Beide Faktoren führen bei Nichtoptimierung zu verfälschten Färbeargebnissen aufgrund von unspezifischer oder falsch negativer Färbung.

Bei Verwendung des falschen pH-Werts des Demaskierungspuffers werden Epitope des Zielproteins nicht ausreichend frei gelegt oder zerstört und der Antikörper kann anschließend nicht an das Zielepitop binden. Durch falsch gewählte Demaskierungspuffer kann es so zu unspezifischen Bindungen des Antikörpers im Gewebe kommen, da Epitope nicht in ihrer erwarteten Form vorliegen (Morgan et al., 1994; Ramos-Vara, 2005; Shi et al., 1997).

Auch die Verdünnung des Antikörpers hat einen starken Effekt auf das Färbeargebnis: bei zu geringer Konzentration des Antikörpers kommt es zu einer Abwesenheit der Färbung, bei einer zu hohen Konzentration zu einer unspezifischen Bindung des Antikörpers an weitere Proteine neben dem Zielprotein (Ausserwöger et al., 2022; Großhans et al., 2019).

Wie in dieser Dissertation gezeigt, hat auch der Verdünnungspuffer des Antikörpers selbst einen großen Einfluss auf das Färbeargebnis (4.2 Einfluss der Puffer-Zusammensetzung auf die immunhistologische Färbung).



### 1.4.3 Qualität des Gewebes

Ein weiterer wichtiger Faktor bei der Immunhistochemie ist die Auswahl des Gewebes. Je nach Aufbereitung, Konservierung, Lagerung und Verwendung des Gewebes kann es auch hier zu Färbeartefakten kommen.

Gerade bei frischen Gewebeproben ist eine schnelle Aufbereitung des Gewebes relevant, da es schon nach kurzer Zeit zur Degradierung im Gewebe kommen kann (Bhoyar et al., 2024; McClatchy et al., 2020; Zimmermann et al., 2008). Eine schnelle Lagerung des Gewebes in Formalin (zur Formalin-Fixierung) oder flüssigem Stickstoff (zur Kryokonservierung) ist daher essenziell. Auch anschließend muss die Lagerung des Gewebes garantieren, dass eine Degradierung von Proteinen und DNA/RNA verhindert wird. So ist eine Lagerung bei – 80 °C zur Kryokonservierung zu empfehlen. Eine Lagerung der Formalin-fixierten Gewebeproben ist nach Durchlaufen des Entwässerungsprozesses durch eine aufsteigende Alkoholreihe und Einbetten in Paraffin bei Raumtemperatur möglich. Das so konservierte Formalin-fixierte Paraffin-eingebettete Gewebe (FFPE-Gewebe) wird für die Verwendung in Scheiben geschnitten, entparaffiniert und mittels aufsteigender Alkoholreihe gewässert. Erst jetzt ist das Gewebe wieder für wasserbasierte Demaskierungspuffer (siehe 1.4.2 Qualität des Färbeprotokolls) zugänglich und kann gemäß dem Färbeprotokoll verwendet werden.

Ein weiterer wichtiger Punkt ist die konkrete Auswahl des verwendeten Gewebes. Soll der Antikörper auf seine Funktionalität für zum Beispiel eine Validierung getestet werden, ist es essenziell, dass Proben mit gesicherter Expression des Zielproteins verwendet werden. Hierzu ist gegebenenfalls eine Literaturrecherche notwendig, um entsprechende Gewebe aus dem Normalgewebe oder Tumore auswählen zu können. Alternativ kann auf FFPE-aufbereitete Zellen zurückgegriffen werden. Es kann sich hierbei um Zellen aus Patienten (z.B. Aszites, zirkulierende Tumorzellen aus dem Blut) oder um Zelllinien handeln. Die Anwendbarkeit von Zelllinien in der Immunhistochemie zur Validierung von Antikörpern soll in dieser Dissertation genauer erörtert werden (4.5 Antikörper-Validierung 1: Western Blot, 4.7 Antikörper-Validierung 3: Vergleich der mRNA-Expression in Zelllinien). Je nach Anwendung und Protokoll ist es in allen Fällen notwendig, Negativ- sowie Positivkontrollen mit einer garantierten Abwesenheit und Anwesenheit des Zielproteins zu verwenden. Dies kann im Falle von Zelllinien auch durch knock-out/knock-down bzw. knock-in/Überexpression des Proteins erfolgen (EuroMAbNet, 2024).

## 1.5 Validierung von Antikörpern

### 1.5.1 Antikörper als Medizinprodukte

Wie zuvor beschrieben, ist eine genaue Leistungsdiagnostik für Antikörper, welche in der Diagnostik verwendet werden und somit unter die Regulation der in-vitro Diagnostik (IVDR) fallen, zwingend notwendig (Europäisches Parlament and Rat der Europäischen Union, 1998). Mit dieser Leistungsdiagnostik soll die spezifische und unspezifische Färbung eines jedes Antikörpers erfasst werden, welcher in der Diagnostik verwendet wird. Nur so können reproduzierbare und vor allem vertrauenswürdige Ergebnisse durch die Antikörper generiert werden. Fehldiagnosen oder falsche Verlaufsprognosen von Erkrankungen aufgrund unspezifischer Färbung von Antikörpern sollen somit vermieden werden, eine zielgerichtete Anwendung von therapeutischen Antikörpern ist nur mit so geprüften Antikörpern gewährleistet (Ausserwöger et al., 2022; Gown, 2016; Rimm et al., 2014; Sturgeon and Viljoen, 2011; Uhlen et al., 2016).

### 1.5.2 Verfahren zur Validierung von Antikörpern

Bei der Anwendung von Antikörpern für die Immunhistochemie, wie aber auch für alle anderen Antikörper-basierten Methoden, ist eine vollständige Validierung der verwendeten Antikörper essenziell. Hierbei soll durch die Verwendung von unterschiedlichen Strategien verschieden Aspekte der Antikörper-Eigenschaften getestet und die Funktionalität des Antikörpers in jeder geplanten Methode bestätigt werden.

Eine häufig verwendete Strategie ist die Testung des Antikörpers in der Immunhistochemie und dem Western Blot. So werden die Detektionseigenschaften über der spezifischen Lokalisation des Zielproteins im Gewebe in der Immunhistochemie und der Überprüfung des Proteins über dessen Größe im Western Blot getestet. Es ist jedoch wichtig anzumerken, dass bei diesen beiden Assays das Zielprotein nicht im nativen Zustand vorliegt – in der Immunhistochemie liegt das Protein nach der Formalin-Fixierung, der Paraffin-Einbettung (FFPE) und Demaskierung im Gewebeschnitt demaskiert vor (siehe 0 Formalin-Fixierung), im Western Blot liegt das Protein denaturiert, linearisiert und somit nur noch als Primärstruktur vor.

Durch diese Kombination aus Überprüfung der Spezifität des Antikörpers durch dessen Lokalisation und dessen Größe kann die unspezifische Anbindung des Antikörpers an ein Protein mit ähnlicher Lokalisation bzw. Größe recht wahrscheinlich ausgeschlossen werden.

## 1.6 Ziel der Arbeit

Ziel dieser Dissertation ist eine systematische Analyse von Einflussfaktoren, welche die Generierung und Validierung von monoklonalen Antikörpern beeinflussen, die mittels Hybridoma-Technologie erstellt werden. Es werden hierbei von der Generierung bis zur Leistungsanalyse Faktoren betrachtet, welche Einfluss auf die Spezifität und Leistungsfähigkeit der Antikörper haben können.

In dieser Arbeit soll folgende Fragestellungen untersucht werden:

- Der Einfluss der Auswahl der Peptidsequenz und deren Lokalisation im Zielprotein auf die Generierung monoklonaler Antikörper sowie die Korrelation zwischen ELISA-Signalintensität und Leistungsfähigkeit der erstellten Antikörper.
- Optimierungsmöglichkeiten der Hybridoma-Technologie zur Steigerung der Qualität und Effizienz bei der Generierung monoklonaler Antikörper, mit besonderem Fokus auf den Ablauf der Fusionierung und Klonierung.
- Der Einfluss einzelner Komponenten eines IHC-Verdünnungspuffers auf die Färbequalität. Zudem wird die Reproduzierbarkeit eines kommerziell erhältlichen Verdünnungspuffers anhand von Literaturdaten getestet.
- Die Stabilität von Antikörpern unter verschiedenen Lagerungsbedingungen in konzentrierter sowie verdünnter Form sowie der Einfluss der Lagerung auf die Leistungsfähigkeit der Antikörper.
- Die Übertragbarkeit von Ergebnissen aus der Immunhistochemie auf den Western Blot, die Untersuchung geeigneter Lysatquellen sowie die Analyse potenzieller Kreuzreaktivitäten innerhalb von Proteinfamilien und zwischen verschiedenen Spezies.
- Die orthogonale Validierung immunhistologischer Ergebnisse durch RT-PCR sowie die Überprüfung der Anwendbarkeit von FFPE-fixierten Zelllinien-Blöcken für diese Validierung.

## 2. Material und Methoden

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Zellkultur Medien und Reagenzien

| Reagenzien                                                                                | Hersteller           | Produktnummer                |
|-------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------|------------------------------|
| Accutase                                                                                  | Anprotec             | AC-EZ-001/5                  |
| DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium ) High Glucose w/ L-Glutamine w/ Sodium Pyruvate | Anprotec             | AC-LM-0014                   |
| DMSO (Dimethylsulfoxid)                                                                   | Roth                 | D2650-100ML                  |
| DPBS (Dulbecco's Phosphate Buffered Saline w/o Calcium)                                   | Anprotec             | AC-BS-0002                   |
| FBS, Fetal Bovine Serum (USA Origin)                                                      | Anprotec             | AC-SM-0017, Lot: AN-20050119 |
| FCS, Fötales Kälberserum (hitzeinaktiviert)                                               | anprotec             | AC-SM-0027, Lot AN-200500119 |
| HAT-Medium Supplement                                                                     | Sigma-Aldrich        | H0262-10VL                   |
| Leibovitz L15 Medium                                                                      | Anprotec             | AC-LM-0064                   |
| Nicht-essenzielle Aminosäuren                                                             | Invitrogen           | 11140-035                    |
| PBS (Phosphate Buffered Saline)                                                           | Capricorn Scientific | PBS-1A                       |
| Penicillin-Streptomycin solution 100x                                                     | Anprotec             | AC-AB-0024                   |
| Penicillin/Strepdavidin                                                                   | Anprotec             | AC-AB-0024                   |
| Pyruvat                                                                                   | Thermo Scientific    | 11360039                     |
| RPMI 1640 w/ L-Glutamine w/25 mM Hepes                                                    | Anprotec             | AC-LM-0053                   |

### 2.1.2 Zusammensetzung der Reagenzien

| Reagenzien                                                  | Zusammensetzung                                                                                                                                      |
|-------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 10 M NaOH                                                   | 39,9 g NaOH in 100 mL dH <sub>2</sub> O                                                                                                              |
| 10 % Natriumazid<br>Stammlösung                             | 1 g Natriumazid, 10 mL dH <sub>2</sub> O                                                                                                             |
| 2 % Agarose                                                 | Agarose in H <sub>2</sub> O                                                                                                                          |
| 2 M DTT                                                     | DTT in H <sub>2</sub> O                                                                                                                              |
| 2 mM EDTA-Lösung                                            | 500 mL PBS, 2 mL 500 mM EDTA-Lösung                                                                                                                  |
| 5 % FCS in PBS                                              | 500 mL PBS, 25 mL FCS, 500 µL 10 % Natriumazid-Lösung                                                                                                |
| 5 % SDS in PBS                                              | SDS in PBS                                                                                                                                           |
| 500 mM EDTA-Lösung                                          | 700 mL dH <sub>2</sub> O mit 12 g EDTA und 50 mL 10 M NaOH. Anschließend auf pH 8 einstellen und auf 1000 mL mit dH <sub>2</sub> O auffüllen         |
| Ag8-Medium                                                  | 500 mL Basismedium, 5 % FCS                                                                                                                          |
| Avidinlösung für ELISA-Platten                              | 1:100 Avidin in Carbonatpuffer (pH 9,6)                                                                                                              |
| Basismedium                                                 | 500 mL RPMI-Medium, 16,5 mL Stammlösung                                                                                                              |
| Biotinylierte Peptide für<br>Peptidlösung für ELISA-Platten | Resuspension von lyophilisierten Peptiden in 990 µL dH <sub>2</sub> O, 10 µL 10 % Natriumazid-Lösung                                                 |
| Boostlösung                                                 | Je 20 µL Peptid, 12 µL CpG-Lösung, mit PBS auf 400 µL auffüllen                                                                                      |
| Goat-anti-Mouse-IgG-FC                                      | Resuspension von lyophilisierten Peptiden in 1000 µL dH <sub>2</sub> O;<br>Erstellung Aliquots aus 500 µL Goat-anti-Mouse-IgG-FC mit 500 µL Glycerol |
| HAT-Medium                                                  | Basismedium, 10 % FCS, HAT Medium Supplement                                                                                                         |
| Immunisierungslösung                                        | Je 25 µL Peptid, 15 µL CpG-Lösung, 150 µL inkomplettes Freund'sches Adjuvant, mit PBS auf 540 µL auffüllen                                           |
| PBST                                                        | PBS, 0,05 % Tween-20                                                                                                                                 |
| RPMI-Medium                                                 | 500 mL RPMI-Medium, 5 % FCS, 1 % Pyruvat, 1 % Penicillin/Streptomycin, 1 % nicht-essenzielle Aminosäuren                                             |
| Stammlösung                                                 | 100 mL Pyruvat, 100 mL Penicillin/Streptomycin, 100 mL nicht-essenzielle Aminosäuren                                                                 |
| Western Blot running buffer                                 | 1 Packung MES SDS Running Buffer Pulver in 1L ddH <sub>2</sub> O                                                                                     |

### 2.1.3 Reagenzien

| Reagenzien                                                                                                                   | Hersteller             | Produktnummer |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------|---------------|
| Agarose                                                                                                                      | Sigma-Aldrich          | A1296-100G    |
| Albumin aus Rinderserum (heat shock fraction, protease free, fatty acid free, essentially globulin free, pH 7, $\geq 98\%$ ) | Sigma-Aldrich          | A7030-50G     |
| Alkohol 100 %                                                                                                                | CHEMSOLUTE             | 2211.5000     |
| Alkohol 70 %                                                                                                                 | CHEMSOLUTE             | 2207.5000     |
| Alkohol 80 %                                                                                                                 | CHEMSOLUTE             | 2203.5000     |
| Alkohol 96 %                                                                                                                 | CHEMSOLUTE             | 2209.5000     |
| Ampicillin                                                                                                                   | Sigma-Aldrich          | A5354-10ML    |
| Antibody Diluent, Ready-to-use diluent, 125 mL                                                                               | Agilent Dako           | S0809         |
| Avidin aus Eiweiss, BioUltra, lyophilized powder, $\geq 10$ units/mg protein (E1%/280), $\geq 98\%$ (SDS-PAGE)               | Sigma-Aldrich          | A9275         |
| Caprylsäure                                                                                                                  | ROTH                   | 3168.1        |
| Clarity Max Western ECL Substrate                                                                                            | BioRad                 | 1705062       |
| CpG-Oligonukleotide                                                                                                          | TIB Molbio             |               |
| Dako REAL EnVision Detection System, Peroxidase/DAB+, Rabbit/Mouse                                                           | Agilent Dako           | K5007         |
| Dako REAL Peroxidase-Blocking Solution                                                                                       | Agilent Dako           | S2023         |
| EDTA (Ethylendiamintetraessigsäure), Triplex III for Analysis                                                                | Merck                  | 1.08418.0250  |
| Formalin Solution 10 % (v/v) [(=4 % w/v)] neutralized                                                                        | J.T. Baker             | 3933.1000     |
| Goat anti-Mouse IgG HRP-conjugated                                                                                           | Jackson ImmunoResearch | 115-035-062   |

|                                             |                         |              |
|---------------------------------------------|-------------------------|--------------|
| Goat anti-Rabbit IgG HRP-conjugated         | Jackson ImmunoResearch  | 111-035-008  |
| Glycerol                                    | Serva                   | 23176.01     |
| Hämalaunlösung sauer nach Mayer             | ROTH                    | T865.2       |
| Inkomplettes Freud'sches Adjuvant (IFA)     | Sigma-Aldrich           | F5506        |
| Kanamycin                                   | Sigma-Aldrich           | K0254-20ML   |
| LB-Bouillon (MILLER)                        | Sigma-Aldrich           | L3182-1KG    |
| LB-Bouillon mit Agar (Lennox)               | Sigma-Aldrich           | L7026-100TAB |
| LDS Sample Buffer (4x)                      | GenScript               | M000676-250  |
| MES SDS Running Buffer Powder               | GenScript               | M00677       |
| Milchpulver                                 | Roth                    | T145.2       |
| Mouse TrueBlot® ULTRA: Anti-Mouse Ig HRP    | Rockland                | 18-8817-30   |
| Natriumazid                                 | Sigma-Aldrich           | S2002        |
| Natriumcarbonat Decahydrat                  | Sigma-Aldrich           | 1.06391      |
| Natriumhydrogencarbonat                     | Sigma-Aldrich           | S5761        |
| Octansäure                                  | ROTH                    | 2613.2       |
| One Shot™ TOP10 chemisch kompetente E. coli | Invitrogen              | C404010      |
| OVA-Peptide                                 | Peps4LS                 |              |
| PEG 1500                                    | Roche Diagnostics       | 36632100     |
| Precision Plus Protein Dual Color Standards | BioRad                  | 1610374      |
| Rabbit TrueBlot®: Anti-Rabbit IgG HRP       | Rockland                | 18-8816-31   |
| RIPA-Lyse und Extraktionspuffer             | ThermoFisher Scientific | 89901        |
| S.O.C Mittel                                | Invitrogen              | 15544034     |
| SDS- Lösung, 20 %                           | Serva                   | 20768.03     |
| Target Retrieval Solution, pH 7.8           | Agilent Dako            | #S2367       |
| Target Retrieval Solution, pH 9             | Agilent Dako            | #S1699       |
| TMB Soluble Reagent                         | ThermoFisher Scientific | N301         |
| Wash Buffer (20x)                           | Dako Agilent            | GC807        |
| Xylol                                       | CHEMSOLUTE              | 360.2500     |

#### 2.1.4 Zelllinien

| <b>Zelllinie</b> | <b>Hersteller</b>                                                            | <b>Produktnummer</b> |
|------------------|------------------------------------------------------------------------------|----------------------|
| 3T3              | ATCC (American Type Culture Collection)                                      | CRL-1658             |
| 786-0            | NCI-Frederick Cancer DCTD Tumor/Cell Line Repository                         | 0507649              |
| A431             | ATCC (American Type Culture Collection)                                      | CRL-1555             |
| A498             | NCI-Frederick Cancer DCTD Tumor/Cell Line Repository                         | 0507613              |
| A549             | NCI-Frederick Cancer DCTD Tumor/Cell Line Repository                         | 0507479              |
| ACHN             | NCI-Frederick Cancer DCTD Tumor/Cell Line Repository                         | 0507475              |
| ASPC-1           | ATCC (American Type Culture Collection)                                      | CRL-1682             |
| BT-549           | NCI-Frederick Cancer DCTD Tumor/Cell Line Repository                         | 0507395              |
| CAKI-1           | NCI-Frederick Cancer DCTD Tumor/Cell Line Repository                         | 0507830              |
| CCRF-CEM         | NCI-Frederick Cancer DCTD Tumor/Cell Line Repository                         | 0507624              |
| COLO 205         | NCI-Frederick Cancer DCTD Tumor/Cell Line Repository                         | 0507653              |
| COLO-206F        | Leibniz-Institut DSMZ-Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen | ACC-21               |
| DAUDI            | ATCC (American Type Culture Collection)                                      | CCL-213              |
| DU-145           | NCI-Frederick Cancer DCTD Tumor/Cell Line Repository                         | 0507657              |
| EKVX             | NCI-Frederick Cancer DCTD Tumor/Cell Line Repository                         | 0507838              |
| EL-4             | ATCC (American Type Culture Collection)                                      | TIB-39               |
| H226             | NCI-Frederick Cancer DCTD Tumor/Cell Line Repository                         | 0507621              |
| H322M            | NCI-Frederick Cancer DCTD Tumor/Cell Line Repository                         | 0507702              |
| H460             | NCI-Frederick Cancer DCTD Tumor/Cell Line Repository                         | 0507705              |
| H522             | NCI-Frederick Cancer DCTD Tumor/Cell Line Repository                         | 0507392              |
| HCC2998          | NCI-Frederick Cancer DCTD Tumor/Cell Line Repository                         | 0507630              |
| HCC78            | ATCC (American Type Culture Collection)                                      | CRL-2868             |
| HCT 116          | NCI-Frederick Cancer DCTD Tumor/Cell Line Repository                         | 0507661              |
| HCT-15           | NCI-Frederick Cancer DCTD Tumor/Cell Line Repository                         | 0507618              |
| HDLM-3           | NeoBiotechnologies                                                           |                      |
| HEK293           | ATCC (American Type Culture Collection)                                      | CRL-1573             |
| HeLa             | ATCC (American Type Culture Collection)                                      | CCL-2                |
| HEP-G2           | ATCC (American Type Culture Collection)                                      | HB-8065              |
| HL-60(TB)        | NCI-Frederick Cancer DCTD Tumor/Cell Line Repository                         | 0507610              |
| HOP62            | NCI-Frederick Cancer DCTD Tumor/Cell Line Repository                         | 0507343              |
| HOP92            | NCI-Frederick Cancer DCTD Tumor/Cell Line Repository                         | 0507452              |
| HS-578T          | NCI-Frederick Cancer DCTD Tumor/Cell Line Repository                         | 0507834              |



|             |                                                                              |          |
|-------------|------------------------------------------------------------------------------|----------|
| HT29        | NCI-Frederick Cancer DCTD Tumor/Cell Line Repository                         | 0507605  |
| IGR OV1     | NCI-Frederick Cancer DCTD Tumor/Cell Line Repository                         | 0507654  |
| JEG3        | ATCC (American Type Culture Collection)                                      | HTB-36   |
| Jurkat      | Leibniz-Institut DSMZ-Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen | ACC-282  |
| K-562       | NCI-Frederick Cancer DCTD Tumor/Cell Line Repository                         | 0507669  |
| LNCap       | Leibniz-Institut DSMZ-Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen | ACC-256  |
| LOX IMVI    | NCI-Frederick Cancer DCTD Tumor/Cell Line Repository                         | 0507376  |
| LS174T      | ATCC (American Type Culture Collection)                                      | CL-188   |
| M14         | NCI-Frederick Cancer DCTD Tumor/Cell Line Repository                         | 0507468  |
| MALME 3M    | NCI-Frederick Cancer DCTD Tumor/Cell Line Repository                         | 0507633  |
| MCF-7       | NCI-Frederick Cancer DCTD Tumor/Cell Line Repository                         | 0507778  |
| MDA-MB-231  | NCI-Frederick Cancer DCTD Tumor/Cell Line Repository                         | 0507354  |
| MDA-MB-435  | NCI-Frederick Cancer DCTD Tumor/Cell Line Repository                         | 0507379  |
| MDA-MB-453  | ATCC (American Type Culture Collection)                                      | HTB-131  |
| MDA-MB-468  | NCI-Frederick Cancer DCTD Tumor/Cell Line Repository                         | 0507785  |
| MIA PaCa-2  | ATCC (American Type Culture Collection)                                      | CRL-1420 |
| MOLT-4      | NCI-Frederick Cancer DCTD Tumor/Cell Line Repository                         | 0507472  |
| NCI-H23     | NCI-Frederick Cancer DCTD Tumor/Cell Line Repository                         | 0507817  |
| NCI/ADR-RES | NCI-Frederick Cancer DCTD Tumor/Cell Line Repository                         | 0507386  |
| OVCAR-3     | NCI-Frederick Cancer DCTD Tumor/Cell Line Repository                         | 0507710  |
| OVCAR-4     | NCI-Frederick Cancer DCTD Tumor/Cell Line Repository                         | 0507674  |
| OVCAR-5     | NCI-Frederick Cancer DCTD Tumor/Cell Line Repository                         | 0507678  |
| OVCAR-8     | NCI-Frederick Cancer DCTD Tumor/Cell Line Repository                         | 507714   |
| PC-3        | NCI-Frederick Cancer DCTD Tumor/Cell Line Repository                         | 0507358  |
| Raji        | ATCC (American Type Culture Collection)                                      | CCL-86   |
| RAW         | ATCC (American Type Culture Collection)                                      | TIB-71   |
| RD-ES       | ATCC (American Type Culture Collection)                                      | HTB-166  |
| Rh-30       | ATCC (American Type Culture Collection)                                      | CRL-2061 |
| RPMI 8226   | NCI-Frederick Cancer DCTD Tumor/Cell Line Repository                         | 0507641  |
| RPMI-6410   | NeoBiotechnologies                                                           |          |
| RXF 393     | NCI-Frederick Cancer DCTD Tumor/Cell Line Repository                         | 0507682  |
| SCCL-MT1    | NeoBiotechnologies                                                           |          |
| SEM-1       | NeoBiotechnologies                                                           |          |

|           |                                                      |          |
|-----------|------------------------------------------------------|----------|
| SF-268    | NCI-Frederick Cancer DCTD Tumor/Cell Line Repository | 0507457  |
| SF-295    | NCI-Frederick Cancer DCTD Tumor/Cell Line Repository | 0507442  |
| SF-539    | NCI-Frederick Cancer DCTD Tumor/Cell Line Repository | 0507438  |
| SIHA      | ATCC (American Type Culture Collection)              | HTB-35   |
| SK-BR-3   | ATCC (American Type Culture Collection)              | HTB-30   |
| SK-MEL-2  | NCI-Frederick Cancer DCTD Tumor/Cell Line Repository | 0507685  |
| SK-MEL-28 | NCI-Frederick Cancer DCTD Tumor/Cell Line Repository | 0507400  |
| SK-MEL-5  | NCI-Frederick Cancer DCTD Tumor/Cell Line Repository | 0507790  |
| SK-OV-3   | NCI-Frederick Cancer DCTD Tumor/Cell Line Repository | 0507718  |
| SN12C     | NCI-Frederick Cancer DCTD Tumor/Cell Line Repository | 0507689  |
| SNB-19    | NCI-Frederick Cancer DCTD Tumor/Cell Line Repository | 0507422  |
| SNB-75    | NCI-Frederick Cancer DCTD Tumor/Cell Line Repository | 0507821  |
| SR        | NCI-Frederick Cancer DCTD Tumor/Cell Line Repository | 0507692  |
| SW-1045   | NeoBiotechnologies                                   |          |
| SW-13     | ATCC (American Type Culture Collection)              | CCL-105  |
| SW-1353   | ATCC (American Type Culture Collection)              | HTB-94   |
| SW-1503   | NeoBiotechnologies                                   |          |
| SW-1949   | NeoBiotechnologies                                   |          |
| SW-1961   | NeoBiotechnologies                                   |          |
| SW-2224   | NeoBiotechnologies                                   |          |
| SW-451    | NeoBiotechnologies                                   |          |
| SW-579    | ATCC (American Type Culture Collection)              | HTB-107  |
| SW-608    | NeoBiotechnologies                                   |          |
| SW-620    | NCI-Frederick Cancer DCTD Tumor/Cell Line Repository | 0507425  |
| SW-707    | NeoBiotechnologies                                   |          |
| SW-732    | NeoBiotechnologies                                   |          |
| SW-756    | ATCC (American Type Culture Collection)              | CRL-3584 |
| SW-780    | ATCC (American Type Culture Collection)              | CRL-2169 |
| SW-80     | NeoBiotechnologies                                   |          |
| SW-872    | ATCC (American Type Culture Collection)              | HTB-92   |
| T47-D     | NCI-Frederick Cancer DCTD Tumor/Cell Line Repository | 0507416  |
| T98 G     | ATCC (American Type Culture Collection)              | CRL-1690 |
| THP1      | ATCC (American Type Culture Collection)              | TIB-202  |
| TK10      | NCI-Frederick Cancer DCTD Tumor/Cell Line Repository | 0507638  |

|            |                                                           |          |
|------------|-----------------------------------------------------------|----------|
| U251       | NCI-Frederick Cancer DCTD Tumor/Cell Line Repository      | 0507414  |
| UACC-257   | NCI-Frederick Cancer DCTD Tumor/Cell Line Repository      | 0507431  |
| UACC-62    | NCI-Frederick Cancer DCTD Tumor/Cell Line Repository      | 0507384  |
| UO 31      | NCI-Frederick Cancer DCTD Tumor/Cell Line Repository      | 0507697  |
| X63AG8.653 | Deutsche Sammlung für Mikroorganismen und Zellkultur GmbH | ACC 43   |
| ZR-75      | ATCC (American Type Culture Collection)                   | CRL-1500 |

### 2.1.5 Antikörper

| Antikörper            | Hersteller | Produktnummer |
|-----------------------|------------|---------------|
| ACE2                  | MSVA       | MSVA-919R     |
| AIF1                  | MSVA       | MSVA-955M     |
| Androgen Receptor     | MSVA       | MSVA-367R     |
| Arginase-1 / ARG1     | MSVA       | MSVA-511R     |
| Caldesmon, HMW        | MSVA       | MSVA-538R     |
| Calponin-1            | MSVA       | MSVA-455R     |
| Carboxypeptidase 1    | MSVA       | MSVA-601M     |
| CD163                 | MSVA       | MSVA-163M     |
| CD1a                  | MSVA       | MSVA-001M     |
| CD20 / MS4A1          | MSVA       | MSVA-020R     |
| CD22                  | MSVA       | MSVA-022R     |
| CD23 / FCER2          | MSVA       | MSVA-023M     |
| CD27                  | MSVA       | MSVA-027M     |
| CD274 / PD-L1 / B7-H1 | MSVA       | MSVA-711R     |
| CD31 / PECAM1         | MSVA       | MSVA-031M     |
| CD34                  | MSVA       | MSVA-034R     |
| CD3e                  | MSVA       | MSVA-003R     |
| CD4                   | MSVA       | MSVA-004R     |
| CD45                  | MSVA       | MSVA-045R     |
| CD45RA                | MSVA       | MSVA-472M     |
| CD5                   | MSVA       | MSVA-005R     |
| CD7                   | MSVA       | MSVA-007R     |
| CD99                  | MSVA       | MSVA-099R     |
| CDH17                 | MSVA       | MSVA-517M     |
| CEA                   | MSVA       | MSVA-465R     |
| CELA3B                | MSVA       | MSVA-410M     |
| Chromogranin A        | MSVA       | MSVA-380R     |

|                          |      |            |
|--------------------------|------|------------|
| Collagen IV              | MSVA | MSVA-704R  |
| CTLA-4 / CD152           | MSVA | MSVA-152R  |
| Cystatin A / CSTA        | MSVA | MSVA-461M  |
| Cytokeratin 10           | MSVA | MSVA-610M  |
| Cytokeratin 13           | MSVA | MSVA-613M  |
| Cytokeratin 14           | MSVA | MSVA-614R  |
| Cytokeratin 15           | MSVA | MSVA-615M  |
| Cytokeratin 18           | MSVA | MSVA-618R  |
| Cytokeratin 19           | MSVA | MSVA-119M  |
| Cytokeratin 20           | MSVA | MSVA-620R  |
| Cytokeratin 5            | MSVA | MSVA-605M  |
| Cytokeratin 6            | MSVA | MSVA-606R  |
| Cytokeratin 7            | MSVA | MSVA-607R  |
| Desmin                   | MSVA | MSVA-651M  |
| Desmoglein 3             | MSVA | MSVA-543M  |
| DOG-1                    | MSVA | MSVA-201M  |
| Elastin                  | MSVA | MSVA-648R  |
| EpCAM / CD326            | MSVA | MSVA-326R  |
| Estrogen Receptor / ESR1 | MSVA | MSVA-564R  |
| FABP1                    | MSVA | MSVA-501M  |
| FABP4                    | MSVA | MSVA-504M  |
| Factor XIIIa             | MSVA | MSVA-813R  |
| GATA-3                   | MSVA | MSVA-450M  |
| GFAP                     | MSVA | MSVA-522M  |
| GLUT1                    | MSVA | MSVA-401R  |
| GP2 / ZAP-75             | MSVA | MSVA-475M  |
| Growth Hormone (GH)      | MSVA | MSVA-405M  |
| HER-2 / CD340            | MSVA | MSVA-340R  |
| HLA-DRA                  | MSVA | MSVA-470R  |
| Inhibin, alpha           | MSVA | MSVA-561R  |
| INI-1                    | MSVA | MSVA-520M  |
| INSM1                    | MSVA | MSVA-456R  |
| Ki67                     | MSVA | MSVA-267M  |
| Mammaglobin              | MSVA | MSVA-457R  |
| MART-1 / Melan-A         | MSVA | MSVA-900M- |
| MCM3                     | MSVA | MSVA-503M  |
| MCM7                     | MSVA | MSVA-507R  |

|                                                  |         |             |
|--------------------------------------------------|---------|-------------|
| Melan-A +                                        | MSVA    | MSVA-900M+  |
| Mesothelin                                       | MSVA    | MSVA-235M   |
| MSH2                                             | MSVA    | MSVA-902M   |
| MSH6                                             | MSVA    | MSVA-906R   |
| MUC1                                             | MSVA    | MSVA-672R   |
| MUC5AC / Mucin 5AC                               | MSVA    | MSVA-109M   |
| MUC6 / Mucin 6                                   | MSVA    | MSVA-806R   |
| Murines CD20                                     | Abcam   | ab64088     |
| Murines CD3                                      | Abcam   | ab6669      |
| Myelin Basic Protein                             | MSVA    | MSVA-390R   |
| Myeloperoxidase / MPO                            | MSVA    | MSVA-692M   |
| MyoD1                                            | MSVA    | MSVA-801R   |
| Myosin                                           | MSVA    | MSVA-375R   |
| Myosin H11                                       | MSVA    | MSVA-375R   |
| Napsin A                                         | MSVA    | MSVA-112R   |
| Nucleolin                                        | MSVA    | MSVA-623R   |
| P16INK4a                                         | MSVA    | MSVA-016R   |
| Pan-Cytokeratin                                  | MSVA    | MSVA-000R   |
| PAPP-A                                           | MSVA    | MSVA-780M   |
| Parathyroid Hormone                              | MSVA    | MSVA-525R   |
| Periostin                                        | MSVA    | MSVA-649M   |
| Peroxidase-AffiniPure Goat Anti-Mouse IgG (H+L)  | Dianova | 115-035-062 |
| Peroxidase-AffiniPure Goat Anti-Rabbit IgG (H+L) | Dianova | 111-035-045 |
| pgp9.5                                           | MSVA    | MSVA-905R   |
| PLAP                                             | MSVA    | MSVA-350R   |
| Progesterone Receptor                            | MSVA    | MSVA-570R   |
| PSAP                                             | MSVA    | MSVA-452M   |
| S100B                                            | MSVA    | MSVA-490R   |
| S100P                                            | MSVA    | MSVA-480R   |
| SATB2                                            | MSVA    | MSVA-702R   |
| SOX9                                             | MSVA    | MSVA-709R   |
| Synaptophysin                                    | MSVA    | MSVA-462R   |
| TACSTD2 / TROP2                                  | MSVA    | MSVA-733R   |
| TdT                                              | MSVA    | MSVA-453R   |
| Thyroglobulin                                    | MSVA    | MSVA-189R   |
| TIM3 / HAVCR2 / CD366                            | MSVA    | MSVA-366R   |
| Topoisomerase IIa                                | MSVA    | MSVA-802R   |

|                |       |           |
|----------------|-------|-----------|
| TRIM29         | MSVA  | MSVA-629M |
| Tubulin, alpha | Abcam | Ab4074    |
| Uroplakin 1A   | MSVA  | MSVA-735M |
| Uroplakin 1B   | MSVA  | MSVA-734M |
| Villin         | MSVA  | MSVA-459R |
| Vimentin       | MSVA  | MSVA-458R |
| vWF            | MSVA  | MSVA-521R |

#### 2.1.6 Kits

| <b>Kit</b>                                            | <b>Hersteller</b>        | <b>Produktnummer</b> |
|-------------------------------------------------------|--------------------------|----------------------|
| ClonaCell-HY                                          | STEMCELL<br>Technologies | # 03800              |
| JetPEI                                                | Poylplus                 | 101-40N              |
| NucleoBond BAC 100                                    | Macherey-Nagel           | 740579               |
| Pierce™ BCA Protein Assay Kits                        | Thermo Scientific        | 23225                |
| Qubit™ Protein und Protein Broad Range (BR) Assay-Kit | Invitrogen               | Q33211               |
| Qubit™ RNA High Sensitivity (HS) Assay-Kit            | Invitrogen               | Q32852               |
| RNeasy DSP FFPE Kit                                   | Qiagen                   | 73604                |

### 2.1.7 Verbrauchsmaterial

| <b>Verbrauchsmaterial</b>                                | <b>Hersteller</b>       | <b>Produktnummer</b> |
|----------------------------------------------------------|-------------------------|----------------------|
| 3-Layer Zellkulturflaschen                               | Thermofisher Scientific | 132867               |
| 96-Well Zellkulturplatten                                | Corning                 | 3369                 |
| CryoPure Gefäß 1,6 mL                                    | Sarstedt                | 72.380               |
| Injekt-F 5 mL Spritzen                                   | BRAUN                   | 9166017V             |
| Multiply-µStrip Pro 8er Kette<br>Reaktionsgefäß (0,5mL)  | Sarstedt                | 72.991.002           |
| Nunc Behandelte TripleFlask,<br>Filterkappe              | Thermofisher Scientific | 132925               |
| Nunclon Delta Surface T175<br>Zellkulturflasche          | Thermofisher Scientific | 178883               |
| Pasteurpipetten 10 mL                                    | Sarstedt                | 86.1254.001          |
| Pasteurpipetten 25 mL                                    | Sarstedt                | 86.1685.001          |
| Pasteurpipetten 5 mL                                     | Sarstedt                | 86.1253.001          |
| Pasteurpipetten 50 mL                                    | Sarstedt                | 86.1256.001          |
| Pipettenspitzen (0,5-10 µL)                              | Sarstedt                | 70.3010.210          |
| Pipettenspitzen (0,5-10 µL) mit Filter                   | Sarstedt                | 70.3010.265          |
| Pipettenspitzen (100-1000 µL)                            | Sarstedt                | 70.3050.110          |
| Pipettenspitzen (20-200 µL)                              | Sarstedt                | 70.3030.110          |
| Pipettenspitzen (20-200 µL) mit<br>Filter                | Sarstedt                | 70.3030.255          |
| Qubit assay tubes                                        | Invitrogen              | Q32856               |
| Reaktionsgefäße (15 mL)                                  | Greiner                 | 188 271-N            |
| Reaktionsgefäße (50 mL)                                  | Greiner                 | 227 261              |
| Reaktionsgefäße (0,5 mL)                                 | Eppendorf               | 72.704               |
| Reaktionsgefäße (1,5 mL)                                 | Sarstedt                | 72.706.400           |
| Reaktionsgefäße (2 mL)                                   | Sarstedt                | 72.695.500           |
| Sterican Injektionskanülen, 0,34x13<br>mm, Gr. 26, braun | BRAUN                   | 4657683              |
| Sterican Injektionskanülen, 0,55x25<br>mm, Gr. 17, lila  | BRAUN                   | 4657675              |
| SurePAGE™, Bis-Tris, 10x8, 4-20 %,<br>12 wells           | GenScript               | M00656               |

|                                                    |          |             |
|----------------------------------------------------|----------|-------------|
| Trans-Blot Turbo, Mini Format, 0,2 uM Nitrocelluse | BioRad   | 1704158     |
| Zellkulturplatten 10 cm                            | Sarstedt | 83.3902.500 |
| Zellkulturplatten 15 cm                            | Sarstedt | 833.903.300 |

### 2.1.8 Geräte

| Gerät                           | Hersteller          | Produktnummer           |
|---------------------------------|---------------------|-------------------------|
| Autoklav Systek 2540EL          | Systek              | 4656                    |
| ChemiDoc Imaging System         | BioRad              | 12003153                |
| Handheld Homogenizer            | Benchmark           | D1000                   |
| Heracell™ 240i CO2 Incubator    | Hera                | 51032875                |
| HeraSafe Werkbank               | Heraeus             | 2025 BC                 |
| Inkubator                       | Binder              | BD115                   |
| NanoDrop                        | NanoDrop            | ND-1000                 |
| Primus 96 Plus Thermocycler     | MWG-Biotech         | 16800                   |
| Qubit 3                         | Invitrogen          | Q33216                  |
| Tecan Infinite F50 Plate Reader | Tecan               | TCAT91000001            |
| ThermoMixer C                   | Eppendorf           | 5382000015              |
| Thermomixer compact             | Eppendorf           | 5360000038              |
| Tissue-Tek Coverslipper         | Sakura              | 4740                    |
| Vacusaft Absaugpumpe            | Integra             | 158 310                 |
| Vert.A1 Mikroskop               | Zeiss               | 431030-9010-000         |
| Wasserbad                       | GFL                 | 1103                    |
| Zählhammer Fluidlab R-300       | anvajo              | R-300                   |
| Zählkammer Cellometer Auto T4   | Nexcelom Bioscience | Cellometer Auto T4-IQOQ |
| Zentrifuge                      | Eppendorf           | 5804-R                  |

### 2.1.9 Software

| Software                 | Hersteller    |
|--------------------------|---------------|
| Office                   | Microsoft     |
| ImageJ                   | Wayne Rasband |
| i-control                | Tecan         |
| Image Lab Touch Software | BioRad        |
| Aperio eSlide Manager    | Leica         |



## 2.2 Methoden

### 2.2.1 Immunisierung Mäuse

Zur Generierung monoklonaler Antikörper gegen das Zielprotein werden Mäuse mit ausgewählten Peptidsequenzen, welche potentiell gute Epitope für Antikörper darstellen, immunisiert. Hierfür wurde der BALB/c Mausstamm verwendet, welche gemäß der üblichen Tierhaltungsvorschriften gehalten wurden. Zur Immunisierung wurden weibliche Mäuse im Alter von 6-10 Wochen verwendet, welche nach einer initialen Eingewöhnungsphase von 2 Wochen in das Experiment eingetreten sind.

Hierfür werden zunächst die Immunisierungslösung hergestellt, indem je 25 µL jedes Peptids, 15µL CpG-Lösung und 250 µL inkomplettes Freund'sches Adjuvants mit PBS auf 540 µL aufgefüllt wurden. Mit dieser Lösung wurden die Mäuse immunisiert indem 150 µL der Lösung in den Bauchraum (intraperitoneal, i.p.) injiziert, sowie 150 µL unter die Haut gespritzt (subcutan, s.c.) wurden. Anschließend wurden die Mäuse auf Wärmeplatten für eine bessere Regeneration mehr als 30 min beobachtet. Nach etwa 4 und 8 Wochen fand jeweils ein Boost der Mäuse statt, hierbei wurden je 20 µL jedes Peptids mit 12 µL CpG mit PBS auf 400 µL aufgefüllt und davon 150 µL i.p. und 150 µL sc. injiziert. Auch hier wurden die Mäuse auf der Wärmeplatte für mehrere Stunden regelmäßig auf mögliche Reaktionen beobachtet. Drei Tage nach dem zweiten Boost wurden die Mäuse getötet und Milz sowie Herzblut für die Fusion entnommen.

### 2.2.2 Fusionierung

Zur Gewinnung von kontinuierlich Antikörper-produzierenden B-Lymphozyten werden die Milzen der immunisierten Mäuse mit immortalen Myeloma-Zellen chemisch fusioniert, sodass immortale Antikörper-produzierende Hybridoma-Zellen entstehen. Diese immortalen Zellen können im Anschluss auf die Spezifität und Selektivität der produzierten Antikörper analysiert werden. Es verbleiben so nach der Selektion Hybridoma-Zellen mit hoch selektiver und spezifischer Antikörperproduktion, welche zur Antikörperproduktion im großen Stil verwendet werden können.

Zunächst wurde die entnommene Milz mit PBS gewaschen, mit einer Schere angeschnitten und durch ein Sieb in 10 mL Basismedium püriert. Die Konzentration der entstandenen Milzzell-Suspension wurde mit einem Aliquot von 20 µL bestimmt. Als nächstes wurden die Myelomazellen abgeerntet und die Zellzahl bestimmt, um die benötigten Zellvolumina beider Zelltypen für ein Verhältnis von 1:3 von Myelomazellen zu Milzzellen zu berechnen und in zwei 50 mL Falcons zu erstellen. Nach der Zusammengabe beider Zelltypen im 1:3-Verhältnis wurde die Suspension bei 1.600 rpm für 5 Minuten zentrifugiert und der Überstand abgenommen. Dem Zellpellet wurde 1 mL PEG pro Falcon zugegeben, mit einem Glasstab verrührt und für 1,5 Minuten unter schwenken inkubiert. Anschließend wurden je 100 µL Medium unter ständigem Schwenken in folgenden Abständen zugegeben: 3x alle 20 Sekunden, 4x alle 15 Sekunden, 6x alle 10 Sekunden, 12x alle 5 Sekunden. Anschließend wurde die Suspension mit HAT-Selektionsmedium aufgefüllt und auf 96 Well-Platten mit je 220 µL Suspension pro Well verteilt.

### 2.2.3 ELISA-Testung zur Antikörperproduktion

Zur Evaluierung der Funktionalität und Produktion von Antikörper durch die Hybridomazellen wird etwa zwei Wochen nach der Fusionierung mittels eines enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA-Assay) auf eine vorhandene Antikörperproduktion getestet.

Hierzu wurden die Platten nach der Fusion zunächst für 10 Tage inkubiert, anschließend wurde das Medium entfernt und neues HAT-Selektionsmedium hinzugegeben. 3 Tage nach dem Mediumwechsel wurden 50 µL des Mediums entnommen und auf zuvor vorbereitete ELISA-Platten gegeben. Diese Platten wurden zuvor als erstes mit Avidin (1:100 in Carbonatpuffer, pH9,6) über Nacht beschichtet, am nächsten Tag mit PBST gewaschen und anschließend wurde das biotinylierte Zielpeptid (in 5 % FCS in PBST) mittels seines Biotin-Links bei einer

Inkubation von 45-60 Min an die Platte angebunden. Die Platte wurde gewaschen und mittels 5 % FCS (in PBST) für 45-60 min blockiert. Am Tag des ELISAs wurden 50 µL Medium jedes Fusionswells, sowie eine positiv (Herzblutserum in 5 % FCS/PBST) und negativ (5 % FCS/PBST) Kontrolle in ein Well der ELISA-Platte gegeben und für 40-60 Minuten inkubiert. Anschließend wurde ein sekundärer Antikörper Ziege-anti-Maus-IgG-FC 1:1000 (in 5 % FCS/PBS) nach dem Waschen der Platten zugegeben, der sekundäre Antikörper wurde 45-60 Minuten inkubiert und die Platten gewaschen. Das Detektionsreagenz wurde im nächsten Schritt erstellt (1:5 in H<sub>2</sub>O) und 70 µL davon in jedes Well der ELISA-Platte gegeben. Die Absorption des Farbumschlags wurde mittels kolorimetrischer Messung bei 650 nm erfasst und die Intensität der Wells in Relation zur Positiv- und Negativkontrolle bestimmt. Wells von Klonen mit Absorptionswerten oberhalb eines festgelegten Schwellenwerts wurden als Antikörperproduzierend kategorisiert und für weitere Testung mittels Immunhistochemie verwendet.

#### 2.2.4 IHC-Testung zur Antikörperproduktion

Für die monoklonale Antikörperproduktion via Hybridomazellen ist nicht nur wichtig, dass die Hybridomazellen Antikörper produzieren; die produzierten Antikörper sollten auch spezifisch, selektiv und im besten Falle besser als kommerzielle Antikörper sein. Diese Eigenschaften der erstellten Antikörper werden durch eine immunhistologische Färbung an Gewebeschnitten getestet.

Hierzu wurde aus allen Wells der Fusionierung welche Hybridomazellen mit Antikörperproduktion, das heißt mit ELISA-Werten oberhalb des Schwellenwerts, 120 µL des Mediums abgenommen und als primärer Antikörper auf Gewebeschnitten verwendet. Hierbei wurden Microarrays mit Gewebeproben verschiedenen humanen Organen in 2,5 µm Dicke geschnitten, auf Objektträger gebracht und über Nacht bei 37 °C gelagert, um den Schnitt auf dem Objektträger zu fixieren. Am nächsten Tag wurden die Schnitte durch Inkubation für 2x 5 min in Xylol und gewässert durch Inkubation für je 2x 3 min in 100 %, 96 %, 80 % und 70 % Ethanol entparaffiniert. Anschließend wurde das Antigen Retrieval durch Lagerung der Schnitte für 10 min bei 121 °C im Autoklaven in Citratpuffer (für Antikörper entsprechender pH von pH 6, pH 7,8 oder pH 9,) gelagert um die Epitope der Gewebe frei zu legen. Nach dem Abkühlen wurden die Schnitte dreimal mit Wasser gespült und für 5 min in TBST gewaschen. Anschließend wurden endogene Peroxidasen durch Inkubation für 10 min in Wasserstoffperoxid geblockt, im nächsten Schritt wurde der Überstand der Hybridomazellen

in entsprechender Verdünnung in IHC-Puffer auf die Schnitte gegeben und für 60 min bei 37 °C gelagert. Nach der Inkubation wurden die Schnitte dreimal für je 5 Minuten in TBST gewaschen und anschließend für 60 Minuten in Maus- und Hase- spezifischem sekundärem Antikörper mit angekoppeltem HRP gelagert. Nach der Inkubation wurden die Schnitte wieder dreimal je 5 Minuten in TBST gewaschen und für 10 Minuten in das DAB-Substrat (DAB-Lösung 1:50 in DAB-Puffer) zur kolorimetrischen Detektion des HRP-gekoppelten sekundären Antikörpers inkubiert. Anschließend wurden die Schnitte in Wasser gewaschen und für 15 Sekunden in Haematoxilin nach Mayer zur Anfärbung der Zellkerne inkubiert. Danach wurde direkt mit fließendem Leitungswasser für 15 Sekunden gegen gefärbt. Durch eine aufsteigende Alkoholreihe wurden die Schnitte nun wieder entwässert und mit Folie für eine langfristige Lagerung überdeckt. Die Schnitte wurden eingescannt und nach solchen Wells der Hybridomazellen analysiert, bei welchen die zu erwartende spezifische Färbung durch die Antikörper im Zellüberstand aus dem Well in den entsprechenden Organen vorhanden ist. Gegebenenfalls wurde eine Wiederholung der Färbung in anderer Verdünnung zur besseren Analyse der Spezifität und Sensitivität durchgeführt.

### 2.2.5 Subklonierung

Nach der Erstellung der Hybridomazellen durch Fusion von B-Lymphozyten mit Lymphomazellen wurden die entstandenen Zellen in 96-Well Platten ausgesät. Jedoch ist es wahrscheinlich, dass in den Wells auch nach der Selektion mehr als eine Hybridomazelle und somit Ursprungszelle für einen Antikörper-Klon enthalten sind. Um eine Monoklonalität der Antikörper zu erreichen, müssen daher im nächsten Schritt die überlebenden Hybridomazellen durch Verdünnungsreihen so ausgesät werden, dass statistisch gesehen in jedem Well der Zellkulturplatte maximal eine Hybridomazelle enthalten ist. Diese eine Hybridomazelle wird Ursprung eines monoklonalen Hybridomazell-Klons, wovon alle Zellen den gleichen monoklonalen Antikörper produzieren.

Nach einer positiven Rückmeldung der IHC-Färbeeigenschaften der Klone wurde ein erneuter ELISA-Assay durchgeführt um die Klone zu finden, welche sowohl immer noch ELISA-positiv sind (ein Verlust der Antikörper- produzierende Eigenschaften ist möglich) als auch IHC-positiv sind. Wells mit ELISA- und IHC- positiven Zellen wurden bei ausreichender Zellzahl im Well (>50 Zellen pro Well) die Hybridomazellen mit einer Pipette aufgewirbelt und ein Aliquot zur Zellzählung verwendet. Anhand der Zellkonzentration wurde das benötigte Volumen berechnet um pro Well einer 96- Well Platte 0,5 Zellen, 1 Zelle oder 2 Zellen auszusäen.

Für eine erneute ELISA-Austestung der Klone wurde das Medium 3 Tage vor Abnahme des Überstands das Medium gewechselt, am Tag des ELISAs wurde das Protokoll für ELISA wiederholt (siehe oben) und Wells mit den höchsten ELISA-Werten in Relation zur Zellzahl wurden für eine erneute Subklonierung ausgewählt. Die Ursprungsplatte blieb erhalten, jedoch wurde die neue Subklonierungsplatte nun für ELISA und weitere Subklonierungen verwendet. Bei ELISA-Werte für Hybridomaklone welche relativ hoch bei einem relativ kleinen Klon (100 % Klon) waren, wurden die drei besten Klone auf je ein Well eine 24- Well Platte zur Anzucht verteilt. Erreichen die Wells in der folgenden Konfluenz, wurden die Zellen auf die nächsten freien Wells 1:1 verteilt –für den besten Klon für 8 Wells, für den zweit und dritt besten Klon für je 4 Wells. Waren alle 8 Wells des besten Klons mit Zellen gefüllt, wurden alle Zellen gemeinsam in eine T175 Zellkulturflasche überführt – die 4 Wells des zweit und dritt besten Klons wurden als Backup weg gefroren. Die T175 Flasche konnte, falls erwünscht, im Folgenden zur Antikörperproduktion weiterverwendet werden, Überstände wurden mit 0,1 % Natriumazid bei 4 °C gelagert.

### 2.2.6 B-Zell Panning

Um B-Lymphozyten anzureichern wurde ein B-Zell Panning durchgeführt. Hierbei werden solche B-Lymphozyten, welche Antikörper spezifisch für das gewünschte Zielprotein produzieren, auf eine Platte gegeben, an der das Antigen angebunden wurde. Das biotinylierte Zielpeptid/Antigen wurde mittels Avidin an einer Platte fixiert und die B-Lymphozyten, welche Antikörper mit dem entsprechenden Epitop produzieren, bleiben an der Platte haften und können so als positive Selektion aus der Milzzellsuspension abgefangen werden.

Hierfür wurde zunächst eine Zellkulturschale mit Avidin (1:100 in Carbonatpuffer pH 9,6) über Nacht auf die Platte gegeben. Am nächsten Tag wurde der Überstand abgekippt und das biotinylierte Zielpeptid auf die Platte gegeben (1:100 in 5 % FCS in PBST) und über Nacht inkubiert. Der Überstand wurde am nächsten Tag verworfen und die Platte mit 5 % FCS in PBST für eine Stunde geblockt. Anschließend wurden die gewonnenen Milzzellen aus der Mäusemilz in 10 mL Basis-Medium auf die Platte gegeben und unter gelegentlichem Schwenken im Brutschrank bei 37 °C für eine Stunde inkubiert. Anschließend wurde der Überstand abgekippt und die Platte vorsichtig einmal gewaschen. Die angebundenen B-Lymphozyten wurden nun mit Medium abgespült und für die Fusion verwendet.

### 2.2.7 Semi-solid Methode

Zur Optimierung der Hybridoma-Technik wurde die semi-solid Methode entwickelt. Hierbei werden die erstellten Hybridoma-Klone nach der Fusionierung in halbfesten Zellkulturmedium inkubiert, was zu einem Organoid-förmigen Wachstum der Klone führt. Da jeder Klon zu Beginn vereinzelt vorliegt, sind die Organoid-artigen Strukturen monoklonal, sodass im weiteren Fortgang diese Struktur entnommen, vereinzelt und expandiert werden kann ohne weitere Subklonierungsschritte.

Entsprechend des Protokolls zur Semi-solid Hybridoma-Kits der Fima Stemcell wurden zunächst die Myeloma-Zellen in ClonaCell-HY Medium A angezogen und für mindestens 1 Woche in diesem Medium inkubiert. Zur Verwendung wurden die Zellen wie zuvor beschrieben abgelöst und in Medium B resuspendiert, auch die Milzzellen der Mäuse wurden in diesem Medium B resuspendiert. Anschließend wurden die Zellen in einem Verhältnis 1:5 Myelomazellen zu Milzzellen zusammengegeben, für 10 Minuten bei 400 x g zentrifugiert und der Überstand abgenommen. Das Zellpellet wurde durch Klopfen gelöst und es wurde 1 mL ClonaCell-HY PEG tropfenweise über eine Zeit von 60 Sekunden hinzugegeben. Anschließend

wurden 4 mL Medium B hinzugegeben und die Zellsuspension für 4 Minuten gerührt. Nun wurden 10 mL des Medium B hinzugegeben und die Zellsuspension für 15 Minuten bei 37 °C inkubiert. Im nächsten Schritt wurden 30 mL Medium A hinzugegeben, die Zellen für 7 Minuten bei 400 x g zentrifugiert und der Überstand entfernt. Das Zellpellet wurde erneut in 40 mL Medium A resuspendiert und für 7 Minuten bei 400 x g zentrifugiert. Nach Abnahme des Überstands wurde das Zellpellet in 10 mL Medium C resuspendiert und in einer T-75 Zellkultur mit 20 mL Medium C für 24 Stunden bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Zellen erneut für 10 Minuten bei 400 x g zentrifugiert und in 10 mL Medium C resuspendiert. Diese Zellsuspension wurde nun in eine Zellkulturflasche mit 90 mL mit Medium D gegeben, die Flasche mehrfach invertiert und bei 37 °C für 15 Minuten inkubiert, sodass eventuelle Luftblasen nach oben steigen konnten. Anschließend wurde diese Suspension langsam in 10 cm Zellkulturplatten transferiert und für 14 Tage bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> ohne weitere Bewegung inkubiert. Nach 14 Tagen wurden potenzielle Kolonien durch eine Pasteurpipette entnommen und jeder Klon in ein einzelnes Well einer 96-Well Platte mit Medium E ausplattiert, durch auf- und abpipettieren mit einer 200µL Pipette wurden die Zellen des Klons vereinzelt. Die so erhaltenen Zellen wurden als monoklonale Zellen eines Klons verwendet und für Testungen mittels Immunhistochemie und ELISA und allen weiteren Schritten weiterverwendet.

#### 2.2.8 IHC-Färbung der Zellen aus dem Panning

Zur Evaluierung der Effizienz und Funktionalität des B-Zell Pannings wurde ein Aliquot der Zellen, welche im Panning gewonnen wurden, immunhistologisch auf das Vorhandensein von T- und B-Lymphozyten analysiert. Hierzu wurde nach dem Ablösen der Zellen aus der Panning-Schale ein Aliquot verwendet, um die Zellen mittels Zytospin auf einen Objektträger zu bringen, anschließend wurden die Zellen mittels formalinhaltigem Fixierspray fixiert. Im Folgenden wurden die erstellten Objektträger wie zuvor beschrieben mit den murinen Antikörpern gegen CD20 und CD3 in einer Verdünnung von 1:450 gefärbt (siehe 2.2.4 IHC-Testung zur Antikörperproduktion). Die gefärbten Schnitte wurden eingescannt und zur Analyse weiterverwendet.

### 2.2.9 Auswertung IHC-Scans

Zur Evaluierung der Menge an gefärbten Zellen auf den IHC-Schnitten wurden die Bilder der Schnitte mittels des Bildverarbeitungsprogramms ImageJ analysiert, adaptiert nach einem Protokoll von Christine Labno, University of Chicago, Integrated Light Microscopy Core. Hierzu wurde zunächst der Kontrast zur besseren Erkennbarkeit der einzelnen Zellen angepasst und der Hintergrund angeglichen. Im nächsten Schritt wurden positive (= braun gefärbte) Zellen per Hand durch die Funktion „Multi-point“ gezählt, hierbei wurden nur stark braun gefärbte Zellen als positiv bestimmt. Die Zählung wurde zweimal wiederholt um so situationsbedingte Beeinflussung (tageszeitbedingter Lichteinfall etc.) der Zuordnung auszugleichen. Im nächsten Schritt wurde die Gesamtzellzahl mittels der ImageJ-Funktion „Analyze Particles“ erfasst. Hierzu wurde zunächst der Kontrast angepasst, das Bild in ein 8-Bit Format umgewandelt, Hintergrundrauschen entfernt und potentiell aneinander liegende Zellen durch die Funktion „Watershed“ voneinander separiert. Mit der Funktion „analyze particles“ wurden Partikel mit einer Größe von  $\text{Pixel}^2 > 300$  automatisch von der Software detektiert und gezählt (Beispielhaftes Ergebnisbild im Anhang). Die Ergebnisse der beiden händischen Zählungen der positiven Zellen wurden gemittelt, zudem wurde der prozentuale Anteil der positiven Zellen an der Gesamtzellzahl ermittelt.



#### 2.2.10 Zellkultur

Zur Kultivierung der Myelomazelllinie X63AG8.653 wurden die Zellen in RPMI-Medium mit 5 % fötales Kälberserum, 1 % Pyruvat, 1 % Penicillin-Streptomycin und 1 % nicht-essenzielle Aminosäuren bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> kultiviert. Je nach Konfluenz der Zellkulturflaschen wurde bei geringer Konfluenz das Medium ausgewechselt bzw. aufgefüllt und bei hoher Konfluenz die Zellen gesplittet. Hierfür wurde das Medium zunächst abgegossen und der Zellrasen mit PBS gewaschen. Es wurden EDTA-Lösung (10 mL bei T175, 50 mL bei 5-Layer) hinzugegeben und die Zellen für 7 min im Brutschrank inkubiert. Anschließend wurden die Zellen abgeklopft und je nach Zellzahl eine gewisse Menge Zellsuspension entnommen. Zu den verbleibenden Zellen in der Zellkulturflasche wurde Medium hinzugegeben und die Zellen im Brutschrank inkubiert. Die entnommenen Zellen konnten für die Fusion verwendet, eingefroren oder verworfen werden. Bei einer Verwendung für die Fusion wurden die entnommenen Zellen in ein Flacon überführt und für 7 min bei 280 g zentrifugiert. Der Überstand wurde abgegossen, die Zellen in Medium resuspendiert und erneut zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, die Zellen resuspendiert und gezählt (20 µL Zellsuspension je Zählkammer) und die Zellen in Medium bis zur Fusion gelagert.

#### 2.2.11 Wegfrieren und Auftauen von Zellen

Zum Wegfrieren der Zellen wurden die Zellen wie oben beschrieben vorbereitet und aus der Zellsuspension die gewünschte Zellemenge entnommen. Die Zellsuspension wurde in ein Falcon überführt und für 7 min bei 280 g zentrifugiert. Der Überstand wurde entfernt und die Zellen in PBS resuspendiert, anschließend bei 280 g für 7 min zentrifugiert. Der Überstand wurde entfernt und die Zellen wurden in einer Lösung aus 1:10 DMSO in FCS resuspendiert und auf eine entsprechende Menge in beschriftete Kryogefäße verteilt. Die Zellen wurden anschließend bei -80 °C (kurzfristig) oder in Stickstoff (langfristig) weggefroren.

Zum Auftauen der Zellen wurde das Kryogefäß aus dem Tiefkühlschrank/Stickstofftank geholt und auf Eis zum Arbeitsbereich gebracht. Nun wurde ein Falcon mit zimmerwarmen Medium vorbereitet, dieses Medium wurde nun auf die Zellen gegeben und durch sanftes Auftauen in das Falcon überführt. Die Zellen wurden anschließend für 7 min bei 280 g zentrifugiert, der Überstand abgegossen und die Zellen in PBS resuspendiert. Die Zellsuspension wurde erneut bei 280 g für 7 Min zentrifugiert, der Überstand wurde abgekippt und die Zellen in Medium resuspendiert und in ein entsprechendes Zellkulturgefäß überführt. Die Zellen wurden im Brutschrank inkubiert und das Wachstum beobachtet.

#### 2.2.12 Generierung von Zelllinien-Blöcken

Zur Generierung eines Zelllinien-TMAs und zur Konservierung der Zellen wurden Zellen in Formalin fixiert und in Paraffin gegossen.

Hierzu wurden Zellen wie zuvor beschrieben in benötigter Menge angezüchtet, abgelöst und für 5 Minuten bei 1000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und die Zellen in PBS gewaschen. Nach erneuter Zentrifugation und Abnahme des Überstands wurden die Zellen in etwa demselben Volumen 4 % Agarose resuspendiert und als Tropfen auf Parafilm zum Aushärten pipettiert. Der ausgehärtete Tropfen wurde anschließend in eine beschriftete Kapsel gegeben und diese für 15 Minuten in Formalin zur Fixierung der Zellen gegeben. Anschließend erfolgte ein Entwässern der Zellen gemäß des „langem Kurzprogramm“ des Instituts für Pathologie: Hierzu wurden die Zellen für je 25 Minuten in 80 %, 96 % und 100 % Ethanol sowie Xylol inkubiert, anschließend wurden die Zellen für 30 Minuten in Paraffin inkubiert, bevor sie in Paraffin eingebettet wurden. Die Blöcke wurden bis zur weiteren Verwendung auf Raumtemperatur gelagert.

### 2.2.13 Erstellung des Gewebe – oder Zelllinien-Mikroarrays

Zur Erstellung eines Mikroarrays werden FFPE (Formalin-fixierte, Paraffin-eingebettete) Gewebe oder Zellen verwendet. Hier wurde ein Zelllinien-Array aus den zuvor beschriebenen Zelllinien-Blöcken erstellt.

Hierzu wurde zunächst von den erstellten Zelllinien-Blöcken je eine HE (Hämatoxylin- Eosin) Färbung zur Evaluierung der Zellzahl und -dichte durchgeführt. Bei ausreichender Zellzahl wurden 0.6 mm Stanzen aus den Blöcken der fixierten Zelllinien entnommen und in vorgefertigte Löcher in einem leeren Paraffin neu eingebracht, um von allen gewünschten Zelllinien eine Probe in dem Mikroarray vertreten zu haben (beispielhaftes Layout im Anhang Abbildung 63 und Tabelle 34). Nach Abschluss des Einbringens aller gewünschter Stanzen wurde der Paraffinblock für 60 Minuten bei 37 °C gelagert und die Stanzen an den Block angepresst. Der Block wurde bei Raumtemperatur gelagert und kann wie ein Gewebeblock durch das Mikrotom geschnitten werden.

Bei der Erstellung des Gewebe-Mikroarrays wurde in gleicher Form vorgegangen, jedoch wurden als Donormaterial FFPE-fixiertes menschliches Gewebe verwendet, ein beispielhaftes Layout hierfür ist im Anhang zu finden (Abbildung 64 und

Tabelle 35). Das Verwendete Gewebe für die Herstellung der TMAs und der potenziellen späteren Analyse der Patientendaten zu Forschungszwecken wurde durch die örtlichen Gesetze (HmbKHG, §12) und durch die örtliche Ethikkommission (Ethikkommission Hamburg, WF-049/09, 25. Januar 2010) genehmigt. Alle Ausführungen wurden in Übereinstimmung mit der Deklaration von Helsinki durchgeführt.

#### 2.2.14 Färbung von IHC-Schnitten

Proteine können in Gewebe und Zellen durch spezifische Antikörper detektiert werden. Dies geschieht durch sekundäre Antikörper, welche mit dem Meerrettichperoxidase-Enzym gekoppelt sind. Durch Zugabe des Substrats 3,3'-Diaminobenzidin (DAB) kommt es zu einem braunen Farbumschlag.

Hierzu werden zunächst Schnitte (meist 2,5 µm Dicke) von Gewebe/ Zellen/ Mikroarrays erstellt und diese über Nacht zum festbacken des Schnitts auf dem Slide bei 37 °C gelagert. Am nächsten Tag wurde zunächst durch Inkubation für zweimal 5 Minuten in Xylol der Schnitt entparaffiniert und einer absteigende Alkoholreihe (100 %, 100 %, 96 %, 80 %, 70 %) gewässert. Anschließend wurden die Schnitte zur Freilegung der Antikörper-Epitope im Gewebe/Zellen für 10 Minuten in einem Citratpuffer (entsprechend Antikörper pH6/7,8/9) bei 121 °C in einem Autoklaven erhitzt. Die Schnitte wurden dreimal mit Wasser gewaschen und 5 Minuten in TBST inkubiert. Anschließend wurden die Schnitte für 10 Minuten in 3 % H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> gelagert, um die endogene Peroxidase-Aktivität zu blockieren. Nach dreimaligem Waschen in TBST wurden die Schnitte für 60 Minuten in primären Antikörper in TBST entsprechend der spezifischen Verdünnung (siehe Tabelle 2.1.5 Antikörper) des Antikörpers bei 37 °C inkubiert. Nach der Inkubation wurden die Schnitte dreimal für je 5 Minuten in TBST gewaschen und anschließen für 60 Minuten in Maus- und Hase-spezifischem sekundärem Antikörper mit angekoppeltem HRP gelagert. Nach der Inkubation wurden die Schnitte wieder dreimal je 5 Minuten in TBST gewaschen und für 10 Minuten in der DAB-Lösung (DAB-Lösung 1:50 in DAB-Puffer) inkubiert. Anschließend wurden die Schnitte in Wasser gewaschen und für 15 Sekunden in Haematoxilin nach Mayer inkubiert. Danach wurde direkt mit fließendem Leitungswasser für 15 Sekunden gegen gefärbt. Durch eine aufsteigende Alkoholreihe wurden die Schnitte nun wieder entwässert und mit Folie für eine langfristige Lagerung eingedeckelt.

### 2.2.15 Stabilitätstestung von Antikörpern

Zur Evaluation der langfristigen Stabilität von Antikörpern wurden mehrere Chargen desselben Antikörpers für eine definierte Zeit unter verschiedenen Bedingungen gelagert. Anschließend wurden die gelagerten Antikörper für eine immunhistologische Färbung verwendet. Das Färbeergebnis in nach Scoring-Schema von 0-5 klassifiziert, hierbei stellt 5 die initiale stärkste Färbeintensität dar, 0 beschreibt die Abwesenheit einer spezifischen Färbung (Beispiel Abbildung 4).

Zur beschleunigten Stabilitätsmessung wurden je drei Aliquots desselben Antikörpers zunächst initial zur Färbung verwendet und anschließend für vier Wochen bei 37 °C gelagert. Parallel wurden je drei Aliquots als Kontrolle für vier Wochen bei 4 °C entsprechend der Herstellerhinweise gelagert. Nach vier Wochen wurden nun die Antikörper, gelagert bei 37 °C und bei 4 °C, für die IHC verwendet und die Färbung entsprechend des Scores klassifiziert (Tabelle 2, beschleunigte Stabilitätsmessung).

Zur Messung der Langzeitstabilität wurden drei Aliquots entsprechend der Herstellerangaben bei 4 °C gelagert für final zwei Jahre gelagert. Nach vier Wochen Lagerung, sowie nach acht Wochen, sechs Monaten, 12 Monaten, 18 Monaten und 24 Monaten wurden die Antikörper-Aliquots in der IHC verwendet und das Färbeergebnis gescort (Tabelle 2, Langzeitstabilität).

Zur Analyse der Stabilität der Antikörper unter Verwendung wurde ein Aliquots eines Antikörpers zunächst bei 37 °C für vier Wochen gelagert und anschließend für weitere vier Wochen bei Raumtemperatur. Nun wurde eine IHC-Färbung mit diesem Aliquot durchgeführt und das Färbeergebnis dem Ergebnis eines Aliquots desselben Antikörpers, welcher nach Herstellerangaben bei 4 °C gelagert wurde, verglichen (Tabelle 2, Stabilität unter Verwendung).

Für die Untersuchung der Stabilität unter Lieferbedingungen wurde der Versuch analog zur Analyse der Stabilität unter Verwendung durchgeführt, zusätzlich wurde ein weiteres Aliquots des Antikörpers für 72 Stunden bei -20 °C gelagert und das Färbeergebnis dieses Antikörpers mit dem Ergebnis der Analyse der Stabilität unter Verwendung sowie dem Kontroll-Aliquot, welches nach Herstellerangaben gelagert wurde, verglichen (Tabelle 2, Stabilität unter Transportbedingungen).

**Tabelle 2:** Tabellarische Darstellung des Versuchsablaufs zur Testung der Antikörper-Stabilität

|                                       |                  | Zeit             | T0       |               | T1      |  | T2       |         | T3       |         | T4        |         | T5        |         | T6        |
|---------------------------------------|------------------|------------------|----------|---------------|---------|--|----------|---------|----------|---------|-----------|---------|-----------|---------|-----------|
|                                       |                  |                  | 0 Wochen |               | 1 Monat |  | 2 Monate |         | 6 Monate |         | 12 Monate |         | 12 Monate |         | 18 Monate |
| beschleunigte Stabilitätsmessung      | Batch 1          | Test Aliquot     | Färbung  | 37°C          | Färbung |  |          |         |          |         |           |         |           |         |           |
|                                       |                  | Kontroll Aliquot |          | 4°C           |         |  |          |         |          |         |           |         |           |         |           |
|                                       | Batch 2          | Test Aliquot     |          | 37°C          |         |  |          |         |          |         |           |         |           |         |           |
|                                       |                  | Kontroll Aliquot |          | 4°C           |         |  |          |         |          |         |           |         |           |         |           |
|                                       | Batch 3          | Test Aliquot     |          | 37°C          |         |  |          |         |          |         |           |         |           |         |           |
|                                       |                  | Kontroll Aliquot |          | 4°C           |         |  |          |         |          |         |           |         |           |         |           |
| Langzeitstabilität                    | Batch 1          | Test Aliquot     | Färbung  | 4°C           |         |  |          | Färbung | 4°C      | Färbung | 4°C       | Färbung | 4°C       | Färbung |           |
|                                       | Batch 2          | Test Aliquot     |          | 4°C           |         |  |          |         | 4°C      |         | 4°C       |         |           |         |           |
|                                       | Batch 3          | Test Aliquot     |          | 4°C           |         |  |          |         | 4°C      |         | 4°C       |         |           |         |           |
|                                       | Kontroll Aliquot |                  |          | 4°C           |         |  |          |         | 4°C      |         | 4°C       |         |           |         |           |
| Stabilität unter Verwendung           | Batch 1          | Test Aliquot     | Färbung  | 37°C          | 4°C     |  | Färbung  |         |          |         |           |         |           |         |           |
|                                       |                  | 4°C              |          |               |         |  |          |         |          |         |           |         |           |         |           |
| Stabilität unter Transportbedingungen | Batch 1          | Test Aliquot     | Färbung  | 37°C          | 4°C     |  | Färbung  |         |          |         |           |         |           |         |           |
|                                       | Batch 2          | Test Aliquot     |          | 72h bei -20°C |         |  |          |         |          |         |           |         |           |         |           |
|                                       | Kontroll Aliquot |                  |          | 4°C           |         |  |          |         |          |         |           |         |           |         |           |

Skala der Färbeintensität:

5

4

3

2

1



**Abbildung 4:** Beispielhafte Skalierung der Färbeintensitäten der IHC-Färbungen

Hier am Beispiel von Nierengewebe gefärbt mit dem Antikörper gegen EpCAM (Intensität 5= T1, 4 Wochen auf 37°C, Charge 1, Intensität 4= T4, 12 Monate auf 4°C, Charge 1, Intensität 3= T0, Charge 1, Intensität 2= T3, 6 Monate auf 4°C, Charge 2, Intensität 1= T1, 4 Wochen auf 4°C, Charge 3).

### 2.2.16 Erstellung von Lysaten für Western Blot

Zur Analyse der Proteinexpression in Geweben und Zelllinien werden Lysate erstellt, indem die Proben durch Zell-lyisierende Puffer aufgeschlossen wurden, sodass die Proteine im Folgenden im Western Blot aufgetrennt und detektiert werden können. Hierfür wurden entweder Zellen aus der Zellkultur, gefrorene Zellen in 90 % FCS und 10 % DMSO oder gefrorene humane Gewebestücke verwendet.

Zur Erstellung von Lysaten aus Zellen wurden die Zellen zunächst, wenn nötig, aufgetaut, anschließend wurden sie in PBS resuspendiert. Die Zellen wurden bei 1.000 rpm für 5 Minuten bei Raumtemperatur zentrifugiert und der Überstand abgenommen. Nun wurden die Zellen in einer entsprechenden Menge RIPA-Puffer resuspendiert und für 15 Minuten auf Eis inkubiert. Anschließend wurden die Zellen für 10 Minuten bei 15.000 g und 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues Gefäß überführt und bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C gelagert.

Zur Erstellung von Lysaten aus gefrorenem humanem Gewebe wurde zunächst möglichst viel Fett vom Gewebe entfernt, das Gewebe gewogen und noch anhaftendes Blut durch Waschen mit PBS entfernt. Anschließend wurde das Gewebe in flüssigem Stickstoff schockgefroren und in möglichst kleine Stücke geschnitten. Das Gewebe wurde im weiteren Verlauf durch Zugabe von flüssigem Stickstoff immer gefroren gehalten. Als nächstes wurden die Gewebestücke in einem Keramikmörser zu feinem Pulver zermahlen, anschließend wurde das Pulver in ein Falcon überführt und 5 mL 5 % SDS pro Gramm Gewebe hinzugegeben. Das Gemisch wurde mit der serologischen Pipette auf- und ab-pipettiert bis sich eine zähflüssige Lösung ergeben hat, diese Lösung wurde anschließend in einen Rohrmörser überführt. Die Lösung wurde nun so lange im Rohrmörser zermahlen bis sich eine flüssige Lösung ohne Schlieren gebildet hat. Die Lösung wurde in ein Falcon transferiert und für 5 Minuten bei 95 °C erhitzt. Anschließend wurde die Lösung auf Eis bis auf Raumtemperatur abgekühlt und der Vorgang des Mörserns wiederholt, bis eine flüssige Lösung entstanden ist. Diese Lösung wurde in ein Falcon überführt und für 5 Minuten bei 10.000 x g bei 8 °C zentrifugiert, der Überstand wurde anschließend für die weitere Verwendung in ein neues Falcon transferiert. Die erstellten Proben wurden bis zur weiteren Verwendung bei 4 °C gelagert.

Alternativ wurden Gewebelysate durch einen Gewebehomogenisator erstellt. Hierzu wurde das Gewebe wie zuvor beschrieben von Fett befreit, gewaschen und in kleine Stücke zerschnitten. Anschließend wurde das Gewebe in 5 % SDS gegeben und mit dem kleinen Zylinderaufsatz gemahlen, bis das Gewebe vollständig aufgelöst war. Anschließend wurde die Probe für 5 Minuten bei 10.000 x g bei 8 °C zentrifugiert und der Überstand in ein neues Gefäß überführt. Die Probe wurde nun für 5 Minuten bei 95 °C erhitzt, anschließend wurde die Probe bei 4 °C bis zur weiteren Verwendung gelagert.



### 2.2.17 Proteinkonzentrationsbestimmung

Zur Bestimmung der Proteinmenge in einer Probe wurden zwei Methoden verwendet: einerseits wurde eine fluormetrische Quantifizierung mittels des Qubits durchgeführt, andererseits wurde eine kolorimetrische Quantifizierung mittels des BCA Protein Assays durchgeführt.

Die Konzentrationsbestimmung mittels Qubit erfolgte mit dem Qubit™ Protein und Protein Broad Range (BR) Assay-Kits. Hierzu wurde ein Mastermix aus 1:200 aus Farbstoff und Puffer erstellt und daraus die Standards #1-3 1: 20 verdünnt sowie die Proteinlysate 1: 200 verdünnt. Die erstellten Proben wurden kurz gevortext und für 2 Minuten bei Raumtemperatur in Dunkelheit inkubiert. Anschließend wurden zunächst die Standards zur Erstellung einer Eichgerade nach Geräteanweisung gemessen, anschließend wurden die Proben gemessen und die Proteinkonzentration dokumentiert.

Alternativ wurde die Proteinkonzentration mittels des BCA Protein Assays durchgeführt. Hierzu wurde zunächst eine Verdünnungsreihe entsprechend Tabelle 3 für die Eichgerade aus BSA erstellt:

**Tabelle 3:** Erstellung der Verdünnungsreihe aus BSA für den BCA-Protein Assay

| Gefäß | Volumen dH <sub>2</sub> O | Volumen BSA           | Finale Konzentration BSA<br>[in µg/mL] |
|-------|---------------------------|-----------------------|----------------------------------------|
| A     | 0 µL                      | 77,5 µL aus BSA-stock | 2000                                   |
| B     | 17,5 µL                   | 52,5 µL aus Gefäß A   | 1500                                   |
| C     | 22,5 µL                   | 45 µL aus Gefäß B     | 1000                                   |
| D     | 13,75 µL                  | 41,25 µL aus Gefäß C  | 750                                    |
| E     | 15 µL                     | 30 µL aus Gefäß D     | 500                                    |
| F     | 20 µL                     | 20 µL aus Gefäß E     | 250                                    |
| G     | 15 µL                     | 15 µL aus Gefäß F     | 125                                    |
| H     | 20 µL                     | 5 µL aus Gefäß G      | 25                                     |
| I     | 25 µL                     | 0 µL                  | 0                                      |

Als nächstes wurden die zu analysierenden Lysate in einer Verdünnungsreihe nachfolgendem Schema (Tabelle 4) verdünnt:

**Tabelle 4:** Erstellung der Verdünnungsreihe der Lysate für den BCA-Protein Assay

| Gefäß | Volumen dH <sub>2</sub> O | Volumen Proteinlysate | Verdünnung | Gesamtvolumen |
|-------|---------------------------|-----------------------|------------|---------------|
| 1     | 33,0 µL                   | 16,5 µL               | 1:3        | 49,5 µL       |
| 2     | 22,5 µL                   | 22,5 µL aus Gefäß 1   | 1:6        | 45,0 µL       |
| 3     | 9,0 µL                    | 18,0 µL aus Gefäß 2   | 1:9        | 27,0 µL       |

Anschließend wurde ein Mastermix aus Rapid Gold BCA Reagent A und Rapid Gold BCA Reagent B 50:1 erstellt und in Doppelbestimmungen je 10 µL BSA-Verdünnung bzw. Proben-Verdünnung und 200 µL Mastermix in eine 96-Well Platte gegeben. Im Anschluss wurde die Platte im Tecan Reader zunächst für 30 Sekunden geschüttelt, für 5 Minuten inkubiert und anschließend bei 492 nm mittels des i-control Programms gemessen. Die ermittelten Absorptionswerte wurden daraufhin mit Excel ausgewertet indem zunächst bei allen Werten der Blank-Wert abgezogen wurde, eine Standardkurve aus den BSA-Verdünnungen erstellt und so die Proteinkonzentration ermittelt wurde. Die Konzentration der Proben wurde dokumentiert und die Proben bis zur weiteren Verwendung gelagert.

#### 2.2.18 Western Blot

Western Blot ist eine der am häufigsten verwendeten Methoden in der Biologie und ermöglicht die Auftrennung und Detektion von spezifischen Proteinen in Zell- und Gewebelysaten. Hierzu werden die Proteine der Probe zunächst durch Elektrophorese gemäß ihres Gewichts aufgetrennt. Durch das Transferieren der Proteine auf eine Membran können diese durch spezifische Antikörper detektiert werden und das untersuchte Protein so quantitativ und qualitativ analysiert werden.

Aus den zuvor erstellten Lysaten wurden die Proben auf die gewünschte Konzentration von 30 µg Protein mit LDS (4x), Wasser und DTT (stock 1 M, final 0,1 M) eingestellt. Die Proben wurden für 5 Minuten bei 95 °C erhitzt und der Geltank mit Gelen sowie Laufpuffer vorbereitet. Anschließend wurde die gewünschte Menge Protein bzw. Protein Größenmarker auf das Gel aufgetragen und das Gel zunächst für 80 V und ab Auftrennung des Größenmarkers bei 110 V laufen gelassen. Sobald die vorderste Lauffront das Ende des Gels erreicht hatte,

wurde der Lauf beendet und der Transfer des Gels auf die Nitrozellulosemembran durch einen Semi-Dry Blot bei 2 A für 7 Minuten durchgeführt. Die Membran wurde nun für 1 h bei Raumtemperatur in 5 % Milch in PBST oder 5 % BSA in PBST geblockt. Anschließend wurde der primäre Antikörper 1:1.000 in 5 % Milch in PBST oder 5 % BSA in PBST gelöst und zur Membran gegeben. Die Membran wurde über Nacht bei 4 °C auf dem Schüttler inkubiert und am nächsten Morgen mit PBST dreimal für je 5 Minuten auf dem Schüttler bei Raumtemperatur gewaschen. Anschließend wurde entsprechend der Ursprungsspezies des primären Antikörpers der sekundäre Antikörper (Ziege-anti-Maus oder Ziege-anti-Hase) 1:2.000 in 5 % Milch in PBST zur Membran gegeben und für 45 Minuten bei Raumtemperatur auf dem Schüttler inkubiert. Nach der Inkubation wurde der Blot erneut für dreimal je 5 Minuten in PBST gewaschen und anschließend zur Aufnahme vorbereitet. Hierzu wurde das Detektionsreagenz durch zusammengeben von 1:1 Peroxidase und Luminol erstellt und auf die Membran gegeben. Nach einer Inkubation für eine Minute in Dunkelheit wurde die Membran in das Aufnahmegerät gelegt und sowohl als kolorimetrische als auch als chemilumineszente Aufnahme aufgenommen, hierbei wurde die Belichtungszeit je nach Blot individuell durch das Gerät ausgewählt. Nach der Aufnahme wurde die Membran erneut dreimal für je 5 Minuten in PBST gewaschen und anschließend für 1 h in Tubulin entstammend einer anderen Ursprungsspezies als der zu vorige primäre Antikörper (1:2.000 in 5 % Milch in PBST) inkubiert. Anschließend wurde die Membran wieder für je 5 Minuten dreimal in PBST gewaschen und der entsprechende sekundäre Antikörper (1:2.000 in 5 % Milch in PBST) für 45 Minuten inkubiert. Nach erneutem Waschen wurde die Membran erneut im Aufnahmegerät sowohl kolorimetrisch als auch chemilumineszent aufgenommen, erneut gewaschen und zum Trocknen auf Whatmann-Papier ausgelegt. Sobald die Membran getrocknet war, wurde sie in einer Klarsichtfolie an einem dunkeln Ort gelagert. Eine erneute Belichtung und Inkubation in Antikörpern ist so nach erneutem Waschen möglich.

Ein Entfernen der primären Antikörper ist durch Inkubation im Stripping Puffer möglich. Hierzu wurde der Blot für 5-15 Minuten bei Raumtemperatur (je nach Expressionsstärke des vorherigen primären Antikörpers) auf dem Schüttler in Stripping Puffer inkubiert und anschließend dreimal für je 5 Minuten in PBST gewaschen. Danach war eine erneute Inkubation in primären Antikörpern möglich.

### 2.2.19 RNA Extraktion und cDNA Erstellung

Zur Extraktion von RNA und Erstellung von cDNA aus den Formalin-fixierten, Paraffin-  
eingebetteten (FFPE) Zellen wurden zunächst Schnitte der Zellen aus dem Paraffin-Block  
erstellt. Aus diesen Schnitten wurde nun mittels des RNeasy Kit die RNA nach  
Herstellieranleitung extrahiert. Die Konzentration der RNA wurde mittels des Qubit™ RNA High  
Sensitivity (HS) Kit (wie in Kapitel 0

Proteinkonzentrationsbestimmung beschrieben) bestimmt. Die erstellte RNA wurde nun entweder bei -80 °C gelagert oder verwendet um cDNA zu generieren. Hierfür wurde das Superscript IV VILO Kit verwendet und Mastermix gemäß Tabelle 5 erstellt (Mengenangabe für jeweils eine Reaktion).

**Tabelle 5:** Zusammensetzung des Mastermix für die Erstellung von cDNA sowie die Zusammensetzung des Mastermix der Negativkontrolle ohne reverse Transkriptase

|                                      | +reverse Transkriptase | -reverse Transkriptase<br>(Negativkontrolle) |
|--------------------------------------|------------------------|----------------------------------------------|
| SuperScript IV VILO Mastermix        | 4 µL                   | /                                            |
| SuperScript IV VILO No RT<br>Control | /                      | 4 µL                                         |
| RNA                                  | 80 ng                  | 80ng                                         |
| Nuklease-freies Wasser               | Auf 20 µL auffüllen    | Auf 20 µL auffüllen                          |

Dieser Mastermix wird inklusive RNA in ein Mikroreaktionsgefäß pipettiert und nach Protokoll aus Tabelle 6 im Thermocycler die reverse Transkription durchgeführt.

**Tabelle 6:** Ablauf des Protokolls für den Thermocyclers zur Erstellung der cDNA aus RNA mittels reverser Transkriptase

|           | Temperatur | Zeit       |
|-----------|------------|------------|
| Schritt 1 | 25 °C      | 10 Minuten |
| Schritt 3 | 85 °C      | 5 Minuten  |
| Schritt 4 | ∞          | 4 °C       |

Die erstellte cDNA wurde anschließend mit Nuklease-freiem Wasser auf 5 ng/µL verdünnt und bei -20 °C bis zur Verwendung gelagert.

### 2.2.20 Realtime -PCR (RT-PCR)

Zur Evaluation der mRNA-Expression in den untersuchten Proben wurde nach der Erstellung der cDNA aus der extrahierten RNA eine Realtime-PCR durchgeführt. Hierbei wird die Menge an cDNA spezifisch für das Zielprotein (es wird eine äquivalente Umsetzung der RNA in cDNA angenommen) mittels TaqMan-Sonden durch Fluoreszenz ermittelt. Die Target-spezifischen TaqMan-Sonden haben zusätzlich zur komplementären Zielsequenz am 5'-Ende ein Fluorophor angebunden sowie am 3'-Ende ein Quencher, in Anwesenheit des Quenchers ist das Fluoreszenz-Signal unterdrückt. Während der Annealing-Phase der RT-PCR bindet so die Sonde mittels der Primer-Sequenz an die cDNA, durch die Polymerisation in der Amplifikations-Phase der RT-PCR wird der Quencher abgespalten und das Fluoreszenz-Signal ist detektierbar. Hierbei entspricht das Fluoreszenz-Signal der Menge an Amplifikationsprodukt und somit der Menge an mRNA in der Probe.

Hierfür wurden die Proben gemäß Tabelle 7 im 96-Well Format für die RT-PCR vorbereitet.

**Tabelle 7:** Zusammensetzung der Mastermix für RT-PCR, dargestellt als benötigte Volumina für eine Reaktion

|                                                          | Volumen pro Reaktion |
|----------------------------------------------------------|----------------------|
| Mastermix                                                | 15 µL                |
| TaqMan Gen-Expression Assay 1 (Target-spezifische Sonde) | 1,5 µL               |
| TaqMan Gen-Expression Assay 2 (Target-spezifische Sonde) | 1,5 µL               |
| Nuklease-freies Wasser                                   | 9 µL                 |
| cDNA                                                     | 3 µL                 |

Die erstellte Platte wurde kurz zentrifugiert und anschließend die RT-PCR im 7900HT Fast RealTime PCR System Cyclor gestartet. Hierbei wurde die RT-PCR gemäß des Protokolls aus Tabelle 8 durchgeführt.

**Tabelle 8:** zeitlicher Ablauf der RT-PCR im 7900HT Fast RealTime PCR System Cyclor

|                            | Temperatur | Zeit       | Wiederholungen |
|----------------------------|------------|------------|----------------|
| Aktivierung Taq Polymerase | 95 °C      | 10 Minuten | 1x             |
| Primer Hybridisierung      | 60 °C      | 1 Minute   | 40x            |
| Denaturierung              | 95 °C      | 5 Sekunden |                |

Die Daten wurden mittels der Standardkurven-Methode analysiert, hierbei wurde das Gen ACTB als Housekeeping-Gen verwendet.

### 3. Ergebnisse

#### 3.1 Antikörper-Herstellung

##### 3.1.1 Einfluss der PeptidAuswahl

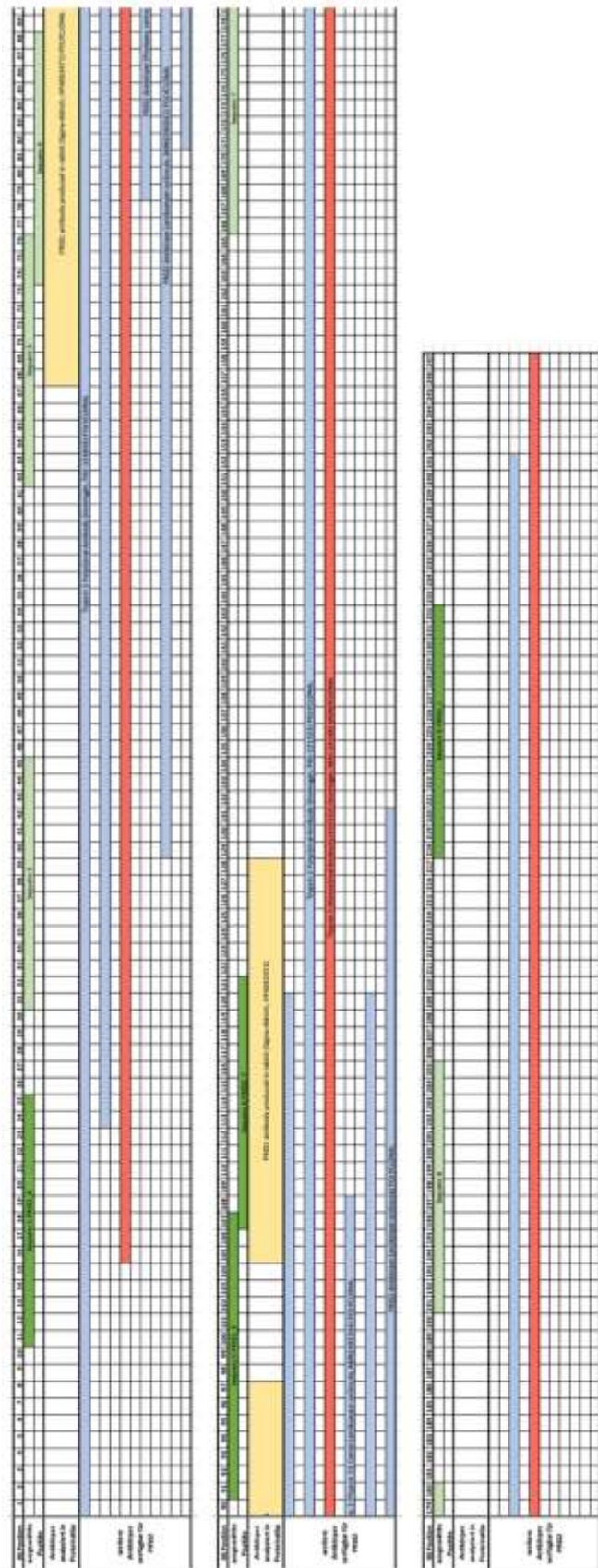
Zur Generierung von monoklonalen Antikörpern gegen das gewünschte Protein wird für die Hybridoma-Methode ein Protein-spezifisches Proteinfragment, welches im besten Falle einmalig für dieses Protein ist, in die Maus injiziert. Hierdurch generiert das murine Immunsystem spezifische Antikörper gegen die injizierten Peptide, welche anschließend gewonnen und reproduzierbar gemacht werden. Aufgrund der Langwierigkeit des Prozesses ist es essenziell, dass die Auswahl der verwendeten Peptide optimal ist. Die Peptidsequenzen sollten daher einmalig, aussagekräftig und immunogen sein.

### 3.1.1.1 Einfluss der Lokalisation und Komposition der verwendeten Peptide in der Proteinsequenz

Zur Generierung der Antikörper im Hybridoma-Verfahren werden Mäuse mit dem Antigen immunisiert, sodass diese Antikörper-produzierende Lymphozyten generieren, welche Antikörper gegen das verwendete Antigen erstellen. Diese Lymphozyten werden dann für das Hybridoma-Verfahren verwendet, um so Antikörper-produzierende Hybridome zu erstellen. Das verwendete Antigen muss eine Aminosäure-Sequenz enthalten, welche im besten Falle einmalig für das gewünschte Zielprotein ist. Hierbei ist es egal ob das Antigen ein Volllängenpeptid oder nur eine kurze Peptidsequenz des Zielproteins ist, solange das Epitop des Antigens in gleicher Konformation und post-translationalen Modifikation vorliegt wie das Zielprotein. Aufgrund der kostengünstigeren Produktion werden für die Immunisierung der Mäuse daher häufig Peptidsequenzen von etwa 15 Aminosäuren verwendet. Die Sequenz wird hierbei nach verschiedenen Parametern (Hydrophilität, Oberflächenpräsenz, Homologie mit anderen Proteinen und Organismen etc.) ausgewählt, um so das bestmögliche Antigen und somit das Epitop des Antikörpers zu finden.

Es wurden bei der Immunisierung für das Protein PRSS2 5 verschiedene Peptidsequenzen verwendet: PRSS2\_A, PRSS2\_D, PRSS2\_E, PRSS2\_F und PRSS2\_I. Hierbei entsprachen PRSS2\_E teilweise Abschnitten der Sequenz zwei verschiedener kommerzieller rekombinante PrEST-Antikörper (Protein Epitope Signature Tags) gegen PRSS1 und PRSS2\_F einem Abschnitt eines kommerziellen PrEST-Antikörpers gegen PRSS1. Alle ausgewählten Peptidsequenzen entsprachen Abschnitten anderer kommerzieller monoklonaler und polyklonaler Antikörper gegen PRSS2 (Abbildung 5).





**Abbildung 5:** Darstellung der Lage der für die Immunisierung verwendeten Peptide in Relation zur Lage anderer kommerziell verfügbaren Antikörper in der Aminosäuresequenz des PRSS2-Proteins.  
 Farbcodierung: Dunkelgrün: ausgewählte Peptidsequenz für Immunisierung, Hellgrün: mögliche Peptidsequenz für Immunisierung, Gelb: PreST-Antikörper, kommerziell, Hellblau: Polyklonaler kommerzieller Antikörper, Rot: Monoklonaler kommerzieller Antikörper

Zur Evaluation der Potenz der jeweiligen Aminosäure als Antigen wurde ein bioinformatischer Peptidscan durch das HUSAR-Programm für das Protein PRSS2 durchgeführt. Hierbei wurde von jeder Aminosäure die Glycosylierungsstelle (GlycoS), die Hydrophilität (HyPhil), die Oberflächenpräsenz im gefalteten Protein (SurfPr), die Flexibilität (FlexPr), der Kernbereich-Prädiktor (CF-Pre) und Sekundärstruktur-Prädiktoren (GORPred) ermittelt, sodass die mögliche Fähigkeit als Antigen zur Generierung von spezifischen Antikörpern ermittelt werden konnte. Vergleicht man die fünf ausgewählten Peptide für PRSS2 und deren Erfolg in der Antikörper-Erstellung, ist ersichtlich, dass das Peptid PRSS2\_E mit 16 erstellten Antikörpern (Färbereigenschaften 1x TOP, 3x TOPTOP) das erfolgreichste Peptid war, gefolgt von Peptid PRSS2\_A (1xTOP) und PRSS2\_I (kein TOP) (Tabelle 9). Ein TOP Klon beschreibt hierbei ein Klon, welcher Antikörper mit guten Färbereigenschaften in Bezug auf Sensitivität und Spezifität zeigt, jedoch gegebenenfalls einen leichten Hintergrund oder keine perfekte Spezifität zeigt. Dies kann durch Anpassung der Verdünnung oder durch weitere Vereinzelung zum Erreichen der Monoklonalität verbessert werden. Ein TOPTOP Klon zeigt sehr gute Färbereigenschaften, es ist kein Hintergrund und eine gute Spezifität zu erkennen, es liegt wahrscheinlich Monoklonalität vor und die produzierten Antikörper des Klons können aufgereinigt und verwendet werden.

Vergleicht man die verschiedenen evaluierten Eigenschaften im Vergleich zum Erfolg der jeweiligen Peptidsequenz in der Generierung guter Antikörper für die Immunhistochemie, so zeigt sich, dass eine hohe durchschnittliche Oberflächenpräsenz ( $>1$ ), eine hohe durchschnittliche Flexibilität, sowie eine Hydrophilität und einen Antigenizitätsindex von mehr als 0,9 ein Indikator für eine erfolgreiche Peptidsequenz sein kann (Tabelle 10).

**Tabelle 9:** Effizienz der verwendeten Peptide für PRSS2 in der Fähigkeit der Generierung von Antikörpern, sowie deren gute (TOP) bzw. sehr gute (TOPTOP) Färbereigenschaften in der Immunhistochemie

| Maus    | Klon  | TOP    | gekommen auf Peptid | Anzahl guter Klone pro Maus |
|---------|-------|--------|---------------------|-----------------------------|
| PRSS2_1 | 3A10  |        | PRSS2_E             | 10                          |
|         | 6D4   |        | PRSS2_E             |                             |
|         | 8D5   |        | PRSS2_E             |                             |
|         | 9B4   |        | PRSS2_E             |                             |
|         | 9C3   |        | PRSS2_E             |                             |
|         | 11E9  |        | PRSS2_I             |                             |
|         | 11H3  |        | PRSS2_E             |                             |
|         | 11H9  |        | PRSS2_E             |                             |
|         | 13C12 |        | PRSS2_E             |                             |
|         | 15C11 |        | PRSS2_E             |                             |
| PRSS2_2 | 3B9   |        | PRSS2_E             | 2                           |
|         | 11H9  |        | PRSS2_A             |                             |
| PRSS2_3 | 5G1   |        | PRSS2_A             | 2                           |
|         | 7F1   |        | PRSS2_E             |                             |
| PRSS2_4 | 3H2   |        | PRSS2_E             | 1                           |
| PRSS2_5 | 4G10  |        | PRSS2_I             | 1                           |
| PRSS2_6 | 3E1   |        | PRSS2_A             | 7                           |
|         | 4E12  | TOP    | PRSS2_A             |                             |
|         | 5C11  |        | PRSS2_I             |                             |
|         | 5D3   | TOP    | PRSS2_E             |                             |
|         | 5F2   | TOPTOP | PRSS2_E             |                             |
|         | 6B11  | TOPTOP | PRSS2_E             |                             |
|         | 8B10  | TOPTOP | PRSS2_E             |                             |
| PRSS2_7 |       |        |                     | 0                           |
| PRSS2_8 |       |        |                     | 0                           |

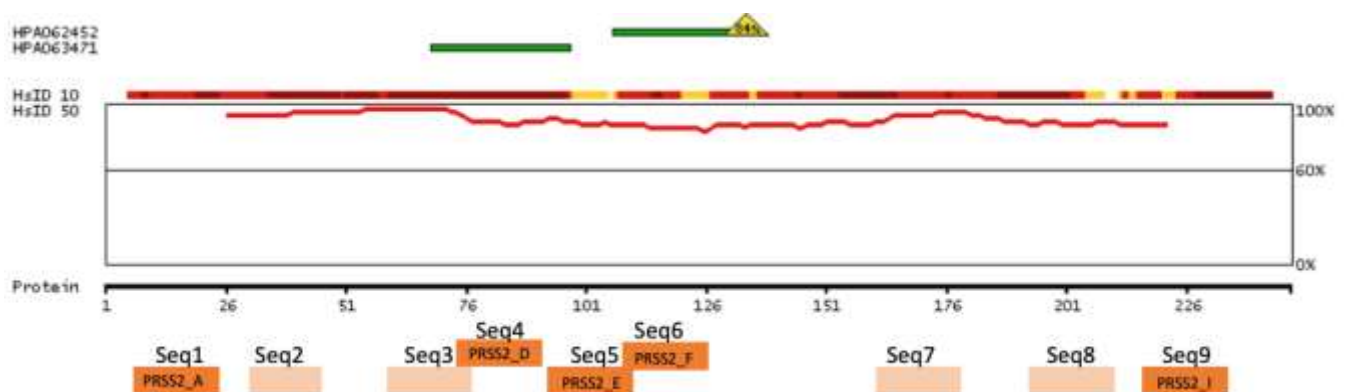
|         | Anzahl generierter Antikörper-Klone durch Peptid | Antikörper-Klone, davon TOP oder TOPTOP |
|---------|--------------------------------------------------|-----------------------------------------|
| PRSS2_A | 4                                                | 1 TOP                                   |
| PRSS2_D | 0                                                | 0                                       |
| PRSS2_E | 16                                               | 1 TOP, 3 TOPTOP                         |
| PRSS2_F | 0                                                | 0                                       |
| PRSS2_I | 3                                                | 0                                       |

**Tabelle 10 :** Darstellung der Eigenschaften der ausgewählten Peptidsequenzen PRSS2\_A, PRSS1\_D, PRSS2\_E, PRSS2\_F, PRSS2\_I sortiert nach ihrem Erfolg in der Generierung von Antikörpern.

|                    | Anzahl AA | GlycoS       | Durchschnitt HyPhil | Durchschnitt SurfPr | Durchschnitt FlexPr | CF-Pre | % CF-Pre | d GORPred | % d GORPred | Durchschnitt AI-Ind ... | HyPhil und AI >0,9 | Summe >1       | HyPhil und AI >0,6 |
|--------------------|-----------|--------------|---------------------|---------------------|---------------------|--------|----------|-----------|-------------|-------------------------|--------------------|----------------|--------------------|
| Sequenz 5, PRSS2_E | 17        | keine GlycoS | 1,202               | 2,090               | 1,008               | 0 h    | 0,0%     | 0 h       | 0,0%        | 0,880                   | 8 AI               | 0 interessant  | 10 AI              |
|                    |           |              |                     |                     |                     | 6 H    | 35,3%    | 4 H       | 23,5%       |                         | 9 ungünstig        | 17 ungünstig   | 7 ungünstig        |
|                    |           |              |                     |                     |                     | 4 t    | 23,5%    | 0 t       | 0,0%        |                         |                    |                |                    |
|                    |           |              |                     |                     |                     | 4 T    | 23,5%    | 7 T       | 41,2%       |                         |                    |                |                    |
|                    |           |              |                     |                     |                     | 0 B    | 0,0%     | 2 B       | 29,4%       |                         |                    |                |                    |
|                    |           |              |                     |                     |                     | 3 i    | 17,6%    | 4 i       | 23,5%       |                         |                    |                |                    |
| Sequenz 1, PRSS2_A | 15        | keine GlycoS | -0,211              | 0,943               | 0,964               | 0 h    | 0,0%     | 0 h       | 0,0%        | 0,347                   | 4 AI               | 3 interessant  | 6 AI               |
|                    |           |              |                     |                     |                     | 6 H    | 40,0%    | 11 H      | 73,3%       |                         | 11 ungünstig       | 12 ungünstig   | 9 ungünstig        |
|                    |           |              |                     |                     |                     | 3 t    | 20,0%    | 0 t       | 0,0%        |                         |                    |                |                    |
|                    |           |              |                     |                     |                     | 3 T    | 20,0%    | 4 T       | 26,7%       |                         |                    |                |                    |
|                    |           |              |                     |                     |                     | 2 B    | 13,3%    | 0 B       | 0,0%        |                         |                    |                |                    |
|                    |           |              |                     |                     |                     | 1 i    | 6,7%     | 0 i       | 0,0%        |                         |                    |                |                    |
| Sequenz 9, PRSS2_I | 15        | keine GlycoS | 0,991               | 1,437               | 0,997               | 0 h    | 0,0%     | 0 h       | 0,0%        | 0,917                   | 7 AI               | 0 interessant  | 10 AI              |
|                    |           |              |                     |                     |                     | 0 H    | 0,0%     | 0 H       | 0,0%        |                         | 8 ungünstig        | 15 ungünstig   | 5 ungünstig        |
|                    |           |              |                     |                     |                     | 3 t    | 20,0%    | 0 t       | 0,0%        |                         |                    |                |                    |
|                    |           |              |                     |                     |                     | 4 T    | 26,7%    | 9 T       | 60,0%       |                         |                    |                |                    |
|                    |           |              |                     |                     |                     | 5 B    | 33,0%    | 5 B       | 33,3%       |                         |                    |                |                    |
|                    |           |              |                     |                     |                     | 3 i    | 20,0%    | 1 i       | 6,7%        |                         |                    |                |                    |
| Sequenz 6, PRSS2_F | 15        | keine GlycoS | -0,905              | 0,440               | 0,997               | 0 h    | 0,0%     | 0 h       | 0,0%        | -0,453                  | 0 AI               | 2 interessant  | 0 AI               |
|                    |           |              |                     |                     |                     | 0 H    | 0,0%     | 0 H       | 0,0%        |                         | 15 ungünstig       | 13 ungünstig   | 15 ungünstig       |
|                    |           |              |                     |                     |                     | 2 t    | 13,3%    | 0 t       | 0,0%        |                         |                    |                |                    |
|                    |           |              |                     |                     |                     | 0 T    | 0,0%     | 0 T       | 0,0%        |                         |                    |                |                    |
|                    |           |              |                     |                     |                     | 6 B    | 40,0%    | 10 B      | 66,7%       |                         |                    |                |                    |
|                    |           |              |                     |                     |                     | 7 i    | 46,7%    | 5 i       | 33,3%       |                         |                    |                |                    |
| Sequenz 4, PRSS2_D | 15        | keine GlycoS | 0,605               | 0,814               | 1,000               | 0 h    | 0,0%     | 0 h       | 0,0%        | 0,490                   | 0 AI               | 12 interessant | 7 AI               |
|                    |           |              |                     |                     |                     | 8 H    | 53,3%    | 11 H      | 73,3%       |                         | 15 ungünstig       | 3 ungünstig    | 8 ungünstig        |
|                    |           |              |                     |                     |                     | 0 t    | 0,0%     | 0 t       | 0,0%        |                         |                    |                |                    |
|                    |           |              |                     |                     |                     | 0 T    | 0,0%     | 0 T       | 0,0%        |                         |                    |                |                    |
|                    |           |              |                     |                     |                     | 0 B    | 0,0%     | 0 B       | 0,0%        |                         |                    |                |                    |
|                    |           |              |                     |                     |                     | 7 i    | 46,7%    | 4 i       | 26,7%       |                         |                    |                |                    |

Vergleicht man jedoch die Lage der Peptidsequenzen innerhalb der Proteinsequenz mit anderen kommerziell erwerblichen Antikörpern, so erkennt man, dass z.B. die erfolgreichste Peptidsequenz PRSS2\_E in vielen Antikörpern enthalten ist, jedoch nicht als vollständige Sequenz in den vom Proteinatlas evaluierten Antikörpern von Sigma-Aldrich vorliegt (HPA063471 und HPA062452). Die Lage der einzelnen Peptide innerhalb der Proteinsequenz zeigt, dass sowohl der Anfang (PRSS2\_A) als auch das Ende (PRSS2\_I) des Proteins als Antigen gut zu funktionieren scheinen, jedoch ist auch PRSS2\_E mit seiner Position in der Mitte des Proteins in der Lage als Antigen zur Generierung von Antikörpern zu funktionieren (Abbildung 6).

Es ist zudem relevant die Sequenzidentität der ausgewählten Peptide mit allen murinen Proteinen zu vergleichen und eine geringe Identität zu wählen, um so eine Kreuzreaktivität mit anderen murinen Proteinen später zu vermeiden. Hierbei ist zu erkennen, dass eine Sequenzidentität von weniger als 100 % für einen erfolgreichen Antikörper ist, jedoch nicht der einzige Faktor für einen erfolgreichen Antikörper zu sein scheint. Denn auch Proteinsequenz PRSS2\_F hat eine geringe Sequenzidentität mit anderen murinen Proteinen von nur 73,33 %, jedoch ist diese Peptidsequenz nicht erfolgreich in der Generierung guter Antikörper gewesen (siehe oben) (Abbildung 7).



**Abbildung 6:** Darstellung der Lage der einzelnen Peptidsequenzen (untere Zeile) im PRSS2-Protein. Dunkelorange stellen die ausgewählten Peptidsequenzen dar, Hellorange stellen weitere mögliche Peptidsequenzen dar. Die oberste Zeile beschreibt die Lage der zwei PreST-Antikörper HPA0622452 und HPA063471. Das Diagramm darunter stellt farblich und als Graph die Sequenzidentität des Proteins mit anderen humanen Proteinen dar (rot = hohe Sequenzähnlichkeit, gelb = geringere Sequenzähnlichkeit).

| <b>Peptid</b>             | <b>Maximale<br/>Sequenzidentität mit<br/>murinen Proteinen</b> |
|---------------------------|----------------------------------------------------------------|
| <b>Sequenz 1, PRSS2_A</b> | 85,61 %                                                        |
| <b>Sequenz 2</b>          | 93,33 %                                                        |
| <b>Sequenz 3</b>          | 100,00 %                                                       |
| <b>Sequenz 4, PRSS2_D</b> | 93,33 %                                                        |
| <b>Sequenz 5, PRSS2_E</b> | 86,67 %                                                        |
| <b>Sequenz 6, PRSS2_F</b> | 73,33 %                                                        |
| <b>Sequenz 7</b>          | 93,33 %                                                        |
| <b>Sequenz 8</b>          | 100,00 %                                                       |
| <b>Sequenz 9, PRSS2_I</b> | 86,67 %                                                        |

**Abbildung 7:** Identität der ausgewählten und möglichen Peptidsequenzen mit murinen Proteinen.  
Daten erstellt via BLAST gegen Maus, dargestellt ist der Wert des Proteins mit höchster Identität detektiert mittels BLAST

Vergleicht man die ermittelten ELISA-Werte der verschiedenen generierten Antikörper-Klone, so kann man beobachten, dass, wie zuvor beschrieben, die erfolgreichen Peptide PRSS2\_E, PRSS2\_A und PRSS2\_I ELISA-Werte oberhalb des Schwellenwerts erreichen und somit größere Mengen an Antikörper produzieren (rot). Die ELISA-Werte für PRSS2\_E sind hierbei jedoch deutlich höher als für die anderen beiden Peptide PRSS2\_A und PRSS2\_I (Abbildung 8).

| Maus    | Klon  | 1.ELISA | 2.ELISA |         |         |         |         |
|---------|-------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|
|         |       |         | PRSS2_A | PRSS2_D | PRSS2_E | PRSS2_F | PRSS2_I |
| PRSS2_1 | 3A10  | 0,3249  | 0,0276  | 0,035   | 0,5244  | 0,0308  | 0,0638  |
|         | 6D4   | 0,3232  | 0,035   | 0,035   | 0,4971  | 0,0308  | 0,0479  |
|         | 8D5   | 0,4023  | 0,0308  | 0,035   | 0,5254  | 0,0308  | 0,037   |
|         | 9B4   | 0,3885  | 0,0351  | 0,035   | 0,4844  | 0,0308  | 0,0385  |
|         | 9C3   | 0,3731  | 0,0321  | 0,035   | 0,5141  | 0,0308  | 0,0572  |
|         | 11E9  | 0,2978  | 0,0298  | 0,035   | 0,037   | 0,0308  | 0,6026  |
|         | 11H3  | 0,3835  | 0,0036  | 0,035   | 0,4753  | 0,0308  | 0,0429  |
|         | 11H9  | 0,3891  | 0,0409  | 0,035   | 0,5118  | 0,0308  | 0,1393  |
|         | 13C12 | 0,3329  | 0,0365  | 0,035   | 0,4788  | 0,0308  | 0,054   |
|         | 15C11 | 0,4165  | 0,0351  | 0,035   | 0,4485  | 0,0308  | 0,0354  |
| PRSS2_2 | 3B9   | 0,3233  | 0,0362  | 0,035   | 0,5163  | 0,0308  | 0,0361  |
|         | 11H9  | 0,4573  | 0,2642  | 0,035   | 0,4977  | 0,0308  | 0,0334  |
| PRSS1_3 | 5G1   | 0,4656  | 0,5504  | 0,035   | 0,0362  | 0,0308  | 0,0137  |
|         | 7F1   | 0,7396  | 0,0396  | 0,035   | 0,4986  | 0,0308  | 0,0464  |
| PRSS1_4 | 3H2   | 0,5858  | 0,0292  | 0,035   | 0,4429  | 0,0308  | 0,0405  |
| PRSS2_5 | 4G10  | 0,4364  | 0,0438  | 0,0325  | 0,0314  | 0,0384  | 0,3708  |
| PRSS2_6 | 3E1   | 0,3575  | 0,1192  | 0,0359  | 0,4264  | 0,0247  | 0,0359  |
|         | 4E12  | 0,4082  | 0,4325  | 0,0358  | 0,411   | 0,0273  | 0,0356  |
|         | 5C11  | 0,3988  | 0,0435  | 0,0427  | 0,0777  | 0,0319  | 0,3335  |
|         | 5D3   | 0,3698  | 0,0339  | 0,0354  | 0,43    | 0,0285  | 0,0379  |
|         | 5F2   | 0,385   | 0,0355  | 0,0493  | 0,43    | 0,0556  | 0,0348  |
|         | 6B11  | 0,3529  | 0,0416  | 0,0445  | 0,4314  | 0,0505  | 0,0351  |
|         | 8B10  | 0,3605  | 0,0368  | 0,0573  | 0,4122  | 0,0625  | 0,0358  |

**Abbildung 8:** Darstellung der ermittelten ELISA-Werte für jeden Antikörper-Klon im 1. Und 2. ELISA für jede Peptidsequenz für das Protein PRSS2.

Rot markiert sind hier Werte oberhalb des Schwellenwerts um als positiver ELISA-Wert detektiert zu werden, schwarz markiert sind Werte welche als Hintergrundrauschen gelten.

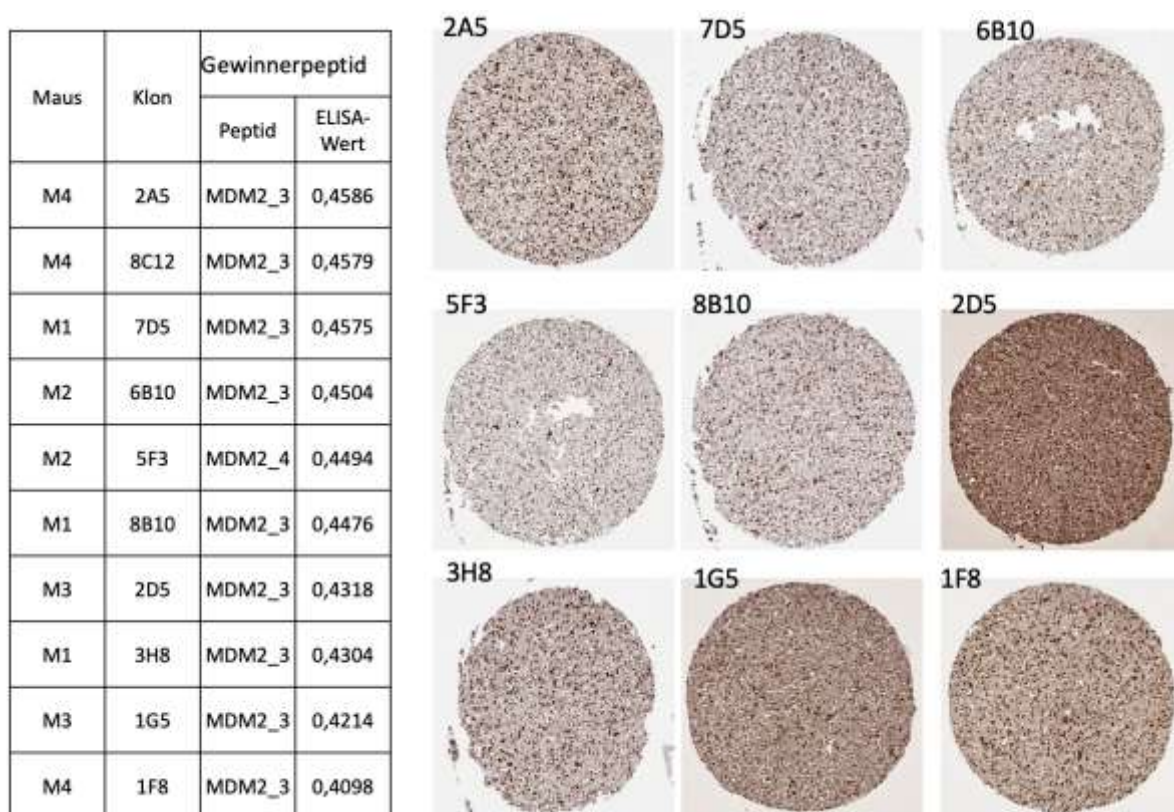
### 3.1.1.2 Einfluss des ELISA-Wertes auf die Stärke der Immunfärbung und dem weiteren Verlauf der Hybridomaklone

Erstellte Hybridoma-Klone werden 4 Wochen nach der Fusion erstmals auf ihre Antikörper-Produktionsfähigkeit hin getestet. Hierzu wird neben dem Aussehen der Klone die Menge der sezernierten Antikörper für das gewünschte Zielprotein ermittelt. Es wird dafür ein Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA-Assay) durchgeführt, bei welchem als angebundenes Zielpeptid das Peptid verwendet wird, mit welchem auch die Mäuse immunisiert wurden. Ein hoher ELISA-Wert gibt hierbei Rückschluss auf große Menge an sezerniertem Antikörper für die gewünschte Zielsequenz, da viele der Antikörper an diese Sequenz binden. Dies lässt auf einen potenziell guten Hybridoma-Klon schließen. Im Anschluss wird Überstand desselben Klons als primärer Antikörper in der Immunhistochemie (IHC) verwendet, um so Rückschluss auf die Färbereigenschaften des Klons zu erhalten. Ein Antikörper, der ausreichend intensiv nur seine erwartete Zielstruktur in der IHC-Färbung färbt ohne Hintergrund- oder unspezifische Färbung, gilt hier als guter Hybridoma-Klon. Da bei einem ELISA-Assay und der IHC-Färbung die Zielproteinsequenz in unterschiedlichen Formen vorliegt (linearisiert vs. gefaltet), ist es nicht zwingend so, dass ein Hybridoma-Klon mit hohem ELISA-Wert auch eine starke IHC-Färbung verursacht.

Vergleicht man die ELISA-Werte des ersten Haupt-ELISAs mit den Färbeergebnissen der IHC-Färbung desselben Klons kann man folgendes beobachten:



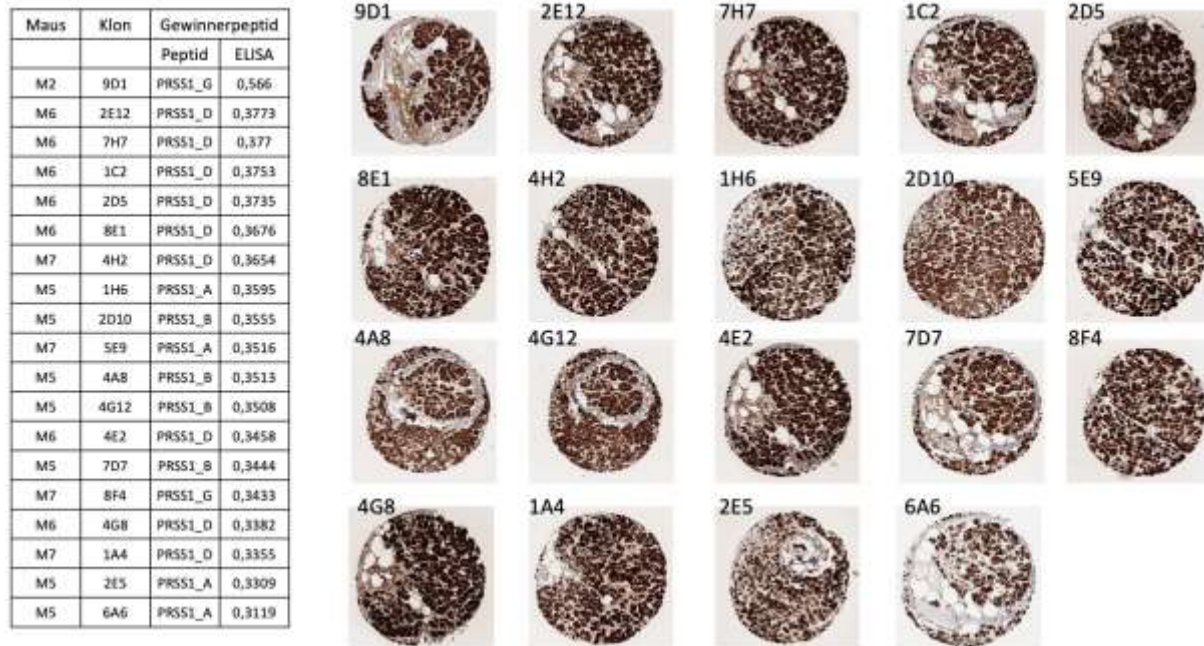
Beim Zielprotein MDM2 wurden 10 Klone mit einem ELISA-Wert oberhalb der festgelegten Schwelle ausgewählt, welche im ELISA für verschiedene verwendete Peptide positiv waren (Abbildung 9). Die meisten Klone waren positiv für das Peptid MDM2\_3. Hierbei binden die von den Hybridoma-Klonen sezernierten Antikörper somit vornehmlich an die Peptidsequenz welche im Peptid MDM2\_3 enthalten ist und die Antikörper-Bildung wurde in der Maus auch durch dieses Peptid verursacht. Das Peptid MDM2\_3 konnte war somit am besten zur Erstellung der spezifischen Antikörper geeignet und ist daher das „Gewinnerpeptid“ im Vergleich zu den anderen verwendeten Peptiden. Die ELISA-Werte der 10 ausgewählten Klone reichen von 0,3869 bis 0,4586 in den verschiedenen Klonen. Die Färbung der Schnitte, welche mit dem Überstand der 10 verschiedenen Klone gefärbt wurden, zeigten eine stärkere Färbung für die Klone MDM2\_M2\_2D5, MDM2\_M3\_1G5 und MDM2\_M4\_1F8 als für die restlichen Klone. Jedoch haben diese Klone einen vergleichsweise geringen ELISA-Wert und sind nicht alle für dieselbe Peptidsequenz positiv.



**Abbildung 9:** Darstellung der Gewinnerpeptide und ELISA-Werte der Hybridoma-Klone für das Zielprotein MDM2. Dargestellt sind die ELISA-Werte oberhalb des Schwellenwerts (Links) sowie die Ergebnisse der IHC-Färbung der Überstände der selbigen Klone im erwarteten Gewebe (Milz) (rechts).

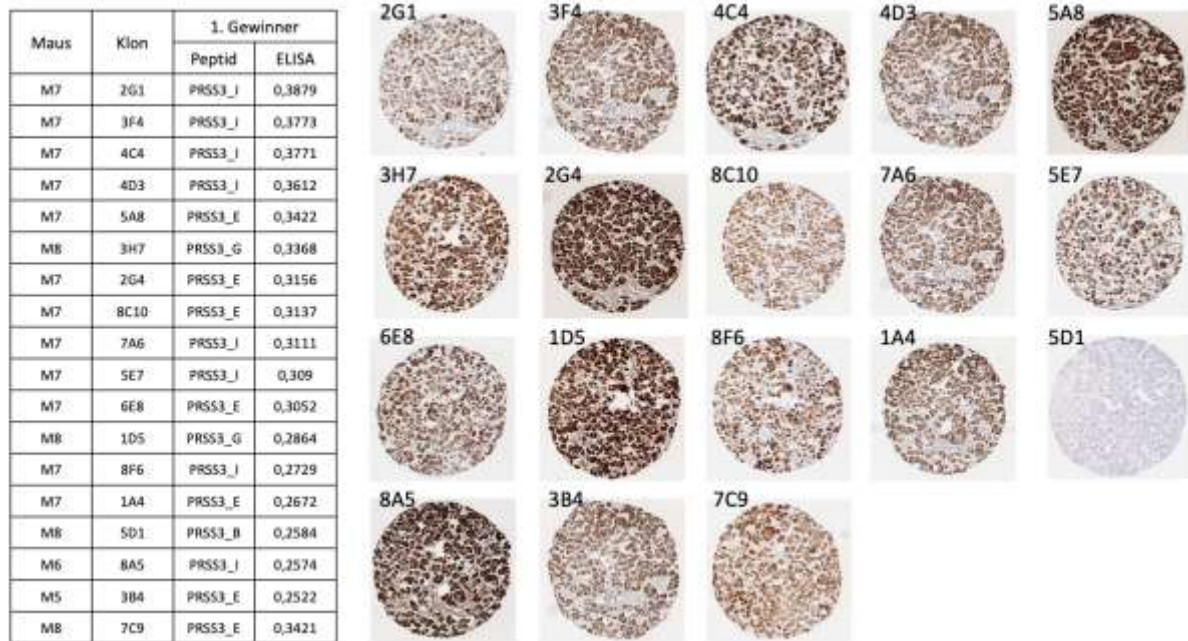


Für das Zielprotein PRSS1 wurden 19 Klone oberhalb des Schwellenwerts anhand des ELISA-Werts ausgewählt. Die Werte reichten hier von 0,3119 bis 0,566, welche im ELISA-Assay für verschiedene Peptide positiv waren (Abbildung 10). Die mit den Klon-Überständen gefärbten Schnitte zeigen für dieses Zielprotein bei allen ausgewählten Klone eine ähnlich starke Färbintensität im erwarteten Gewebe, unabhängig von der verwendeten Peptidsequenz.



**Abbildung 10:** Darstellung der Gewinnerpeptide und ELISA-Werte der Hybridoma-Klone für das Zielprotein PRSS1. Dargestellt sind die ELISA-Werte oberhalb des Schwellenwerts (Links) sowie die Ergebnisse der IHC-Färbung der Überstände der selbigen Klone im erwarteten Gewebe (Pankreas) (rechts).

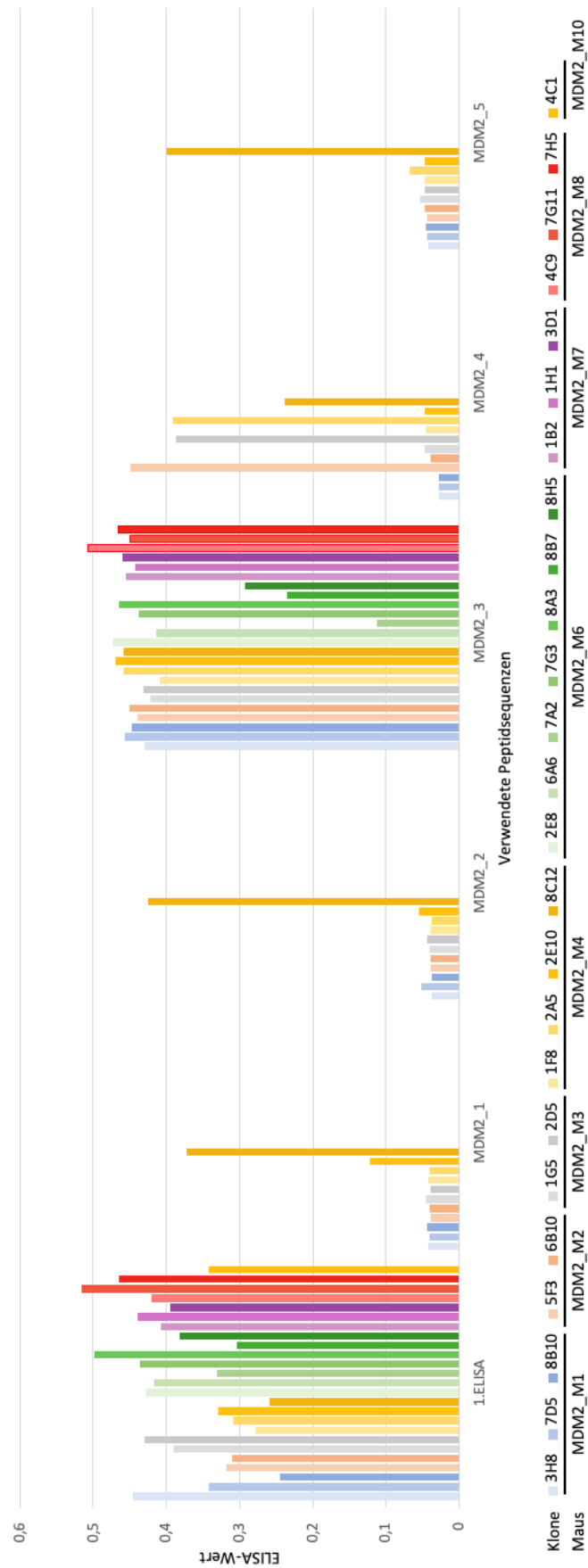
Für das Zielprotein PRSS3 wurden 18 Klone oberhalb des Schwellenwerts anhand des ELISA-Werts ausgewählt. Die Werte reichten hier von 0,3421 bis 0,3879, welche im ELISA-Assay für verschiedene Peptide positiv waren (Abbildung 11). Die mit den Klon-Überständen gefärbten Schnitte zeigten eine sehr variable Färbintensität, welche jedoch unabhängig vom ELISA-Wert oder dem Peptid, für welches der Antikörper positiv ist, zu sein scheint.



**Abbildung 11:** Darstellung der Gewinnerpeptide und ELISA-Werte der Hybridoma-Klone für das Zielprotein PRSS3. Dargestellt sind die ELISA-Werte oberhalb des Schwellenwerts (Links) sowie die Ergebnisse der IHC-Färbung der Überstände der selbigen Klone im erwarteten Gewebe (Pankreas) (rechts).

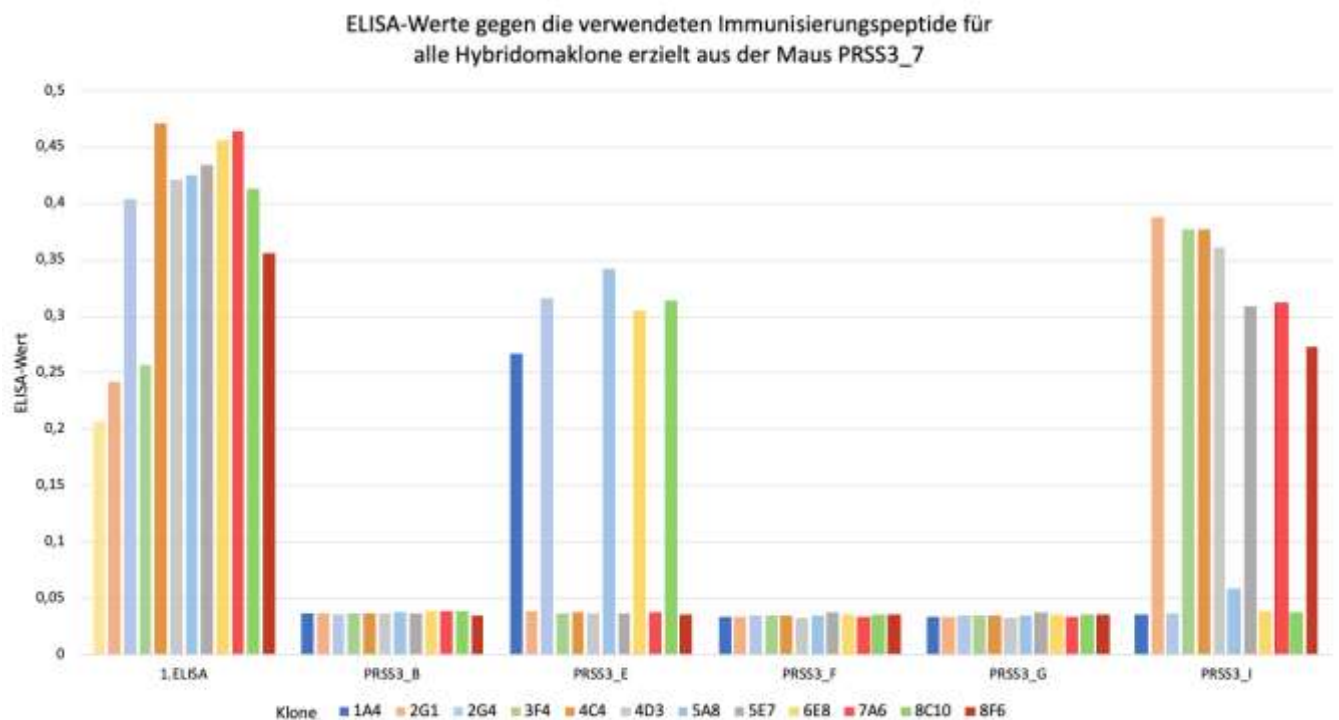
Im Vergleich der ELISA-Werte zwischen den verschiedenen verwendeten Peptiden für die Immunisierung der Mäuse zeigte sich, dass es häufig ein „Gewinnerpeptid“ gibt, welches in mehreren Mäusen das Peptid ist, gegen welches die vom Klon erstellten Antikörper gerichtet sind. Dies ist nicht exklusiv so. Man kann bei der Analyse der Peptide für das Zielprotein MDM2 in mehreren Mäusen das Peptid MDM2\_3 als das erfolgreichste Peptid (rot eingrahmt) definieren. In Maus MDM2\_M4 ist jedoch für Klon 8C12 nicht nur das Peptid MDM2\_3, sondern auch alle anderen verwendeten Peptide ELISA-positiv und die vom Klon produzierten Antikörper sind gegen alle verwendeten Peptide gerichtet. Der Klon MDM2\_M4 8C12 wurde aufgrund guter Färbereigenschaften weiter expandiert, jedoch verstarben die Zellen sodass der Klon nicht weitergeführt werden und weiter analysiert werden konnte (Abbildung 12).

ELISA-Werte aller erstellter Hybridomaklone für jedes Immunisierungspeptid für das Zielprotein MDM2



**Abbildung 12:** Darstellung aller ELISA-Werte aus 1. ELISA und Peptid-spezifischem ELISA für alle Immunisierungspeptide verwendet für MDM2.  
Gezeigt sind alle Hybridomaklone erzielt aus allen immunisierten Mäusen für MDM2.

Des Weiteren ist zu beobachten, dass die Höhe des ELISA-Wertes keine Aussage über den späteren Erfolg des Klon ergibt. So gab es für die Maus PRSS3\_7 mehrere positive Klone, welche Antikörper gegen mehrere Peptide (PSRR3\_E, PRSS3\_I) erstellten. Von diesen Klonen wurden 7 Klone expandiert und weiter charakterisiert, jedoch erreichten nur zwei Klone den Status einer guten Färbereigenschaft bei anhaltender Antikörper-Produktion. Diese beiden Klone PRSS3\_7 2G4 und PRSS3\_7 5A8 hatten im Vergleich zu anderen Klonen keine höheren ELISA-Wert als andere Klone, welche keine guten Färbereigenschaften zeigten (z.B. PRSS3\_7 6E8 oder PRSS3\_7 8C10 mit Antikörperproduktion gegen Peptid PRSS3\_E) (Abbildung 13).



**Abbildung 13:** Darstellung aller ELISA-Werte aus 1. Elisa und Peptid-spezifischem ELISA für alle verwendeten Immunisationspeptide für PRSS3.

Analysiert wurden hier die ELISA-Werte der Hybridomklone erstellt mit B-Lymphozyten aus der Maus PRSS3\_7.

### 3.1.2 Einfluss des Fusionsverfahrens

#### 3.1.2.1 Effizienzbewertung B-Zell Panning

Zur Evaluation der Effizienz des B-Zell Pannings in Bezug auf ELISA-Werte und Fortführung der erstellten Hybridoma-Klone wurden die Ergebnisse der Platten, welche das Standard-Protokoll der Fusion durchlaufen haben, mit den Platten verglichen, bei welchen das B-Zell Panning durchgeführt wurde. Es zeigt sich bei allen Platten eine wesentlich geringere Anzahl an positiven Wells im Vergleich zu den Platten nach Standardprotokoll. Vergleicht man die Anzahl an Wells mit ELISA-Werten oberhalb des Schwellenwerts von 0,1 der Platten mit Panning mit solchen nach Standardprotokoll wurde der Schwellenwert nur in 4-50 % der Wells verglichen mit der Anzahl der Wells der Standardprotokoll-Platten überschritten. Die ELISA-Werte im Mittel waren jedoch, je nach Zielprotein, entweder nahezu gleich oder im Falle von CD68 sogar 1,5- 2-fach höher. Es ist jedoch hervorzuheben, dass nach dem Haupt-ELISA die allermeisten Wells mit Klonen mit einem ELISA-Wert oberhalb des Schwellenwerts letztendlich nicht weiter fortgeführt wurden aufgrund von schlechten Färbereigenschaften oder zu schlechtem Wachstum (siehe Tabelle 11).

**Tabelle 11:** Vergleich Anzahl an ELISA-positiven Wells (ELISA >0,1) in Fusionsversuchen mit Panning in Relation zu ohne Panning, sowie Relation der Mittelwerte der ELISAs.  
Zudem Information über weiteren Verlauf der Klone (entsorgt, ausklonieren).

|                                                  | Positive Hybridomaklone erstellt Panning vs. Normaler Fusion |                                                         |                                       |             |             |                |
|--------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------|---------------------------------------|-------------|-------------|----------------|
|                                                  | CD112                                                        | CD68                                                    | CD68_N5                               | CD68_N6     | LAG3_N5     | LAG3_N6        |
| <b>Anzahl ELISA-positive Wells (+/- Panning)</b> | 6,45 %                                                       | 50,00 %                                                 | 35,29 %                               | 4,35 %      | 10,00 %     | 15,38 %        |
| <b>ELISA- Werte Mittelwert (+/- Panning)</b>     | 96,71 %                                                      | 216,19 %                                                | 119,63 %                              | 164,41 %    | 79,26 %     | 82,86 %        |
| <b>Entsorgt</b>                                  | 3x entsorgt,<br>1x ausklonieren<br>1V, danach<br>entsorgt    | 1x entsorgt,<br>1x<br>ausklonieren, zu<br>wenige Zellen | 5x entsorgt,<br>1x ausklonieren<br>2V | 1x entsorgt | 1x entsorgt | 4x<br>entsorgt |

### 3.1.2.2 Immunhistologische Analyse von gepannten Zellen

Zur Analyse der Effizienz und Selektivität wurden die gewonnenen Zellen nach dem B-Zell Panning immunhistologisch für B-Zell Marker (CD20) und T-Zell Marker (CD3) gefärbt.

Die Analyse der Gesamtzellzahl, sowie des Anteils positiv gefärbter Zellen für jedes Zielprotein (CD3, CD20) nach dem Panning ist dargestellt in Tabelle 12. Hierbei ist für CD20-positiv gefärbten Zellen eine durchschnittliche Anzahl von 2,28 pro Bildausschnitt detektiert worden, die Gesamtzellzahl pro Ausschnitt liegt durchschnittlich bei 100,31 Zellen. Der Anteil an CD20-positiven Zellen an der Gesamtzellzahl liegt somit durchschnittlich bei 2,74 %. Für CD3-positive Zellen konnte eine durchschnittliche Anzahl von 7,22 Zellen pro Bildausschnitt detektiert werden, die Gesamtzellzahl lag bei 109,58 Zellen pro Ausschnitt. Der durchschnittliche prozentuale Anteil und CD3-positiven Zellen liegt somit bei 7,94 % (Tabelle 12).

**Tabelle 12:** Durchschnittliche Anzahl CD3- bzw. CD20-positiver Zellen.

Evaluation nach dem Panning pro Bildausschnitt, Gesamtzellzahl pro Bildausschnitt sowie prozentualer Anteil positiver Zellen an der Gesamtzellzahl für je 10 Bildausschnitte gefärbt via Immunhistochemie. Auswertung der Zellzahl via ImageJ, zweifache Zählung je Bildausschnitt mit Verwendung des Mittelwerts aus beiden Zählungen

|                   | CD20                                                           |                                  |                                                                | CD3                                                            |                                  |                                                                |
|-------------------|----------------------------------------------------------------|----------------------------------|----------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------|----------------------------------|----------------------------------------------------------------|
|                   | Durchschnitt<br>Anzahl<br>positive<br>Zellen pro<br>Ausschnitt | Gesamtzellzahl<br>pro Ausschnitt | Prozentualer<br>Anteil positive<br>Zellen an<br>Gesamtzellzahl | Durchschnitt<br>Anzahl<br>positive<br>Zellen pro<br>Ausschnitt | Gesamtzellzahl<br>pro Ausschnitt | Prozentualer<br>Anteil positive<br>Zellen an<br>Gesamtzellzahl |
| <b>PRAME_F5</b>   | 6,10                                                           | 59,95                            | 9,43 %                                                         | 13,65                                                          | 75,15                            | 18,85 %                                                        |
| <b>PRAME_F6</b>   | 2,85                                                           | 136,35                           | 2,24 %                                                         | 22,25                                                          | 187,35                           | 12,04 %                                                        |
| <b>PRAME_F7</b>   | 2,80                                                           | 62,55                            | 4,43 %                                                         | 11,45                                                          | 67,10                            | 17,48 %                                                        |
| <b>RPAME_F8</b>   | 0,05                                                           | 36,30                            | 0,20 %                                                         | 7,65                                                           | 54,15                            | 14,62 %                                                        |
| <b>ALK_22_6</b>   | 2,30                                                           | 138,10                           | 1,71 %                                                         | 4,35                                                           | 180,95                           | 2,33 %                                                         |
| <b>CAL_22_5</b>   | 1,70                                                           | 183,45                           | 0,97 %                                                         | 1,75                                                           | 91,75                            | 1,99 %                                                         |
| <b>ROS_22_6</b>   | 0,75                                                           | 123,50                           | 0,62 %                                                         | 0,55                                                           | 147,35                           | 0,37 %                                                         |
| <b>CD68_N8</b>    | 2,00                                                           | 96,35                            | 2,00 %                                                         | 1,55                                                           | 75,55                            | 2,07 %                                                         |
| <b>CD68_N9</b>    | 2,00                                                           | 66,25                            | 3,05 %                                                         | 1,75                                                           | 106,85                           | 1,72 %                                                         |
| <b>Mittelwert</b> | <b>2,28</b>                                                    | <b>100,31</b>                    | <b>2,74 %</b>                                                  | <b>7,22</b>                                                    | <b>109,58</b>                    | <b>7,94 %</b>                                                  |



Des Weiteren wurde für jedes Zielprotein die Gesamtzellzahl, sowie die Anzahl an positiv gefärbten Zellen für CD3 (T-Zell Marker) und CD20 (B-Zell Marker) für den kompletten Schnitt ermittelt und der Anteil vor und nach dem Panning miteinander verglichen. So war für jedes Zielprotein ein verminderter Anteil an CD3- sowie CD20- positiven Zellen an der Gesamtzellzahl zu erkennen. Hierbei wurde für beide Marker gleichermaßen eine teilweise drastische Verminderung des Anteils an der Gesamtzellzahl beobachtet, jedoch viel diese zumeist für CD3 stärker aus als für CD20. So wurde durch das Panning der Anteil an CD20-positiven Zellen pro Bildausschnitt von durchschnittlich 5,95 % auf 1,56 % gesenkt und somit um durchschnittlich auf 30,03 % der Ausgangsmenge verringert. Für CD3-positive Zellen wurde der Anteil an positiven Zellen von durchschnittlich 4,82 % auf 1,7 % gesenkt und somit auf durchschnittlich 47,02 % der Ausgangsmenge verringert (siehe Tabelle 13).

**Tabelle 13:** prozentualer Anteil an CD3 bzw. CD20-positiven Zellen aus der Gesamtzellzahl.

Es wurden Aliquots vor (Prä) und nach (Post) dem Panning verwendet, die Veränderung prä zu post zeigt die Verringerung des prozentualen Anteils nach dem Panning im Vergleich zu vor dem Panning an. Zellzählung erfolgte zweifach durch Auswertung via ImageJ, es wurde der Mittelwert jedes Werts aus der zweifachen Zählung verwendet. Zur Auswertung wurde die gesamte histologische Färbung verwendet.

|                                  | CD20                                                           |                                       |                                                                |                                | CD3                                                            |                                       |                                                                |                             |
|----------------------------------|----------------------------------------------------------------|---------------------------------------|----------------------------------------------------------------|--------------------------------|----------------------------------------------------------------|---------------------------------------|----------------------------------------------------------------|-----------------------------|
|                                  | Durchschnitt<br>Anzahl<br>positive<br>Zellen pro<br>Ausschnitt | Gesamt-<br>zellzahl pro<br>Ausschnitt | Prozentualer<br>Anteil positive<br>Zellen an<br>Gesamtzellzahl | Veränderu<br>ng post zu<br>prä | Durchschnitt<br>Anzahl<br>positive<br>Zellen pro<br>Ausschnitt | Gesamt-<br>zellzahl pro<br>Ausschnitt | Prozentualer<br>Anteil positive<br>Zellen an<br>Gesamtzellzahl | Veränderun<br>g post zu prä |
| ALK_22_6 prä                     | 35,65                                                          | 864,05                                | 4,14 %                                                         |                                | 37,75                                                          | 760,00                                | 4,96 %                                                         |                             |
| ALK_22_6 post                    | 2,30                                                           | 138,10                                | 1,71 %                                                         | -58,96 %                       | 4,35                                                           | 180,95                                | 2,33 %                                                         | -53,02 %                    |
| CAL_22_5 prä                     | 21,15                                                          | 720,10                                | 2,92 %                                                         |                                | 25,70                                                          | 819,20                                | 3,18 %                                                         |                             |
| CAL_22_5 post                    | 1,70                                                           | 183,45                                | 0,97 %                                                         | -66,78 %                       | 1,75                                                           | 91,75                                 | 1,99 %                                                         | -37,42 %                    |
| CAL_22_6 prä                     | 48,95                                                          | 758,70                                | 6,50 %                                                         |                                | 61,90                                                          | 787,85                                | 7,87 %                                                         |                             |
| CAL_22_6 post                    | 1,65                                                           | 171,10                                | 1,00 %                                                         | -84,62 %                       | X                                                              | X                                     | X                                                              | X                           |
| ROS_22_6 prä                     | 25,65                                                          | 662,40                                | 3,92 %                                                         |                                | 37,55                                                          | 735,25                                | 5,36 %                                                         |                             |
| ROS_22_6 post                    | 0,75                                                           | 123,50                                | 0,62 %                                                         | -84,18 %                       | 0,55                                                           | 147,35                                | 0,37 %                                                         | -93,10 %                    |
| CD68_N8 prä                      | 36,65                                                          | 280,85                                | 13,09 %                                                        |                                | 25,60                                                          | 476,30                                | 5,42 %                                                         |                             |
| CD68_N8 post                     | 2,00                                                           | 96,35                                 | 2,00 %                                                         | -84,72 %                       | 1,55                                                           | 75,55                                 | 2,07 %                                                         | -61,81 %                    |
| CD68_N9 prä                      | 14,90                                                          | 291,95                                | 5,16 %                                                         |                                | 5,25                                                           | 267,05                                | 2,14 %                                                         |                             |
| CD68_N9 post                     | 2,00                                                           | 66,25                                 | 3,05 %                                                         | -40,89 %                       | 1,75                                                           | 106,85                                | 1,72 %                                                         | -19,63 %                    |
| Mittelwert prä                   | <b>30,49</b>                                                   | <b>596,34</b>                         | <b>5,95 %</b>                                                  |                                | <b>32,29</b>                                                   | <b>640,94</b>                         | <b>4,82 %</b>                                                  |                             |
| Mittelwert post                  | <b>1,73</b>                                                    | <b>129,79</b>                         | <b>1,56 %</b>                                                  |                                | <b>1,99</b>                                                    | <b>120,49</b>                         | <b>1,70 %</b>                                                  |                             |
| Mittelwert Vergleich<br>post/prä |                                                                |                                       |                                                                | <b>-70,03 %</b>                |                                                                |                                       |                                                                | <b>-53,00 %</b>             |

Im nächsten Schritt wurde die Funktionalität des Pannings mittels Anbindung des Zielpeptids via Avidin mit anderen Bindungsmethoden sowie Negativkontrollen verglichen. Hierzu wurde die Standardmethode der Anbindung des Biotin-gekoppelten Zielpeptids mittels Avidin verglichen mit der Anbindung des OVA-gekoppelten Peptids sowie der Verwendung eines falschen Biotin-gekoppelten Peptids (nicht Zielpeptid). Hierbei zeigt sich, dass eine Verringerung prä- zu post-Panning bei einer Anbindung des Avidin-gekoppelten Zielpeptids über Avidin zu einer Verringerung von 69,98 % für CD20 und von 53,00 % für CD3 führte (Tabelle 14).

Eine Anbindung des Ovalbumin-gekoppelten Zielpeptids führte zu einer Verringerung um 75,97 % für CD20 und 29,93 % für CD3 (Tabelle 15).

Eine Beschichtung der Zellkulturplatte mit einem Peptid, welches nicht zur Immunisierung verwendet wurde, als Negativkontrolle, führte zu einer Verringerung der durchschnittlichen prozentualen Anteils positiver Zellen um 68,45 % der CD20-positiven Zellen und um 55,72 % der CD3-positiven Zellen (Tabelle 16). Eine Beschichtung der Platte nur mit Avidin aber ohne Peptid führte zu einer Veränderung des prozentualen Anteil und CD20-positiven Zellen um 45,80 % der Ausgangsmenge und um 13,86 % für CD3-positiven Zellen (Tabelle 17).

Wurde die Platte zuvor mit nichts beschichtet, verringerte sich der prozentuale Anteil an CD20-positiven Zellen um 76,13 % und um 4,82 % an CD3-positiven Zellen (Tabelle 18).



**Tabelle 14:** prozentualer Anteil an CD3 bzw. CD20-positiven Zellen aus der Gesamtzellzahl nach einem Panning mittels Biotin-gekoppelten Zielpeptid über Avidin an der Platte.

Es wurden Aliquots vor (Prä) und nach (Post) dem Panning verwendet, die Veränderung prä zu post zeigt die Veränderung des prozentualen Anteils nach dem Panning im Vergleich zu vor dem Panning an. Zellzählung erfolgte zweifach durch Auswertung via ImageJ, es wurde der Mittelwert jedes Werts aus der zweifachen Zählung verwendet. Zur Auswertung wurde die gesamte histologische Färbung verwendet.

| normales Coating mit eBio     | CD20                           |                |                          |             | CD3                            |                |                          |             |
|-------------------------------|--------------------------------|----------------|--------------------------|-------------|--------------------------------|----------------|--------------------------|-------------|
|                               | Durchschnitt                   |                | Prozentualer             |             | Durchschnitt                   |                | Prozentualer             |             |
|                               | Anzahl                         | Gesamtzellzahl | Anteil positive          | Veränderung | Anzahl                         | Gesamtzellzahl | Anteil positive          | Veränderung |
|                               | positive Zellen pro Ausschnitt | pro Ausschnitt | Zellen an Gesamtzellzahl | post zu prä | positive Zellen pro Ausschnitt | pro Ausschnitt | Zellen an Gesamtzellzahl | post zu prä |
| ALK_22_6 prä                  | 35,65                          | 864,05         | 4,14 %                   |             | 37,75                          | 760,00         | 4,96 %                   |             |
| ALK_22_6 post                 | 2,30                           | 138,10         | 1,71 %                   | -58,70 %    | 4,35                           | 180,95         | 2,33 %                   | -53,02 %    |
| CAL_22_5 prä                  | 21,15                          | 720,10         | 2,92 %                   |             | 25,70                          | 819,20         | 3,18 %                   |             |
| CAL_22_5 post                 | 1,70                           | 183,45         | 0,97 %                   | -66,78 %    | 1,75                           | 91,75          | 1,99 %                   | -37,42 %    |
| CAL_22_6 prä                  | 48,95                          | 758,70         | 6,50 %                   |             | 61,90                          | 787,85         | 7,87 %                   |             |
| CAL_22_6 post                 | 1,65                           | 171,10         | 1,00 %                   | -84,62 %    | X                              | X              | X                        | X           |
| ROS_22_6 prä                  | 25,65                          | 662,40         | 3,92 %                   |             | 37,55                          | 735,25         | 5,36 %                   |             |
| ROS_22_6 post                 | 0,75                           | 123,50         | 0,62 %                   | -84,18 %    | 0,55                           | 147,35         | 0,37 %                   | -93,10 %    |
| CD68_N8 prä                   | 36,65                          | 280,85         | 13,09 %                  |             | 25,6                           | 476,30         | 5,42 %                   |             |
| CD68_N8 eBio_CD68 post        | 2,00                           | 96,35          | 2,00 %                   | -84,72 %    | 1,55                           | 75,55          | 2,07 %                   | -61,81 %    |
| CD68_N9 prä                   | 14,90                          | 291,95         | 5,16 %                   |             | 5,25                           | 267,05         | 2,14 %                   |             |
| CD68_N9 eBio_CD68 post        | 2,00                           | 66,25          | 3,05 %                   | -40,89 %    | 1,75                           | 106,85         | 1,72 %                   | -19,63 %    |
| Mittelwert prä                | 30,49                          | 596,34         | 5,95 %                   |             | 32,29                          | 640,94         | 4,82 %                   |             |
| Mittelwert post               | 1,73                           | 129,79         | 1,56 %                   |             | 1,99                           | 120,49         | 1,70 %                   |             |
| Mittelwert Vergleich prä/post |                                |                |                          | -69,98 %    |                                |                |                          | -53,00 %    |

**Tabelle 15:** prozentualer Anteil an CD3 bzw. CD20-positiven Zellen aus der Gesamtzellzahl nach einem Panning mittels OVA-gekoppeltem Zielpeptid an die Platte.

Es wurden Aliquots vor (Prä) und nach (Post) dem Panning verwendet, die Veränderung prä zu post zeigt die Veränderung des prozentualen Anteils nach dem Panning im Vergleich zu vor dem Panning an. Zellzählung erfolgte zweifach durch Auswertung via ImageJ, es wurde der Mittelwert jedes Werts aus der zweifachen Zählung verwendet. Zur Auswertung wurde die gesamte histologische Färbung verwendet.

| Coating mit OVA        | CD20                                  |                               |                                          |                         | CD3                                   |                               |                                          |                         |
|------------------------|---------------------------------------|-------------------------------|------------------------------------------|-------------------------|---------------------------------------|-------------------------------|------------------------------------------|-------------------------|
|                        | Durchschnitt                          |                               | Prozentualer                             |                         | Durchschnitt                          |                               | Prozentualer                             |                         |
|                        | Anzahl positive Zellen pro Ausschnitt | Gesamtzellzahl pro Ausschnitt | Anteil positive Zellen an Gesamtzellzahl | Veränderung post zu prä | Anzahl positive Zellen pro Ausschnitt | Gesamtzellzahl pro Ausschnitt | Anteil positive Zellen an Gesamtzellzahl | Veränderung post zu prä |
| CD68_N9 prä            | 14,90                                 | 291,95                        | 5,16 %                                   |                         | 5,25                                  | 267,05                        | 2,14 %                                   |                         |
| CD68_N9 OVA_CD68 post  | 0,95                                  | 98,50                         | 0,93 %                                   | -81,89 %                | 3,20                                  | 176,85                        | 1,80 %                                   | -15,98 %                |
| CD68_N10 prä           | 21,20                                 | 334,15                        | 6,66 %                                   |                         | 7,05                                  | 413,70                        | 1,66 %                                   |                         |
| CD68_N10 OVA_CD68 post | 4,40                                  | 220,45                        | 2,00 %                                   | -69,97 %                | 3,20                                  | 176,85                        | 0,93 %                                   | -43,98 %                |
| Mittelwert prä         | 18,05                                 | 313,05                        | 5,91 %                                   |                         | 6,15                                  | 340,38                        | 1,90 %                                   |                         |
| Mittelwert post        | 2,68                                  | 159,48                        | 1,46 %                                   |                         | 3,20                                  | 176,85                        | 1,37 %                                   |                         |
| Mittelwert prä/post    |                                       |                               |                                          | -75,97 %                |                                       |                               |                                          | -29,93 %                |

**Tabelle 16:** prozentualer Anteil an CD3 bzw. CD20-positiven Zellen aus der Gesamtzellzahl nach einem Panning über ein Biotin-gekoppeltem Peptid mit welchem nicht immunisiert wurde über Avidin an die Platte.

Es wurden Aliquots vor (Prä) und nach (Post) dem Panning verwendet, die Veränderung prä zu post zeigt die Verringerung des prozentualen Anteils nach dem Panning im Vergleich zu vor dem Panning an. Zellzählung erfolgte zweifach durch Auswertung via ImageJ, es wurde der Mittelwert jedes Werts aus der zweifachen Zählung verwendet. Zur Auswertung wurde die gesamte histologische Färbung verwendet.

| Coating mit falschem Peptid (Negativkontrolle) | CD20                                  |                               |                                          |                         | CD3                                   |                               |                                          |                         |
|------------------------------------------------|---------------------------------------|-------------------------------|------------------------------------------|-------------------------|---------------------------------------|-------------------------------|------------------------------------------|-------------------------|
|                                                | Durchschnitt                          |                               | Prozentualer                             |                         | Durchschnitt                          |                               | Prozentualer                             |                         |
|                                                | Anzahl positive Zellen pro Ausschnitt | Gesamtzellzahl pro Ausschnitt | Anteil positive Zellen an Gesamtzellzahl | Veränderung post zu prä | Anzahl positive Zellen pro Ausschnitt | Gesamtzellzahl pro Ausschnitt | Anteil positive Zellen an Gesamtzellzahl | Veränderung post zu prä |
| CD68_N8 prä                                    | 36,65                                 | 280,85                        | 13,09 %                                  |                         | 25,60                                 | 476,30                        | 5,42 %                                   |                         |
| CD68_N8 eBio_PRAME post                        | 1,70                                  | 41,75                         | 4,13 %                                   | -68,45 %                | 3,20                                  | 176,85                        | 2,40 %                                   | -55,72 %                |
| Mittelwert prä                                 | 36,65                                 | 280,85                        | 13,09 %                                  |                         | 25,60                                 | 476,30                        | 5,42 %                                   |                         |
| Mittelwert post                                | 1,70                                  | 41,75                         | 4,13 %                                   |                         | 3,20                                  | 176,85                        | 2,40 %                                   |                         |
| Mittelwert Vergleich prä/post                  |                                       |                               |                                          | -68,45 %                |                                       |                               |                                          | -55,72 %                |

**Tabelle 17:** prozentualer Anteil an CD3 bzw. CD20-positiven Zellen aus der Gesamtzellzahl nach einem Panning mit einer Platte, welche nur mit Avidin beschichtet wurde, jedoch nicht mit dem Ziepeptid.

Es wurden Aliquots vor (Prä) und nach (Post) dem Panning verwendet, die Veränderung prä zu post zeigt die Verringerung des prozentualen Anteils nach dem Panning im Vergleich zu vor dem Panning an. Zellzählung erfolgte zweifach durch Auswertung via ImageJ, es wurde der Mittelwert jedes Werts aus der zweifachen Zählung verwendet. Zur Auswertung wurde die gesamte histologische Färbung verwendet.

| Nur Avidin, Kein Peptid       | CD20                           |                |                          |             | CD3                            |                |                          |             |
|-------------------------------|--------------------------------|----------------|--------------------------|-------------|--------------------------------|----------------|--------------------------|-------------|
|                               | Durchschnitt                   |                | Prozentualer             |             | Durchschnitt                   |                | Prozentualer             |             |
|                               | Anzahl                         | Gesamtzellzahl | Anteil positive          | Veränderung | Anzahl                         | Gesamtzellzahl | Anteil positive          | Veränderung |
|                               | positive Zellen pro Ausschnitt | pro Ausschnitt | Zellen an Gesamtzellzahl | post zu prä | positive Zellen pro Ausschnitt | pro Ausschnitt | Zellen an Gesamtzellzahl | post zu prä |
| CD68_N10 prä                  | 21,2                           | 334,15         | 6,66 %                   |             | 7,05                           | 413,70         | 1,66 %                   |             |
| CD68_N10 nur Avidin post      | 1,30                           | 45,35          | 3,61 %                   | -45,80 %    | 3,20                           | 176,85         | 1,89 %                   | -13,86 %    |
| Mittelwert prä                | 21,20                          | 334,15         | 6,66 %                   |             | 7,05                           | 413,70         | 1,66 %                   |             |
| Mittelwert post               | 1,30                           | 45,35          | 3,61 %                   |             | 3,20                           | 176,85         | 1,89 %                   |             |
| Mittelwert Vergleich prä/post |                                |                |                          | -45,80 %    |                                |                |                          | -13,86 %    |

**Tabelle 18:** prozentualer Anteil an CD3 bzw. CD20-positiven Zellen aus der Gesamtzellzahl nach einem Panning mit einer Platte, welche nicht beschichtet wurde (kein Bindeprotein und Zielpeptid).

Es wurden Aliquots vor (Prä) und nach (Post) dem Panning verwendet, die Veränderung prä zu post zeigt die Veränderung des prozentualen Anteils nach dem Panning im Vergleich zu vor dem Panning an. Zellzählung erfolgte zweifach durch Auswertung via ImageJ, es wurde der Mittelwert jedes Werts aus der zweifachen Zählung verwendet. Zur Auswertung wurde die gesamte histologische Färbung verwendet.

| Kein Peptid                   | CD20                           |                |                          |             | CD3                            |                |                          |             |
|-------------------------------|--------------------------------|----------------|--------------------------|-------------|--------------------------------|----------------|--------------------------|-------------|
|                               | Durchschnitt                   |                | Prozentualer             |             | Durchschnitt                   |                | Prozentualer             |             |
|                               | Anzahl                         | Gesamtzellzahl | Anteil positive          | Veränderung | Anzahl                         | Gesamtzellzahl | Anteil positive          | Veränderung |
|                               | positive Zellen pro Ausschnitt | pro Ausschnitt | Zellen an Gesamtzellzahl | post zu prä | positive Zellen pro Ausschnitt | pro Ausschnitt | Zellen an Gesamtzellzahl | post zu prä |
| CD68_N10 prä                  | 21,20                          | 334,15         | 6,66 %                   |             | 7,05                           | 413,70         | 1,66 %                   |             |
| CD68_N10 nichts post          | 2,70                           | 163,75         | 1,59 %                   | -76,13 %    | 3,20                           | 176,85         | 1,58 %                   | -4,82 %     |
| Mittelwert prä                | 21,20                          | 334,15         | 6,66 %                   |             | 7,05                           | 413,70         | 1,66 %                   |             |
| Mittelwert post               | 2,70                           | 163,75         | 1,59 %                   |             | 3,20                           | 176,85         | 1,58 %                   |             |
| Mittelwert Vergleich prä/post |                                |                |                          | -76,13 %    |                                |                |                          | -4,82 %     |

### 3.1.3 Einfluss Klonierungsverfahren

Zur Analyse der Effizienz des verwendeten Klonierungsverfahrens wurden verschiedene Methoden verglichen. Hierzu wurde die etablierte Methode der Fusion von Myeloma- und B-Lymphozyten mittels PEG1500 mit weiter optimierten Methoden verglichen: 1. Vor der Fusionierung ein B-Zell Panning mittels der zur Immunisierung verwendeten Peptide 2. Nach der Fusionierung Inkubation der Zellen in einem semi-solid Medium zur sofortigen Erstellung der Klonalität. Hierzu wurden Mäuse mit denselben Peptiden für das Zielprotein CD68 immunisiert und mittels der drei genannten Methoden fusioniert und weiter verarbeitet. Die ELISA-Werte des ersten ELISAs nach der Fusionierung wurden hierbei verglichen. Es zeigt sich für die Fusionierung nach der etablierten Methode, dass keine Klone erstellt werden konnten. Für die optimierte Fusion mittels B-Zell Panning konnten im Vergleich zur semi-solid Methode weniger Klone erstellt werden, jedoch waren die ELISA-Werte der erstellten Klone etwa vergleichbar. Auch der spätere Verlauf der Klone war für manche Klone bei beiden Verfahren positiv, jedoch konnten aufgrund der größeren Menge an Klonen, erstellt durch die semi-solid Methode, auch final mehr Klone mit positiven Färbereigenschaften erstellt werden (Tabelle 19).

**Tabelle 19:** Analyse der Effizienz des Erstellungsverfahrens von Hybridomaklonen mittels Standardprotokoll, dem Inkubieren der Hybridoma-Klone erstellt nach Standardprotokoll in semi-solid Medium und solchen Hybridoma-Klonen, welche vor Fusion nach Standardprotokoll mittels B-Zell Panning selektiert wurden.  
Es wurde hierbei der ELISA-Wert der verschiedenen Klone nach 4 Wochen (1. ELISA) verglichen.

| Maus                                 | Klon                    | Peptid  | 1. ELISA | Zellkultur                       |
|--------------------------------------|-------------------------|---------|----------|----------------------------------|
| CD68_N7<br>semi-solid Methode        | 1E7                     | CD68_N1 | 0,4113   | 100 % Klon                       |
|                                      | 2G3                     |         | 0,3844   | 100 % Klon                       |
|                                      | 3A5                     |         | 0,3963   | 100 % Klon                       |
|                                      | 3F10                    |         | 0,4063   | Klon fällt raus da 2. ELISA neg. |
|                                      | 4B1                     |         | 0,3283   | 100 % Klon                       |
|                                      | 4F5                     |         | 0,365    | Klon fällt raus da 2. ELISA neg. |
|                                      | 4H3                     |         | 0,3706   | 100 % Klon                       |
|                                      | 6A9                     |         | 0,4434   | Klon fällt raus da 2. ELISA neg. |
|                                      | 6D2                     |         | 0,4976   | 100 % Klon                       |
|                                      | 6F9                     |         | 0,6973   | 100 % Klon                       |
|                                      | 7A10                    |         | 0,3417   | Klon fällt raus da 2. ELISA neg. |
|                                      | 7B10                    |         | 0,3703   | Klon fällt raus da 2. ELISA neg. |
|                                      | 7E10                    |         | 0,3441   | Klon fällt raus da 2. ELISA neg. |
|                                      | 7H3                     |         | 0,5147   | 100 % Klon                       |
|                                      | 9A4                     |         | 0,3371   | 100 % Klon                       |
|                                      | 9D7                     |         | 0,5365   | 100 % Klon                       |
|                                      | 9F4                     |         | 0,3386   | 100 % Klon                       |
| CD68_N9<br>Panning-Methode           | 3H10                    | CD68_N1 | 0,3597   | 100 % Klon                       |
|                                      | 4A3                     |         | 0,2347   | Klon verstorben                  |
|                                      | 4E7                     |         | 0,3515   | 100 % Klon                       |
| CD68_N8 & CD68_N10<br>normale Fusion | keine Klone<br>erhalten |         |          |                                  |

### 3.2 Einfluss der Puffer-Zusammensetzung auf die immunhistologische Färbung

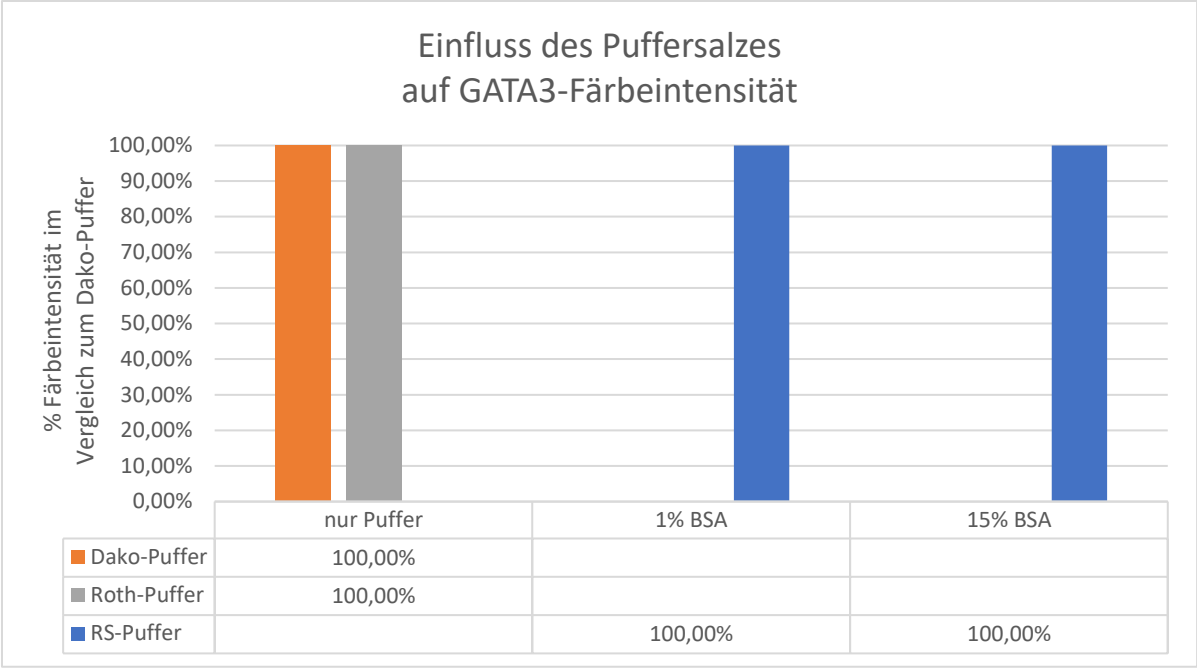
Die Zusammensetzung der verwendeten Verdünnungspuffer in der immunhistologischen Färbungen können einen starken Einfluss auf die Funktionalität des Antikörpers und die daraus resultierenden Färbeergebnisse haben. Eine Vielzahl von Faktoren wie Puffersalze, zugesetzte Trägerproteine oder zugesetzte Chemikalien können sowohl chemische als auch physikalischen Einfluss auf die Funktionalität des Antikörpers haben. Diese Einflüsse sollen im Folgenden genauer analysiert werden.

#### 3.2.1 Einfluss des Puffersalzes (PBS/TBS) bzw. pH

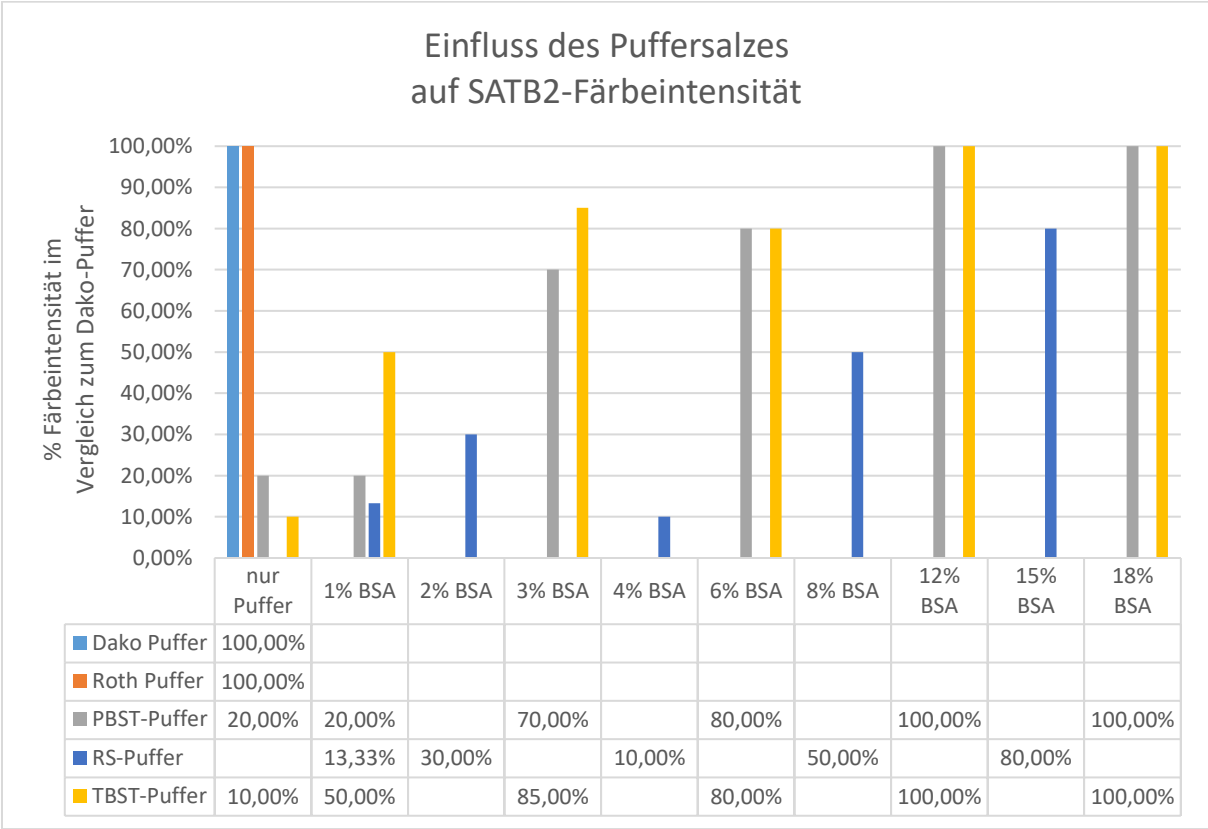
Um den Einfluss verschiedener Puffer zu testen, wurden zwei kommerzielle IHC-Puffer (Firma Roth pH 7,4 und Firma Agilent/Dako pH 7,2), sowie drei selbst hergestellte IHC-Puffer miteinander verglichen. Dabei handelte es sich um einen „typischen“ (wie in der einschlägigen Literatur oft beschrieben) Puffer aus PBS + 1 % BSA + 0,2 % Tween-20 + 0,05 % NaN<sub>3</sub> (hier RS-Puffer genannt), und um zwei „Minimal-Puffer“ aus PBS + Tween-20 bzw. TBS + Tween-20 mit einem pH Wert von 7,2 (PBS-basiert) bzw. 7,4 (TBS-basiert).

Im Vergleich zeigt sich bei Färbungen des Proteins GATA3 mit den verschiedenen Puffern kein Unterschied in der Färbeintensität. Der selbst erstellte RS-Puffer zeigte ähnlich gute Färbeintensitäten für GATA3 wie die beiden kommerziellen Puffer, unabhängig von der zugegebenen Menge an BSA (Abbildung 14).

Bei Färbungen des Proteins SATB2 zeigte sich eine eindeutig bessere Färbeintensität bei der Verwendung der kommerziellen IHC-Puffer im Vergleich zu den drei selbst erstellten Puffern. Es konnte nur bei einer Zugabe von mehr als 10 % BSA eine ähnliche Färbeintensität bei manchen selbst erstellten Puffern erzielt werden (Abbildung 15).



**Abbildung 14:** relative Färbeintensität von GATA3 desselben Spots bei Zugabe unterschiedlicher Konzentrationen BSA in kommerziellem Puffer im Vergleich zu selbst erstelltem PBST- bzw. TBST-basiertem Puffer. Färbeintensität im Vergleich zum Färberesultat mit dem kommerziellen Puffer von Dako.



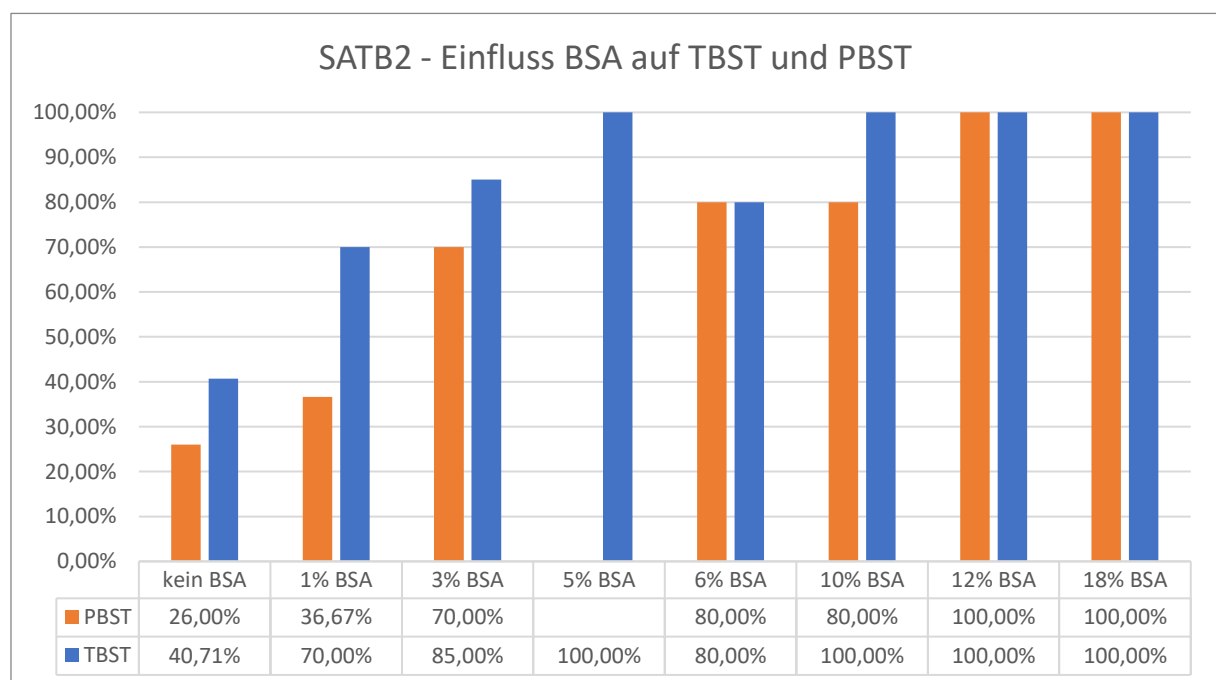
**Abbildung 15:** relative Färbeintensität von SATB2 desselben Spots bei Zugabe unterschiedlicher Konzentrationen BSA in kommerziellem Puffer im Vergleich zu selbst erstelltem PBST- bzw. TBST-basiertem Puffer. Färbeintensität im Vergleich zum Färberesultat mit dem kommerziellen Puffer von Dako.

### 3.2.2 Einfluss von Trägerprotein

#### 3.2.2.1 Einfluss von BSA

BSA ist das typischste Trägerprotein, welches in der Immunhistochemie verwendet wird. Der Vorteil von BSA ist, dass man es in pulverisierter Form hoch standardisiert kaufen kann und somit immer einen reproduzierbaren Puffer herstellen kann, jedoch ist BSA sehr teuer.

Zur Evaluation des Einflusses des BSA-Gehalts auf die Färbeintensität wurden unterschiedliche Konzentrationen von BSA (0 %- 18 %) im PBST- und TBST- Puffer getestet. Es wurde die Färbeintensität des Colongewebes durch den SATB2-Antikörper im Vergleich zum Dako-Puffer als Referenz getestet. Für den PBST-Puffer wird eine vergleichbare Färbeintensität mit dem Puffer wie durch den Dako-Puffer bei einer BSA-Konzentration von >10 % erreicht. Für den TBST-Puffer ist die Färbung schon bei >3 % BSA vergleichbar mit der Färbeintensität des Dako-Puffers (Abbildung 16).



**Abbildung 16:** relative Färbeintensität von SATB2 desselben Spots bei Zugabe unterschiedlicher Konzentrationen BSA zum selbst erstellten PBST- bzw. TBST-basierten Puffern.

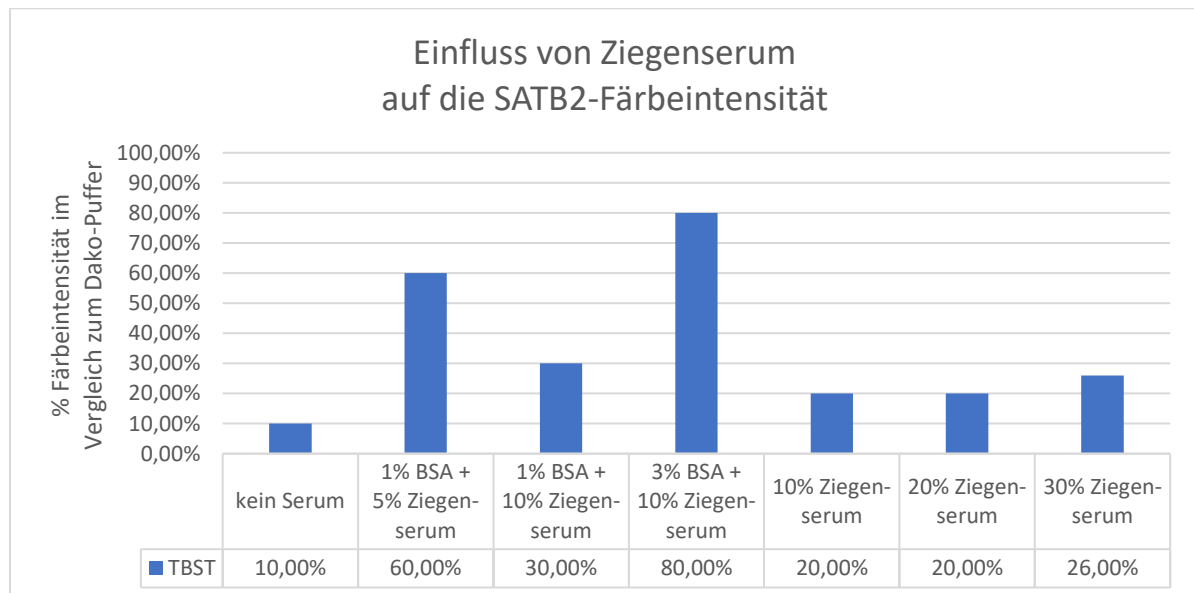
Färbeintensität prozentuell im Vergleich zur Färbeintensität von SATB2 mit dem kommerziellen Puffer von Dako.



### 3.2.2.2 Einfluss von Ziegenserum

Anstatt BSA können auch andere Serumproteine verwenden. Ziegenserum bietet sich an, da es in großen Mengen billig eingekauft werden kann. Hierbei handelt es sich jedoch nicht um ein standardisiertes Produkt. In diesem Versuchsabschnitt sollte geklärt werden, ob Ziegenserum den gleichen Einfluss wie BSA hat und ob sich durch die Kombination von BSA und Ziegenserum die Färbeintensität noch weiter steigern lässt.

Der Einfluss von Ziegenserum als alternatives Serumprotein wurde in steigender Konzentration im TBST-Puffer als alleinige Proteinquelle und in Kombination mit BSA getestet. Es zeigt sich, dass keine der verwendeten Konzentrationen an Ziegenserum eine vergleichbare Färbeintensität des Colongewebes bei einer SATB2-Färbung erreicht wie der Dako-Puffer (Abbildung 17).



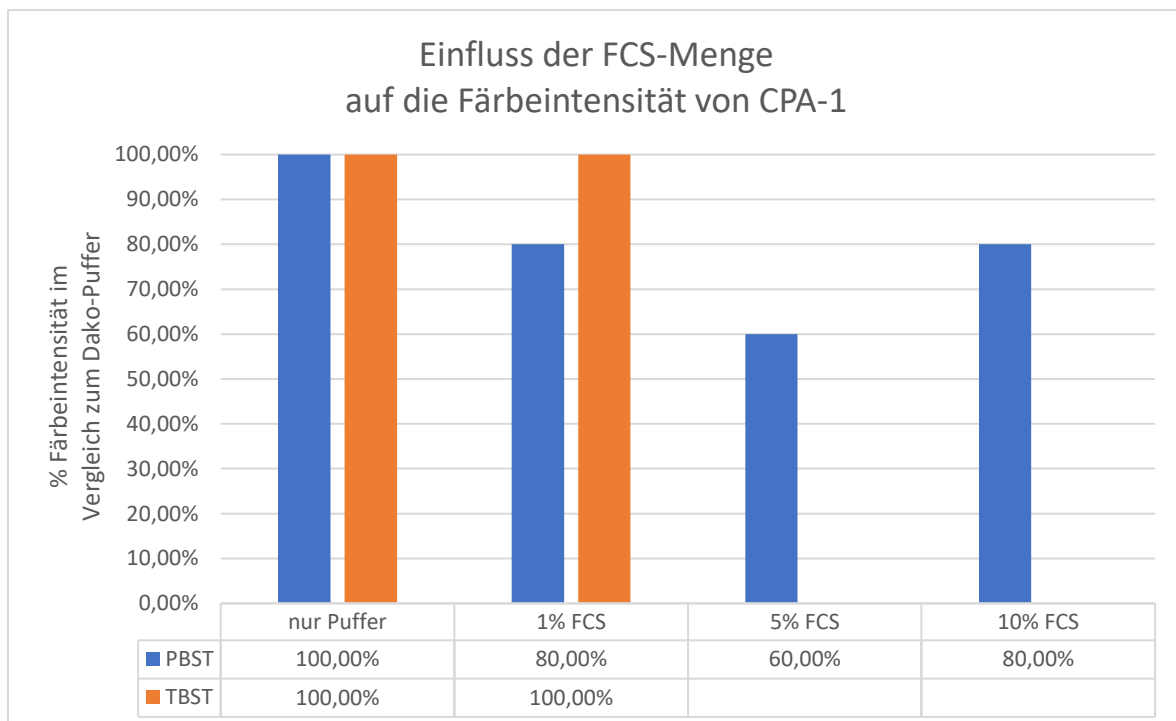
**Abbildung 17:** relative Färbeintensität von SATB2 desselben Spots bei Zugabe unterschiedlicher Konzentrationen BSA und Ziegenserum in TBST- basiertem Puffer.

Färbeintensität prozentuell im Vergleich zur Färbeintensität von SATB2 mit dem kommerziellen Puffer von Dako.

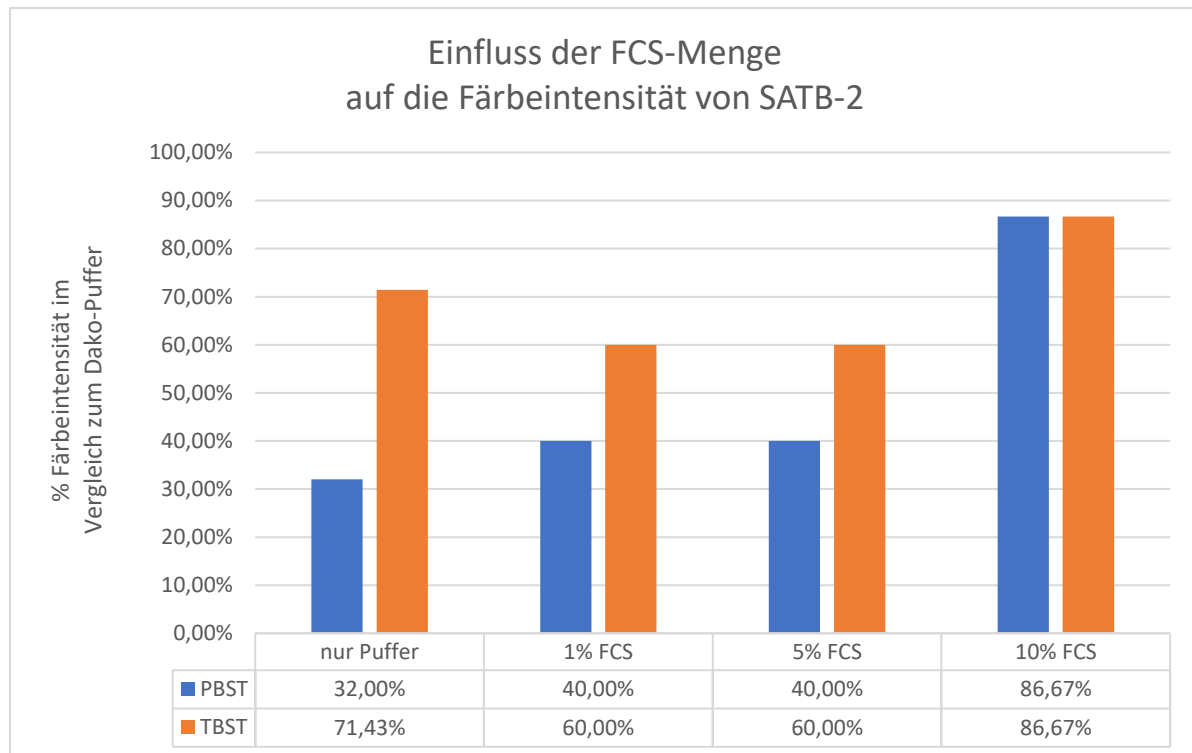
### 3.2.2.3 Einfluss von FCS

Zur Analyse des Einflusses von fötalem Kälberserum (FCS) als weitere alternative Proteinquelle auf die Färbeintensität wurden steigende Konzentrationen an FCS (0- 10 %) in PBST- und TBST-Puffern bei der Färbung mit dem CPA1- und SATB2-Antikörper verwendet. Es zeigt sich für die CPA1-Färbung im Pankreasgewebe im PBST-Puffer unabhängig vom FCS-Gehalt keine Vergleichbarkeit des Färbeergebnisses mit dem Dako-Puffer. Im TBST-Puffer zeigte sich schon bei 1 % FCS eine vergleichbare Färbeintensität wie im Dako-Puffer (Abbildung 18).

Für die SATB2-Färbung im Colongewebe zeigt sich im PBST-Puffer nur bei 10 % FCS eine ansatzweise vergleichbare Färbeintensität wie mit dem Dako-Puffer, dasselbe gilt für den TBST-Puffer (Abbildung 19).



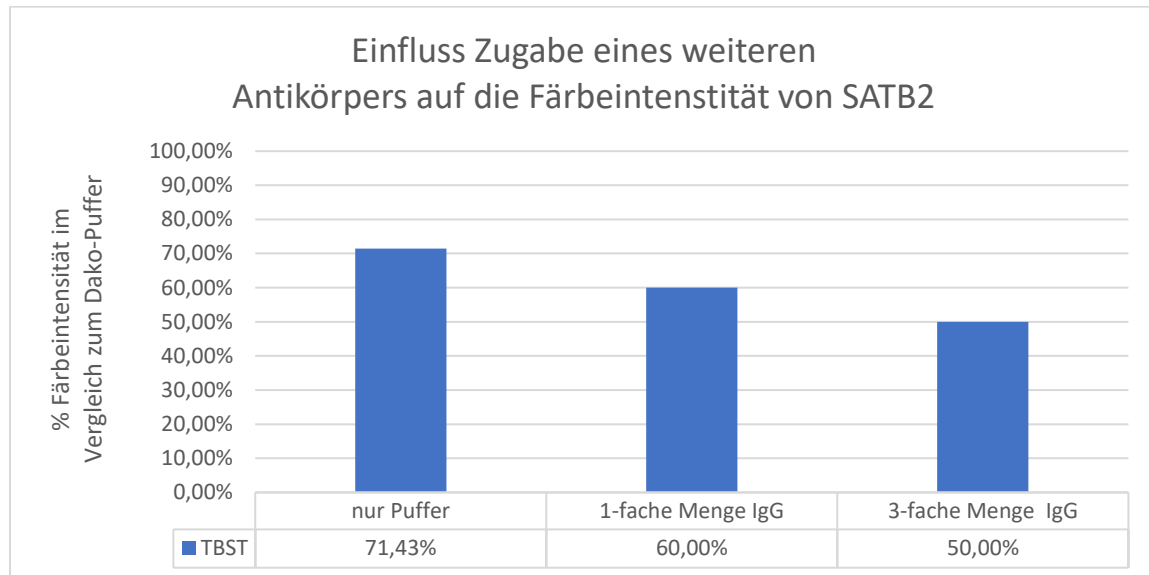
**Abbildung 18:** relative Färbeintensität von CPA1 desselben Spots bei Zugabe unterschiedlicher Konzentrationen fötalem Kälberserum (FCS) in PBST- und TBST- basiertem Puffer.  
Färbeintensität prozentuell im Vergleich zur Färbeintensität von SATB2 mit dem kommerziellen Puffer von Dako.



**Abbildung 19:** relative Färbeintensität von SATB2 desselben Spots bei Zugabe unterschiedlicher Konzentrationen fötalem Kälberserum (FCS) in PBST- und TBST- basiertem Puffer.  
Färbeintensität prozentuell im Vergleich zur Färbeintensität von SATB2 mit dem kommerziellen Puffer von Dako.

#### 3.2.2.4 Einfluss weitere Antikörper

Der Einfluss der Anwesenheit eines weiteren Antikörpers im Puffer wurde bei der Färbung von Colongewebe mit dem SATB2-Antikörper evaluiert. Es wurde hierbei im TBST-Puffer kein weiterer Antikörper, dieselbe Menge und die dreifache Menge an zusätzlichem Antikörper hinzugegeben. Keiner der Konditionen erstellte ein vergleichbares Färbeergebnis wie der Dako-Puffer (Abbildung 20).

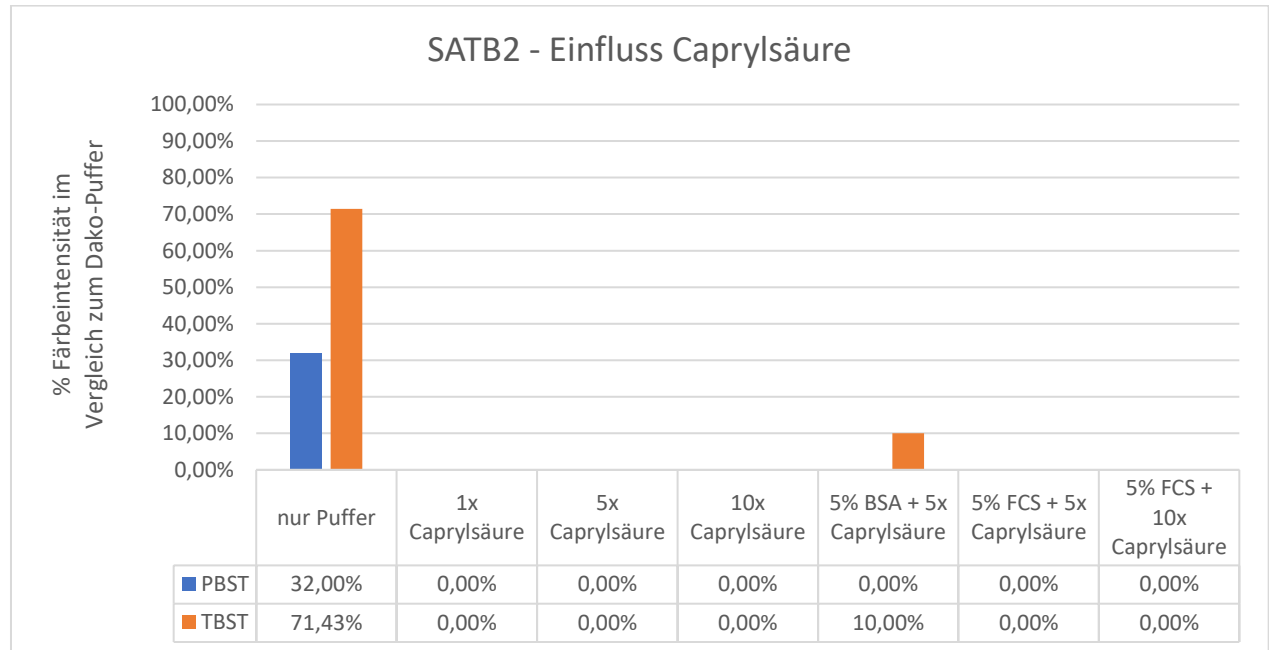


**Abbildung 20:** relative Färbeintensität von SATB2 desselben Spots bei Zugabe unterschiedlicher Mengen eines weiteren IgG-Antikörpers zu TBST- basiertem Puffer. Färbeintensität prozentuell im Vergleich zur Färbeintensität von SATB2 mit dem kommerziellen Puffer von Dako.

### 3.2.3 Einfluss von anderen Chemikalien

#### 3.2.3.1 Einfluss von Caprylsäure

Der Einfluss des Zusatzes von Caprylsäure als weiteren Zusatzstoff im Verdünnungspuffer wurde in verschiedenen Konzentrationen Caprylsäure (0 %-10 %) in An- und Abwesenheit von FCS bzw. BSA (jeweils 5 %) im PBST- und TBST-Puffer getestet. Die SATB2-Färbung des Colongewebes ist in keinem der getesteten Konditionen und Puffern vergleichbar mit den Ergebnissen der Färbung mit dem Dako-Puffer (Abbildung 21).



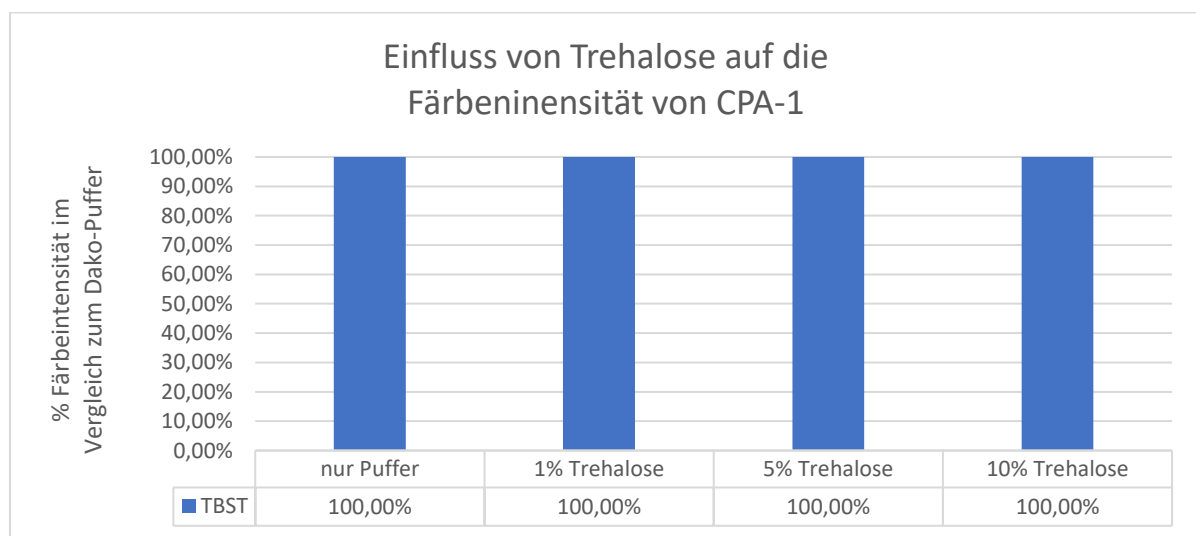
**Abbildung 21:** relative Färbeintensität von SATB2 desselben Spots bei Zugabe unterschiedlicher Mengen Caprylsäure und BSA bzw. fötales Kälberserum zu PBST- bzw. TBST- basiertem Puffer.

Färbeintensität prozentuell im Vergleich zur Färbeintensität von SATB2 mit dem kommerziellen Puffer von Dako.

### 3.2.3.2 Einfluss Trehalose

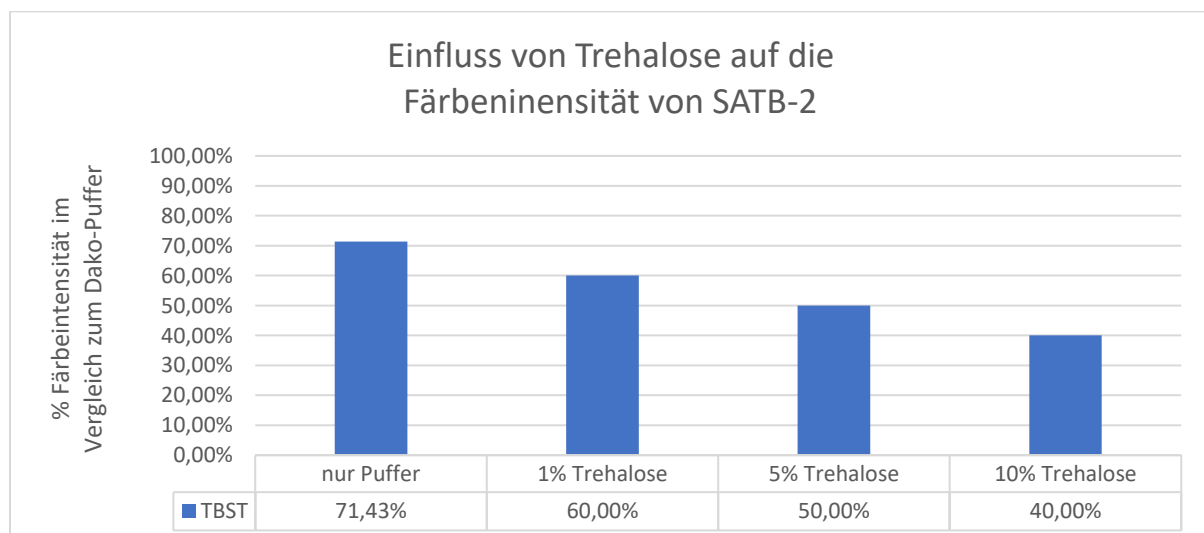
Zur Evaluierung des Einflusses von Trehalose als Zusatz zur Proteinstabilisierung auf die Färbeintensität, wurden verschiedene Konzentrationen Trehalose (0 %- 10 %) dem TBST-Puffer hinzugegeben. Die Färbeergebnisse des Pankreasgewebe sind für den CPA1-Antikörper in jeder Kondition vergleichbar mit den Ergebnissen der Färbung mit dem Dako-Puffer (Abbildung 22).

Für den SATB2-Puffer zeigt sich bei der Färbung von SATB2 im Colongewebe unter keiner getesteten Kondition ein vergleichbares Ergebnis wie bei einer Färbung mit dem Dako-Puffer (Abbildung 23).



**Abbildung 22:** relative Färbeintensität von CPA1 desselben Spots bei Zugabe unterschiedlicher Mengen Trehalose zu TBST-basiertem Puffer.

Färbeintensität prozentuell im Vergleich zur Färbeintensität von SATB2 mit dem kommerziellen Puffer von Dako.

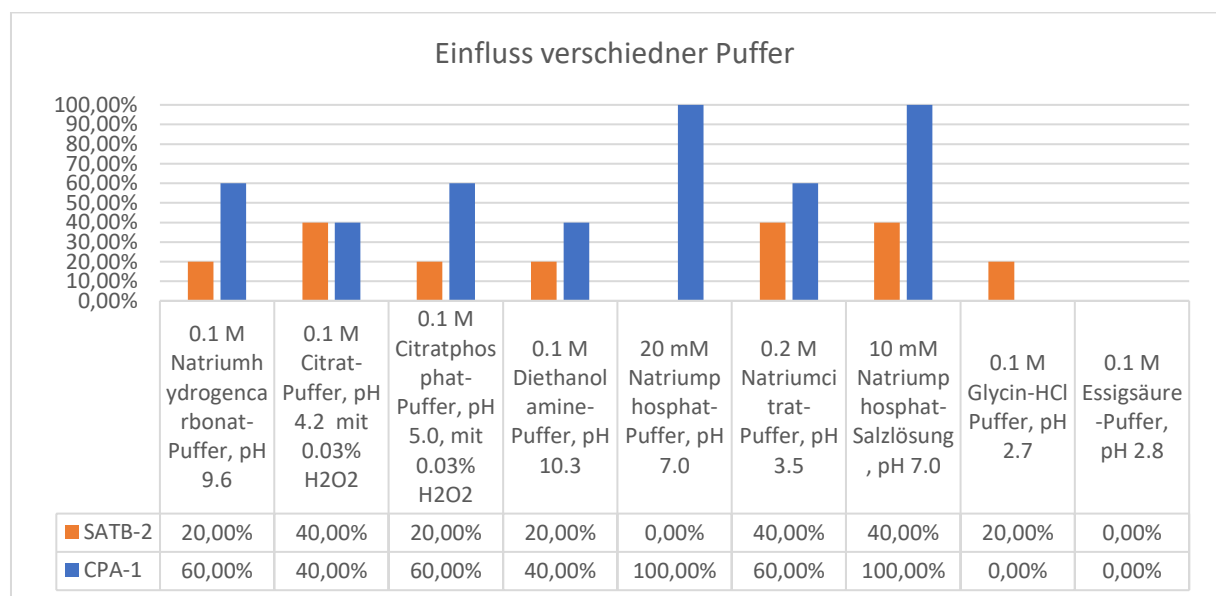


**Abbildung 23:** relative Färbeintensität von SATB2 desselben Spots bei Zugabe unterschiedlicher Mengen Trehalose zu TBST-basiertem Puffer.

Färbeintensität prozentuell im Vergleich zur Färbeintensität von SATB2 mit dem kommerziellen Puffer von Dako.

### 3.2.4 Einfluss weiterer Puffer

Es wurden weitere veröffentlichte Puffer-Rezepte auf ihre Verwendbarkeit als Antikörper-Diluent für die Immunhistochemie getestet. Es zeigt sich hierbei bei Verwendung des CPA-1 und SATB-2 Antikörpers ein vergleichbares Färbeergebnis mit dem Referenzpuffer von Dako für folgende Puffer-Rezepte: 20 mM Natriumphosphat (pH 7.0) und 10 mM Natriumphosphat-Salzlösung, pH 7.0. Es zeigte sich jedoch bei der Verwendung der gleichen Puffer bei einer Färbung mit dem SATB-2 Antikörper, dass keiner der Puffer ein vergleichbares Färbeergebnis zum Referenzpuffer von Dako erstellen konnte (Abbildung 24).



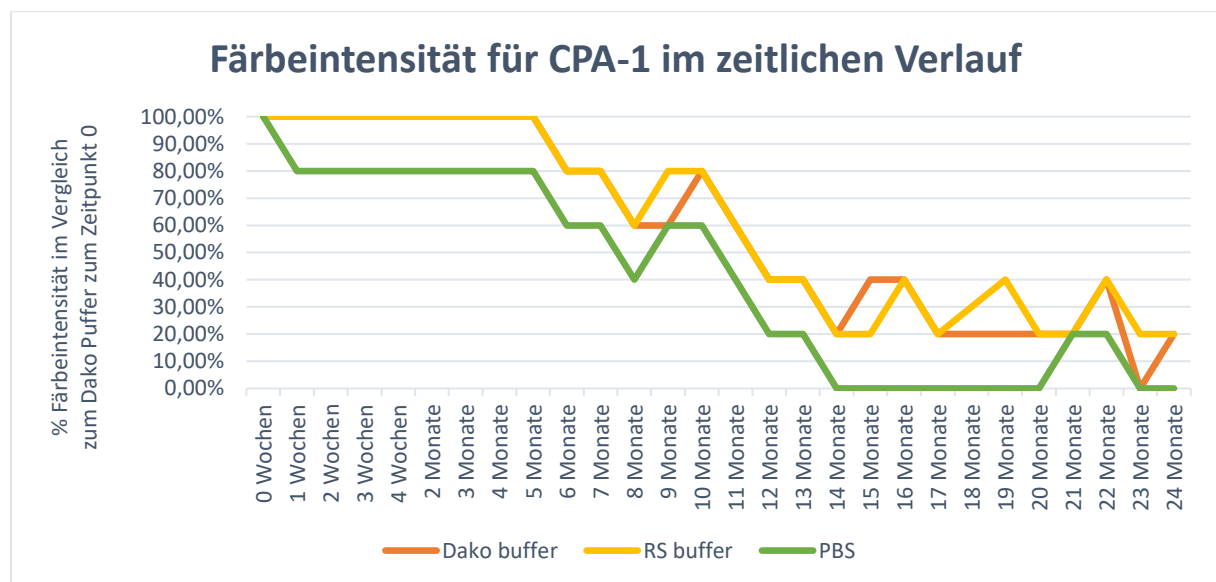
**Abbildung 24:** relative Färbeintensität von CPA1 (Pankreasgewebe) und SATB2 (Colongewebe) desselben Spots bei Färbungen mit unterschiedlichen Puffern.

Färbeintensität prozentuell im Vergleich zur Färbeintensität von CPA1 bzw. SATB2 mit dem kommerziellen Puffer von Dako.

### 3.3 Einfluss der Pufferart auf Antikörper-Haltbarkeit

Um den Einfluss der Pufferart auf die langfristige Haltbarkeit des verdünnten Antiköpers im Verdünnungspuffer zu analysieren, wurde die Färbeintensität im Dako-Puffer, PBST-basiertem Puffer (PBS, 0,2 % Tween-20, 1 % BSA, 0,05 % NaN<sub>3</sub>) und in PBS über zwei Jahre evaluiert. Die Färbeergebnisse bei Färbungen von CPA1 zeigen im Pankreasgewebe nach 5 Monaten eine qualitative Verschlechterung der Färbung, im PBST-basierten Puffer ist eine Verschlechterung zur selben Zeit zu beobachten. Bei einer Verdünnung des Antikörpers in PBS ist eine verschlechterte Färbeintensität schon nach einer Woche zu beobachten (Abbildung 25, Abbildung 26).

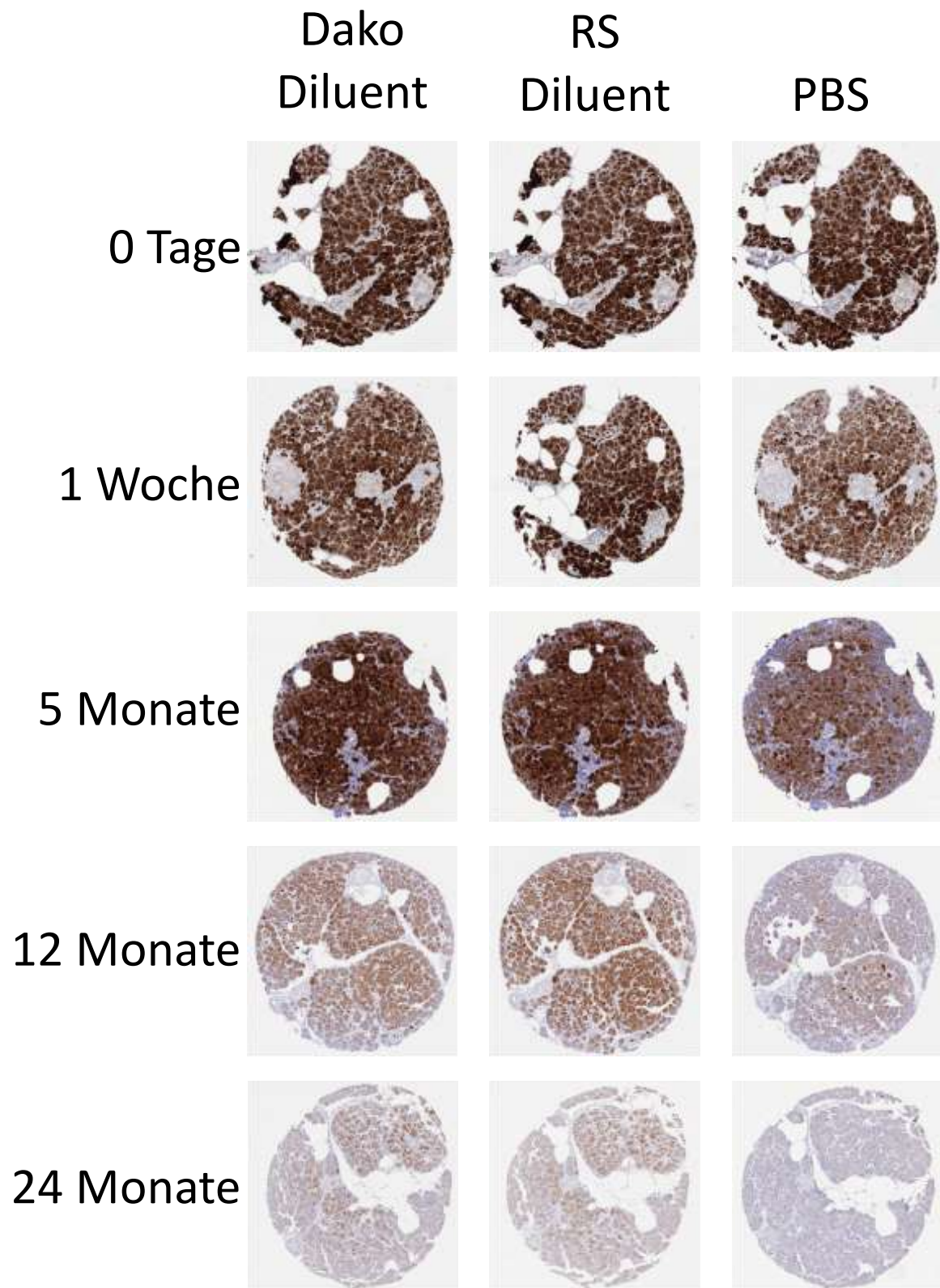
Bei Färbungen des Colongewebes mit dem SATB2-Antikörper zeigte sich unter denselben Konditionen im Dako-Puffer schon nach einer Woche eine Verschlechterung der Färbeergebnisse, jedoch bleibt die Intensität gleichbleibend nur etwas schlechter als initial. Der PBST-basierte Puffer, sowie die Verdünnung des Antikörpers in PBS, zeigten schon initial ein wesentlich schlechteres Färbeergebnis als der Dako-Puffer, hier nimmt im Verlauf der zwei Jahre die Intensität stark bis hin zur Abwesenheit einer Färbung ab (Abbildung 27, Abbildung 28).



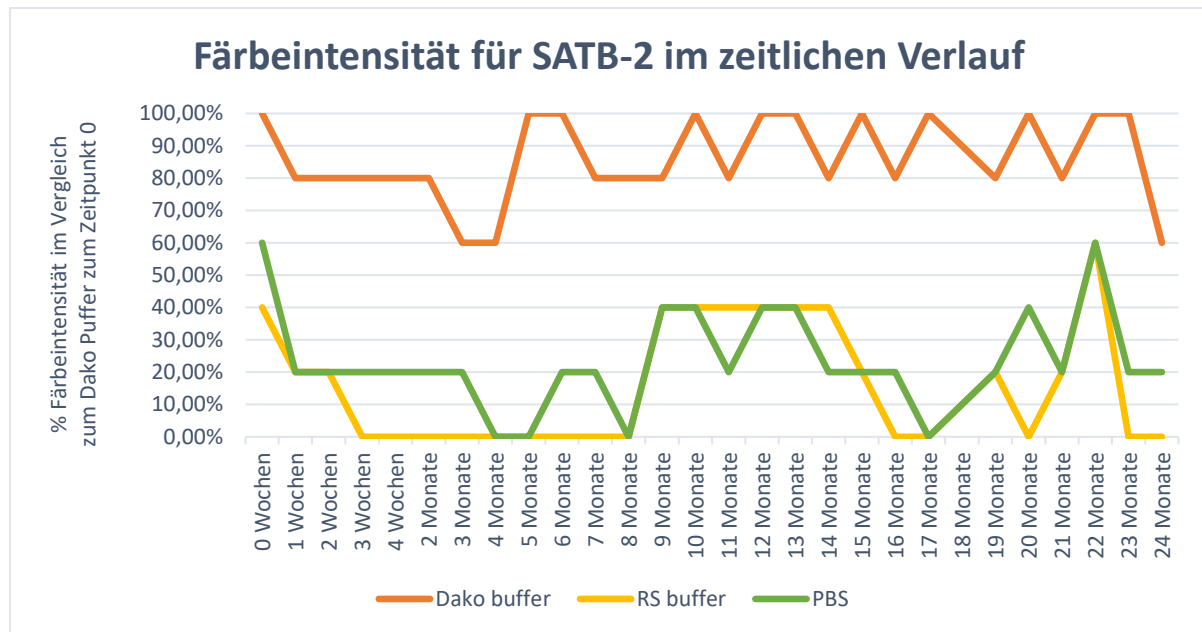
**Abbildung 25:** relative Färbeintensität von CPA1 desselben Spots aus dem Pankreasgewebe im zeitlichen Verlauf über 24 Monate.

Färbeintensität prozentuell im Vergleich zur Färbeintensität von CPA1 mit dem kommerziellen Puffer von Dako zum Zeitpunkt 0.

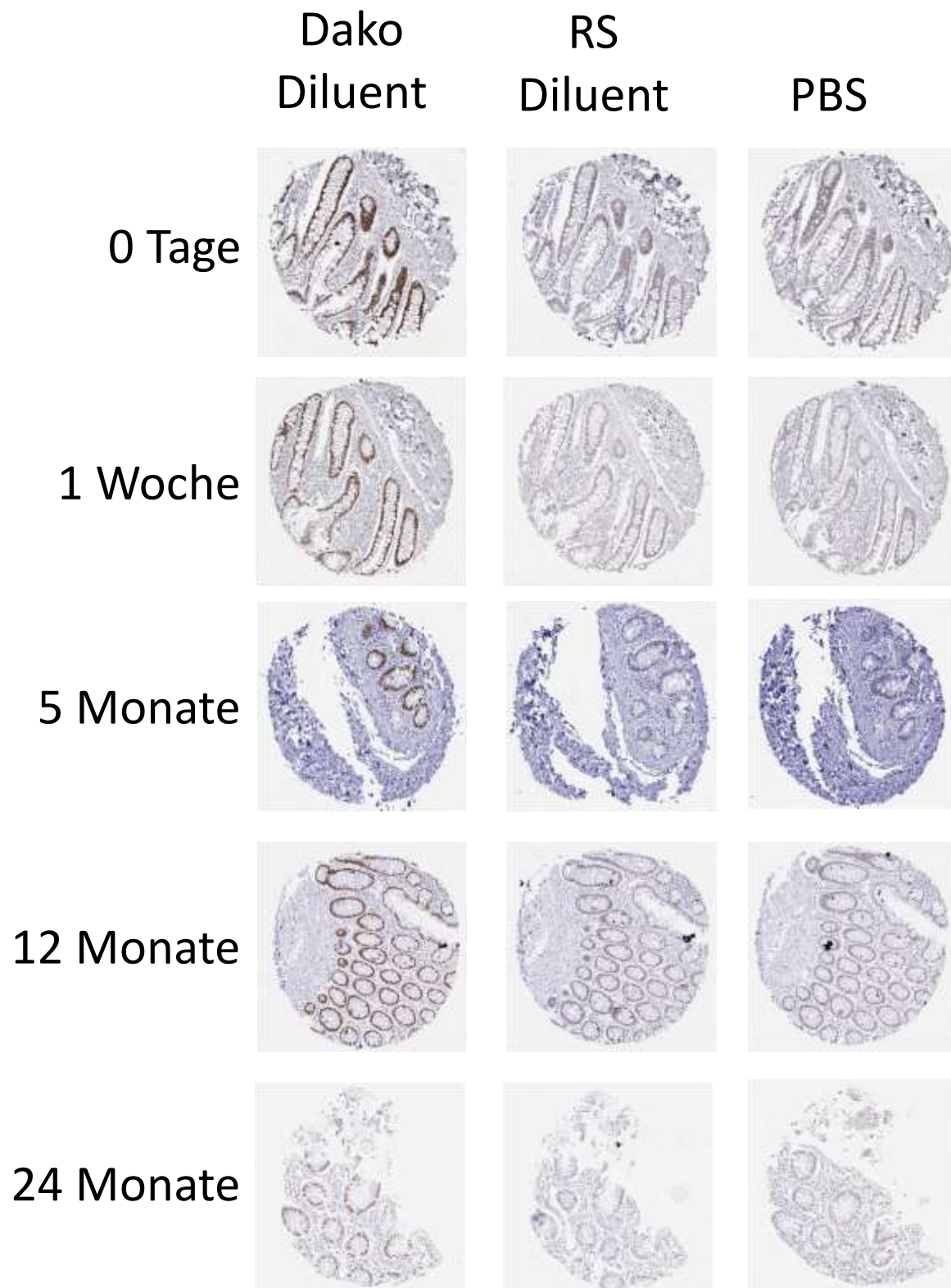




**Abbildung 26:** exemplarische Darstellung von gefärbtem Pankreasgewebe mit CPA-1 zu verschiedenen Zeitpunkten. Es wurde hier immer derselbe Spot zur Darstellung gewählt.



**Abbildung 27:** relative Färbeintensität von SATB2 desselben Spots aus dem Colongewebe im zeitlichen Verlauf übe 24 Monate.  
Färbeintensität prozentuell im Vergleich zur Färbeintensität von SATB2 mit dem kommerziellen Puffer von Dako zum Zeitpunkt 0.

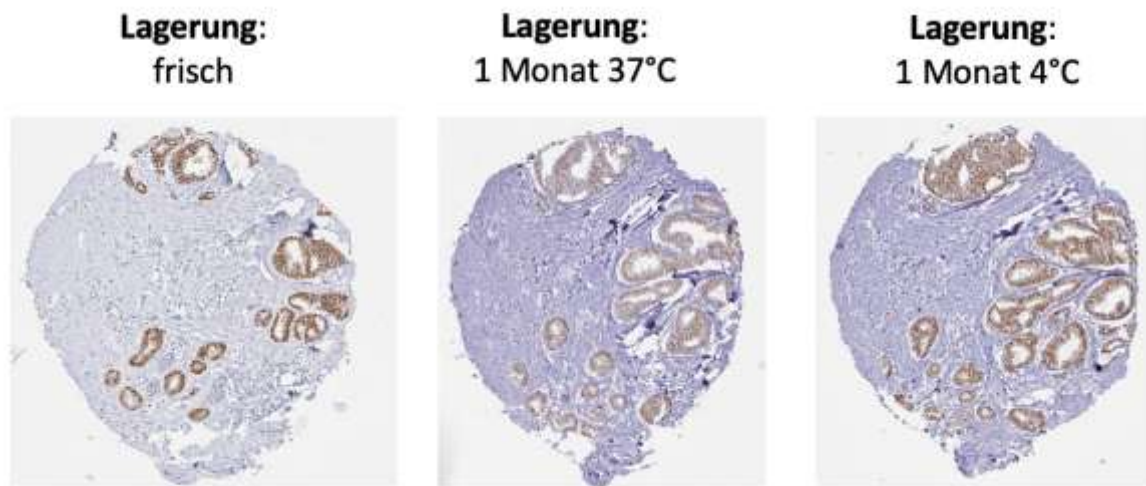


**Abbildung 28:** exemplarische Darstellung von gefärbtem Colongewebe mit SATB-2 zu verschiedenen Zeitpunkten. Es wurde hier nicht immer derselbe Spot zur Darstellung gewählt, da dieser über die Zeit nicht mehr auf dem TMA sichtbar war.

### 3.4 Haltbarkeit von Antikörpern

Zur Evaluierung der langfristigen Stabilität von Antikörpern unter verschiedenen Transport- und Lagerungsbedingungen wurde von der Welthilfsorganisation ein Testassay entwickelt (Duncan et al., 2018). Hierbei soll für Antikörper, welche in der *in-vitro* Diagnostik verwendet werden, eine zuverlässige Aussage zu deren Stabilität unter verschiedensten Testkriterien analysiert werden.

Zur Analyse der Stabilität wurde hier eine beschleunigte Stabilitätsmessung verwendet, bei der die Antikörper für 4 Wochen auf 37 °C gelagert wurden und die Färbequalität mit der Qualität desselben Antikörpers nach einer Lagerung für 4 Wochen bei 4 °C verglichen. Es zeigt im Vergleich zwischen der initialen Färbung, einer Färbung nach der Lagerung bei 37 °C und nach einer Lagerung bei 4 °C für je 4 Wochen, dass bei allen Antikörpern eine ähnlich gute (bei manchen Antikörpern jedoch eine leicht verschlechterte) Färbung durch den Antikörper welcher bei 37 °C gelagert wurde zu erkennen ist, während der bei 4 °C gelagerte Antikörper ähnlich gute Färbeergebnisse erbrachte wie bei der initialen Färbung. Ein beispielhafter Vergleich der verschiedenen Färbungen ist in Abbildung 29 für den Antikörper GATA3 im Mammagewebe dargestellt.



**Abbildung 29:** Färbungen von Mammagewebe mittels eines Antikörpers gegen GATA3.

Zur Färbung verwendet wurde frischer, ungelagerter Antikörper, derselbe Antikörper nach Lagerung für 4 Wochen bei 37 °C und Lagerung für 4 Wochen bei 4 °C.



Zur Analyse der Langzeitstabilität wurde derselbe Antikörper über mehrere Monate (final 2 Jahre, hier bis zu 18 Monate) bei 4 °C gelagert und wiederholt für eine Färbung verwendet. Es zeigt sich auch hier eine anhaltend gleiche Färbequalität bei allen getesteten Antikörpern im Vergleich zum initialem Färbeergebnis. Ein beispielhafter Vergleich der verschiedenen Färbungen ist in Abbildung 30 für den Antikörper CELA3B im Pankreasgewebe gezeigt.



**Abbildung 30:** Färbungen von Pankreasgewebe mittels eines Antikörpers gegen CELA3B.

Zur Färbung verwendet wurde frischer, ungelagerter Antikörper, derselbe Antikörper nach 1 Monat, 2 Monaten, 6 Monaten, 12 Monaten und 18 Monaten bei 4 °C.

Zur Analyse der Stabilität der Antikörper „unter Verwendung“ wurden die Antikörper zunächst für 4 Wochen bei 37 °C und anschließend für 4 Wochen bei Raumtemperatur gelagert und alle 4 Wochen zur vergleichenden Färbung verwendet. Es zeigte sich meist ein leichter Qualitätsverlust aber anhaltender Funktionalität nach einer Lagerung des Antikörpers für 4 Wochen auf 37 °C und anschließender Lagerung für 4 Wochen bei Raumtemperatur. Ein beispielhafter Vergleich ist für den Antikörper CDH16 im Nierengewebe in Abbildung 31 gezeigt.



**Abbildung 31:** Färbungen von Nierengewebe mittels eines Antikörpers gegen CDH16.

Zur Färbung verwendet wurde frischer, ungelagerter Antikörper, derselbe Antikörper nach 4 Wochen Lagerung bei 37 °C sowie der selbe Antikörper nach 4 Wochen Lagerung bei 37 °C und anschließender Lagerung für 4 Wochen bei Raumtemperatur.

Zur Analyse der Stabilität unter Transportbedingungen wurde der Antikörper zunächst für 4 Wochen bei 37 °C gelagert und anschließend für 4 Wochen bei Raumtemperatur gelagert, hierbei wurde alle 4 Wochen eine vergleichende Färbung durchgeführt. Verglichen wurde diese Färbung mit dem Färbeargebnis des gleichen Antikörpers, welcher für 72h bei -20 °C gelagert wurde. Es zeigte sich, wie zuvor beschrieben, bei den Färbungen durch einen Antikörper der bei 37 °C und anschließend bei Raumtemperatur gelagert wurde ein leichten Qualitätsverlust der Färbung. Die Färbung mit dem Antikörper, welcher für 72h bei -20 °C gelagert wurde („Transportbedingung“), zeigte meist eine vergleichbare Färbung zur Ausgangsfärbung mit dem ungelagerten Antikörper. Ein beispielhafter Vergleich ist für den Antikörper MSH2 im Tonsillengewebe in Abbildung 32 gezeigt. Ein Beispiel für eine verschlechterte aber funktionelle Färbung ist in Abbildung 33 für eine Färbung des Antikörpers PD-L1 am Gewebe eines Colonadenokarzinoms gezeigt.



**Abbildung 32:** Färbungen von Tonsillengewebe mittels eines Antikörpers gegen MSH2.

Zur Färbung verwendet wurde frischer, ungelagerter Antikörper, derselbe Antikörper nach 4 Wochen Lagerung bei 37 °C sowie der selbe Antikörper nach 4 Wochen Lagerung bei 37 °C und anschließender Lagerung für 4 Wochen bei Raumtemperatur, zudem wurde mit dem gleichen Antikörper gefärbt welcher zuvor für 72h bei -20 °C gelagert wurde.



**Abbildung 33:** Färbungen des Gewebes eines Adenokarzinoms des Colons mittels eines Antikörpers gegen PD-L1.

Zur Färbung verwendet wurde frischer, ungelagerter Antikörper, derselbe Antikörper nach 4 Wochen Lagerung bei 37 °C sowie der selbe Antikörper nach 4 Wochen Lagerung bei 37 °C und anschließender Lagerung für 4 Wochen bei Raumtemperatur, zudem wurde mit dem gleichen Antikörper gefärbt welcher zuvor für 72h bei -20 °C gelagert wurde.

Die systematische Validierung der Haltbarkeit unter den genannten Bedingungen zeigte bei 55 analysierten Antikörpern, dass bei allen Antikörper bei einer Lagerung für 4 Wochen bei 37 °C und anschließender Lagerung bei 4 °C (beschleunigte Stabilitätsmessung) eine gleichbleibende Färbeintensität erhalten bleibt. Bei 98 % der Antikörper fand bei einer langfristigen Lagerung von 6 Monaten der Antikörper bei 4 °C keine Verminderung der Färbeintensität statt, bei 2 % der Antikörper konnte eine Färbung unter diesen Konditionen nicht analysiert werden. Die Färbeintensität der Antikörper war bei allen Antikörper auch nach einer Lagerung für 4 Wochen bei 37 °C und anschließender Lagerung für 4 Wochen bei Raumtemperatur ähnlich zur initialen Färbung. In Bezug auf die Stabilität unter Transportbedingungen, also eine kurzfristige Lagerung des Antikörpers für 72 Stunden bei -20 °C zeigten 93% der Antikörper eine ähnliche Färbeintensität wie bei der initialen Färbung, bei 4 % der Antikörper war die Färbung schwächer und bei 4 % der Antikörper konnte eine Färbung unter diesen Konditionen nicht detektiert werden (Tabelle 20,

Tabelle 21).

**Tabelle 20:** Anteil der analysierten Antikörper unter verschiedenen Lagerungsbedingungen mit gleichbleibenden bzw. verschlechterter Färbequalität im Vergleich zur Ausgangsfärbung zum Startzeitpunkt der Lagerung. Quantifizierung der rechten Spalten aus Tabelle 20.

| <b>Färbequalität</b>           | <b>beschleunigte Stabilitätsmessung [% analysierter Antikörper]</b> | <b>Langzeitstabilität [% analysierter Antikörper]</b> | <b>Stabilität der Antikörper „unter Verwendung“ [% analysierter Antikörper]</b> | <b>Stabilität „unter Transportbedingungen“ [% analysierter Antikörper]</b> |
|--------------------------------|---------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------|
| <b>gleich</b>                  | 100,00%                                                             | 98,18%                                                | 100,00%                                                                         | 92,73%                                                                     |
| <b>verschlechtert</b>          | 0,00%                                                               | 0,00%                                                 | 0,00%                                                                           | 0,00%                                                                      |
| <b>nicht analysiert</b>        | 0,00 %                                                              | 1,82%                                                 | 0,00%                                                                           | 3,64%                                                                      |
| <b>Gesamtanzahl Antikörper</b> | 55                                                                  | 55                                                    | 55                                                                              | 55                                                                         |



**Tabelle 21:** Färbeverhalten der analysierten Antikörper unter verschiedenen Lagerungsbedingungen.

Darstellung der gleichbleibender (grün), verschlechterter (gelb) oder abwesende (rot) Färbequalität im Vergleich zur Ausgangsfärbung zum Startzeitpunkt der Lagerung pro Charge sowie gemittelt über alle drei Chargen hinweg in gleichbleibend (0), verschlechtert (-) oder nicht analysierbar (n.a.).

|                                                  |          | beschleunigte<br>Stabilitätsmessung | Langzeitstabilität    | Stabilität der<br>Antikörper „unter<br>Verwendung“ | Stabilität „unter<br>Transport-<br>bedingungen“ | beschleunigte<br>Stabilitätsmessung | Langzeitstabilität | Stabilität der<br>Antikörper „unter<br>Verwendung“ | Stabilität „unter<br>Transport-<br>bedingungen“ |
|--------------------------------------------------|----------|-------------------------------------|-----------------------|----------------------------------------------------|-------------------------------------------------|-------------------------------------|--------------------|----------------------------------------------------|-------------------------------------------------|
| Androgen Receptor 1:100 AcpH7,8 Prostatakarzinom | Charge 1 | OK                                  | OK                    | OK                                                 | OK                                              |                                     |                    |                                                    |                                                 |
| Androgen Receptor 1:100 AcpH7,8 Prostatakarzinom | Charge 2 | OK                                  | OK                    | OK                                                 |                                                 |                                     |                    |                                                    |                                                 |
| Androgen Receptor 1:100 AcpH7,8 Prostatakarzinom | Charge 3 | OK                                  | OK                    |                                                    |                                                 | 0                                   | 0                  | 0                                                  | 0                                               |
| Arginase-1 1:100 AcpH7,8 Leber                   | Charge 1 | OK                                  | OK                    | OK                                                 | OK                                              |                                     |                    |                                                    |                                                 |
| Arginase-1 1:100 AcpH7,8 Leber                   | Charge 2 | OK                                  | OK                    | OK                                                 |                                                 |                                     |                    |                                                    |                                                 |
| Arginase-1 1:100 AcpH7,8 Leber                   | Charge 3 | OK                                  | OK                    |                                                    |                                                 | 0                                   | 0                  | 0                                                  | 0                                               |
| CD1a 1:150 AcpH7,8 Haut                          | Charge 1 | OK                                  | OK                    | OK                                                 | OK                                              |                                     |                    |                                                    |                                                 |
| CD1a 1:150 AcpH7,8 Haut                          | Charge 2 | OK                                  | schwankt leicht       | etwas schlechter                                   |                                                 |                                     |                    |                                                    |                                                 |
| CD1a 1:150 AcpH7,8 Haut                          | Charge 3 | OK                                  | OK                    |                                                    |                                                 | 0                                   | 0                  | 0                                                  | 0                                               |
| CD20 1:150 AcpH7,8 Tonsille                      | Charge 1 | OK                                  | OK                    | OK                                                 | OK                                              |                                     |                    |                                                    |                                                 |
| CD20 1:150 AcpH7,8 Tonsille                      | Charge 2 | OK                                  | OK                    | OK                                                 |                                                 |                                     |                    |                                                    |                                                 |
| CD20 1:150 AcpH7,8 Tonsille                      | Charge 3 | OK                                  | OK                    |                                                    |                                                 | 0                                   | 0                  | 0                                                  | 0                                               |
| CD23 1:150 AcpH7,8 Tonsille                      | Charge 1 | etwas schlechter                    | schwankt leicht       | OK                                                 | OK                                              |                                     |                    |                                                    |                                                 |
| CD23 1:150 AcpH7,8 Tonsille                      | Charge 2 | etwas schlechter                    | schwankt leicht       | OK                                                 |                                                 |                                     |                    |                                                    |                                                 |
| CD23 1:150 AcpH7,8 Tonsille                      | Charge 3 | etwas schlechter                    | schwankt leicht       |                                                    |                                                 | 0                                   | 0                  | 0                                                  | 0                                               |
| CD27 1:150 AcpH9 Tonsille                        | Charge 1 | OK                                  | schwankt leicht       | etwas schlechter                                   | OK                                              |                                     |                    |                                                    |                                                 |
| CD27 1:150 AcpH9 Tonsille                        | Charge 2 | OK                                  | schwankt leicht       | etwas schlechter                                   |                                                 |                                     |                    |                                                    |                                                 |
| CD27 1:150 AcpH9 Tonsille                        | Charge 3 | OK                                  | OK                    |                                                    |                                                 | 0                                   | 0                  | 0                                                  | 0                                               |
| CD31 1:150 AcpH7,8 Tonsille                      | Charge 1 | OK                                  | schwankt leicht       | OK                                                 | OK                                              |                                     |                    |                                                    |                                                 |
| CD31 1:150 AcpH7,8 Tonsille                      | Charge 2 | OK                                  | schwankt leicht       | OK                                                 |                                                 |                                     |                    |                                                    |                                                 |
| CD31 1:150 AcpH7,8 Tonsille                      | Charge 3 | OK                                  | schwankt leicht       |                                                    |                                                 | 0                                   | 0                  | 0                                                  | 0                                               |
| CD163 1:150 AcpH7,8 Plazenta                     | Charge 1 | OK                                  | schwankt leicht       | OK                                                 | OK                                              |                                     |                    |                                                    |                                                 |
| CD163 1:150 AcpH7,8 Plazenta                     | Charge 2 | OK                                  | OK                    | OK                                                 |                                                 |                                     |                    |                                                    |                                                 |
| CD163 1:150 AcpH7,8 Plazenta                     | Charge 3 | OK                                  | OK                    |                                                    |                                                 | 0                                   | 0                  | 0                                                  | 0                                               |
| CDH16 1:150 AcpH7,8 Niere                        | Charge 1 | OK                                  | OK                    | OK                                                 | OK                                              |                                     |                    |                                                    |                                                 |
| CDH16 1:150 AcpH7,8 Niere                        | Charge 2 | OK                                  | OK                    | OK                                                 |                                                 |                                     |                    |                                                    |                                                 |
| CDH16 1:150 AcpH7,8 Niere                        | Charge 3 | OK                                  | OK                    |                                                    |                                                 | 0                                   | 0                  | 0                                                  | 0                                               |
| CDH17 1:150 AcpH7,8 Colon                        | Charge 1 | OK                                  | OK                    | OK                                                 | OK                                              |                                     |                    |                                                    |                                                 |
| CDH17 1:150 AcpH7,8 Colon                        | Charge 2 | OK                                  | OK                    | OK                                                 |                                                 |                                     |                    |                                                    |                                                 |
| CDH17 1:150 AcpH7,8 Colon                        | Charge 3 | OK                                  | schwankt leicht       |                                                    |                                                 | 0                                   | 0                  | 0                                                  | 0                                               |
| CEA 1:150 AcpH9 Colocarcinom                     | Charge 1 | OK                                  | etwas besser          | OK                                                 | OK                                              |                                     |                    |                                                    |                                                 |
| CEA 1:150 AcpH9 Colocarcinom                     | Charge 2 | OK                                  | etwas besser          | OK                                                 |                                                 |                                     |                    |                                                    |                                                 |
| CEA 1:150 AcpH9 Colocarcinom                     | Charge 3 | OK                                  | OK                    |                                                    |                                                 | 0                                   | 0                  | 0                                                  | 0                                               |
| CELA3B 1:150 AcpH7,8 Pankreas                    | Charge 1 | OK                                  | schwankt leicht       | OK                                                 | OK                                              |                                     |                    |                                                    |                                                 |
| CELA3B 1:150 AcpH7,8 Pankreas                    | Charge 2 | OK                                  | schwankt leicht       | OK                                                 |                                                 |                                     |                    |                                                    |                                                 |
| CELA3B 1:150 AcpH7,8 Pankreas                    | Charge 3 | OK                                  | schwankt leicht       |                                                    |                                                 | 0                                   | 0                  | 0                                                  | 0                                               |
| Cytokeratin 5 1:150 AcpH7,8 Pankreas             | Charge 1 | OK                                  | OK                    | OK                                                 | OK                                              |                                     |                    |                                                    |                                                 |
| Cytokeratin 5 1:150 AcpH7,8 Pankreas             | Charge 2 | OK                                  | OK                    | OK                                                 |                                                 |                                     |                    |                                                    |                                                 |
| Cytokeratin 5 1:150 AcpH7,8 Pankreas             | Charge 3 | OK                                  | OK                    |                                                    |                                                 | 0                                   | 0                  | 0                                                  | 0                                               |
| Cytokeratin 7 1:150 AcpH9 Plazenta (reif)        | Charge 1 | OK                                  | OK                    | OK                                                 | OK                                              |                                     |                    |                                                    |                                                 |
| Cytokeratin 7 1:150 AcpH9 Plazenta (reif)        | Charge 2 | OK                                  | OK                    | OK                                                 |                                                 |                                     |                    |                                                    |                                                 |
| Cytokeratin 7 1:150 AcpH9 Plazenta (reif)        | Charge 3 | OK                                  | OK                    |                                                    |                                                 | 0                                   | 0                  | 0                                                  | 0                                               |
| Cytokeratin 10 1:100 AcpH7,8 Haut                | Charge 1 | OK                                  | schwankt, erholt sich | OK                                                 | OK                                              |                                     |                    |                                                    |                                                 |
| Cytokeratin 10 1:100 AcpH7,8 Haut                | Charge 2 | OK                                  | OK                    | OK                                                 |                                                 |                                     |                    |                                                    |                                                 |
| Cytokeratin 10 1:100 AcpH7,8 Haut                | Charge 3 | OK                                  | OK                    |                                                    |                                                 | 0                                   | 0                  | 0                                                  | 0                                               |
| Cytokeratin 13 1:150 AcpH7,8 Tonsille            | Charge 1 | OK                                  | OK                    | OK                                                 | OK                                              |                                     |                    |                                                    |                                                 |
| Cytokeratin 13 1:150 AcpH7,8 Tonsille            | Charge 2 | OK                                  | schwankt leicht       | OK                                                 |                                                 |                                     |                    |                                                    |                                                 |
| Cytokeratin 13 1:150 AcpH7,8 Tonsille            | Charge 3 | OK                                  | schwankt leicht       |                                                    |                                                 | 0                                   | 0                  | 0                                                  | 0                                               |
| Cytokeratin 15 1:50 AcpH7,8 Tonsille             | Charge 1 | OK                                  | schwankt leicht       | OK                                                 | OK                                              |                                     |                    |                                                    |                                                 |
| Cytokeratin 15 1:50 AcpH7,8 Tonsille             | Charge 2 | OK                                  | schwankt leicht       | OK                                                 |                                                 |                                     |                    |                                                    |                                                 |
| Cytokeratin 15 1:50 AcpH7,8 Tonsille             | Charge 3 | OK                                  | schwankt leicht       |                                                    |                                                 | 0                                   | 0                  | 0                                                  | 0                                               |
| Cytokeratin 19 1:150 AcpH7,8 Colon               | Charge 1 | OK                                  | OK                    | OK                                                 | OK                                              |                                     |                    |                                                    |                                                 |
| Cytokeratin 19 1:150 AcpH7,8 Colon               | Charge 2 | OK                                  | OK                    | OK                                                 |                                                 |                                     |                    |                                                    |                                                 |
| Cytokeratin 19 1:150 AcpH7,8 Colon               | Charge 3 | OK                                  | OK                    |                                                    |                                                 | 0                                   | 0                  | 0                                                  | 0                                               |
| Cytokeratin 20 1:150 AcpH9 Colon                 | Charge 1 | OK                                  | OK                    | OK                                                 | OK                                              |                                     |                    |                                                    |                                                 |
| Cytokeratin 20 1:150 AcpH9 Colon                 | Charge 2 | OK                                  | OK                    | OK                                                 |                                                 |                                     |                    |                                                    |                                                 |
| Cytokeratin 20 1:150 AcpH9 Colon                 | Charge 3 | OK                                  | OK                    |                                                    |                                                 | 0                                   | 0                  | 0                                                  | 0                                               |
| Collagen IV 1:150 AcpH7,8 Colon muscularis       | Charge 1 | OK                                  | OK                    | OK                                                 | OK                                              |                                     |                    |                                                    |                                                 |
| Collagen IV 1:150 AcpH7,8 Colon muscularis       | Charge 2 | OK                                  | OK                    | OK                                                 |                                                 |                                     |                    |                                                    |                                                 |
| Collagen IV 1:150 AcpH7,8 Colon muscularis       | Charge 3 | OK                                  | OK                    |                                                    |                                                 | 0                                   | 0                  | 0                                                  | 0                                               |
| CPA1 1:150 AcpH7,8 Pankreas                      | Charge 1 | OK                                  | OK                    | OK                                                 | etwas schlechter                                |                                     |                    |                                                    |                                                 |
| CPA1 1:150 AcpH7,8 Pankreas                      | Charge 2 | OK                                  | OK                    | OK                                                 |                                                 |                                     |                    |                                                    |                                                 |
| CPA1 1:150 AcpH7,8 Pankreas                      | Charge 3 | OK                                  | OK                    |                                                    |                                                 | 0                                   | 0                  | 0                                                  | 0                                               |
| CLTA-4 1:150 AcpH7,8 Tonsille                    | Charge 1 | OK                                  | schwankt leicht       | etwas schlechter                                   | OK                                              |                                     |                    |                                                    |                                                 |
| CLTA-4 1:150 AcpH7,8 Tonsille                    | Charge 2 | etwas schlechter                    | etwas schlechter      | etwas schlechter                                   |                                                 |                                     |                    |                                                    |                                                 |
| CLTA-4 1:150 AcpH7,8 Tonsille                    | Charge 3 | etwas schlechter                    | etwas schlechter      |                                                    |                                                 | 0                                   | 0                  | 0                                                  | 0                                               |
| Desmin 1:150 AcpH9 Herz                          | Charge 1 | OK                                  | schwankt leicht       | OK                                                 | OK                                              |                                     |                    |                                                    |                                                 |
| Desmin 1:150 AcpH9 Herz                          | Charge 2 | OK                                  | OK                    | OK                                                 |                                                 |                                     |                    |                                                    |                                                 |
| Desmin 1:150 AcpH9 Herz                          | Charge 3 | OK                                  | OK                    |                                                    |                                                 | 0                                   | 0                  | 0                                                  | 0                                               |
| DOG-1 1:150 AcpH9 Colon mucosa                   | Charge 1 | OK                                  | OK                    | OK                                                 | OK                                              |                                     |                    |                                                    |                                                 |
| DOG-1 1:150 AcpH9 Colon mucosa                   | Charge 2 | OK                                  | OK                    | OK                                                 |                                                 |                                     |                    |                                                    |                                                 |
| DOG-1 1:150 AcpH9 Colon mucosa                   | Charge 3 | OK                                  | OK                    |                                                    |                                                 | 0                                   | 0                  | 0                                                  | 0                                               |
| E-Cadherin 1:150 AcpH7 Pankreas                  | Charge 1 | OK                                  | schwankt leicht       | OK                                                 | OK                                              |                                     |                    |                                                    |                                                 |
| E-Cadherin 1:150 AcpH7 Pankreas                  | Charge 2 | OK                                  | schwankt leicht       | OK                                                 |                                                 |                                     |                    |                                                    |                                                 |
| E-Cadherin 1:150 AcpH7 Pankreas                  | Charge 3 | OK                                  | schwankt leicht       |                                                    |                                                 | 0                                   | 0                  | 0                                                  | 0                                               |
| EpCAM 1:150 AcpH7 Niere                          | Charge 1 | OK                                  | OK                    | OK                                                 | OK                                              |                                     |                    |                                                    |                                                 |
| EpCAM 1:150 AcpH7 Niere                          | Charge 2 | OK                                  | schwankt, erholt sich | OK                                                 |                                                 |                                     |                    |                                                    |                                                 |
| EpCAM 1:150 AcpH7 Niere                          | Charge 3 | OK                                  | schwankt, erholt sich |                                                    |                                                 | 0                                   | 0                  | 0                                                  | 0                                               |

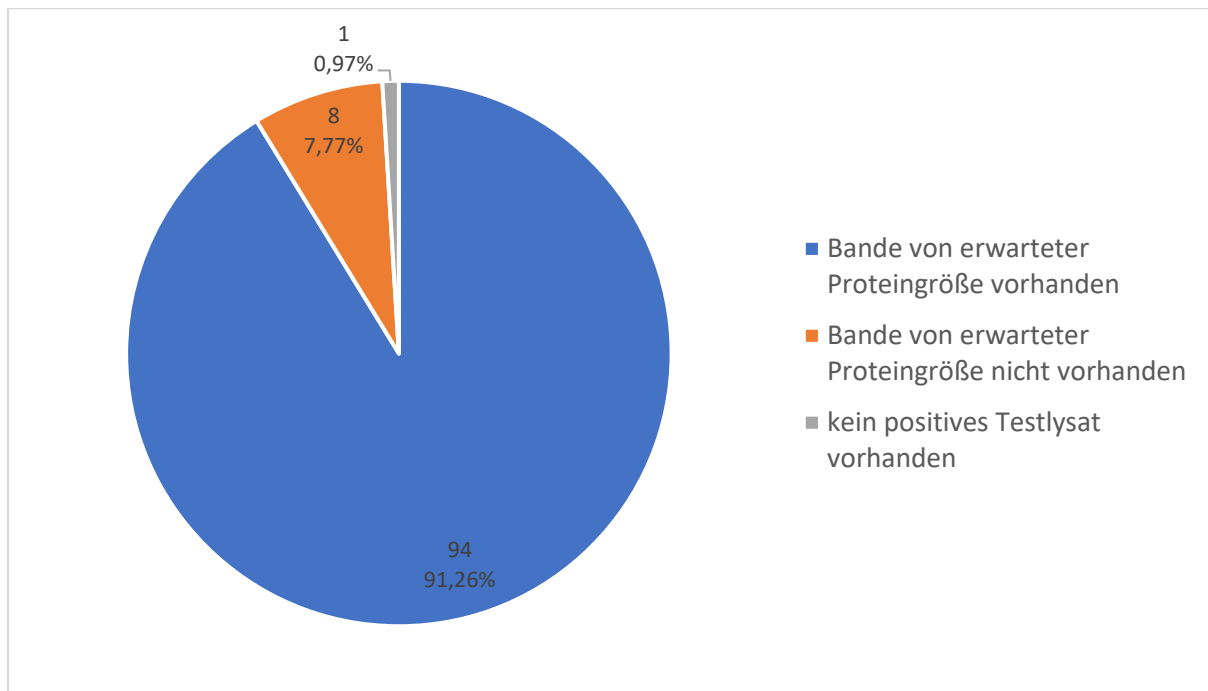
|                                              |          |                  |                  |      |                  |   |      |   |      |
|----------------------------------------------|----------|------------------|------------------|------|------------------|---|------|---|------|
| ER 1:150 AcpH9 Endometrium                   | Charge 1 | OK               | OK               | OK   | OK               |   |      |   |      |
| ER 1:150 AcpH9 Endometrium                   | Charge 2 | OK               | OK               | OK   |                  |   |      |   |      |
| ER 1:150 AcpH9 Endometrium                   | Charge 3 | OK               | OK               |      |                  | 0 | 0    | 0 | 0    |
| GAD 1:150 AcpH7 Pankreas                     | Charge 1 | OK               | OK               | OK   | OK               |   |      |   |      |
| GAD 1:150 AcpH7 Pankreas                     | Charge 2 | OK               | OK               | OK   |                  |   |      |   |      |
| GAD 1:150 AcpH7 Pankreas                     | Charge 3 | OK               | OK               |      |                  | 0 | 0    | 0 | 0    |
| GATA3 AcpH7,8 Brust                          | Charge 1 | OK               | OK               | OK   | OK               |   |      |   |      |
| GATA3 AcpH7,8 Brust                          | Charge 2 | OK               | OK               | OK   |                  |   |      |   |      |
| GATA3 AcpH7,8 Brust                          | Charge 3 | OK               | OK               |      |                  | 0 | 0    | 0 | 0    |
| HER2 1:100 AcpH7,8 Haut                      | Charge 1 | OK               | OK               | OK   | OK               |   |      |   |      |
| HER2 1:100 AcpH7,8 Haut                      | Charge 2 | OK               | OK               | OK   |                  |   |      |   |      |
| HER2 1:100 AcpH7,8 Haut                      | Charge 3 | OK               | OK               |      |                  | 0 | 0    | 0 | 0    |
| Inhibin alpha 1:500 AcpH7,8 Hoden            | Charge 1 | OK               | etwas schlechter | OK   | n.a.             |   |      |   |      |
| Inhibin alpha 1:500 AcpH7,8 Hoden            | Charge 2 | OK               | etwas schlechter | OK   |                  |   |      |   |      |
| Inhibin alpha 1:500 AcpH7,8 Hoden            | Charge 3 | OK               | etwas schlechter |      |                  | 0 | 0    | 0 | n.a. |
| INSM1 1:100 AcpH7,8 Pankreas                 | Charge 1 | etwas schlechter | n.a.             | OK   | n.a.             |   |      |   |      |
| INSM1 1:100 AcpH7,8 Pankreas                 | Charge 2 | etwas schlechter | n.a.             | OK   |                  |   |      |   |      |
| INSM1 1:100 AcpH7,8 Pankreas                 | Charge 3 | OK               | n.a.             |      |                  | 0 | n.a. | 0 | n.a. |
| Ki-67 1:150 AcpH9 Tonsille                   | Charge 1 | OK               | OK               | OK   | OK               |   |      |   |      |
| Ki-67 1:150 AcpH9 Tonsille                   | Charge 2 | OK               | schwankt leicht  | OK   |                  |   |      |   |      |
| Ki-67 1:150 AcpH9 Tonsille                   | Charge 3 | OK               | OK               |      |                  | 0 | 0    | 0 | 0    |
| Mesothelin 1:150 AcpH9 Ovarialcarcinom serös | Charge 1 | OK               | OK               | OK   | OK               |   |      |   |      |
| Mesothelin 1:150 AcpH9 Ovarialcarcinom serös | Charge 2 | OK               | OK               | OK   |                  |   |      |   |      |
| Mesothelin 1:150 AcpH9 Ovarialcarcinom serös | Charge 3 | OK               | OK               |      |                  | 0 | 0    | 0 | 0    |
| MSH2 1:150 AcpH7,8 Tonsille                  | Charge 1 | OK               | schwankt leicht  | OK   | OK               |   |      |   |      |
| MSH2 1:150 AcpH7,8 Tonsille                  | Charge 2 | OK               | OK               | OK   |                  |   |      |   |      |
| MSH2 1:150 AcpH7,8 Tonsille                  | Charge 3 | OK               | schwankt leicht  |      |                  | 0 | 0    | 0 | 0    |
| MSH6 1:100 AcpH7,8 Tonsille                  | Charge 1 | OK               | OK               | OK   | OK               |   |      |   |      |
| MSH6 1:100 AcpH7,8 Tonsille                  | Charge 2 | OK               | OK               | OK   |                  |   |      |   |      |
| MSH6 1:100 AcpH7,8 Tonsille                  | Charge 3 | OK               | OK               |      |                  | 0 | 0    | 0 | 0    |
| MUC5AC 1:150 AcpH7,8 Magenschleimhaut        | Charge 1 | OK               | OK               | OK   | etwas schlechter |   |      |   |      |
| MUC5AC 1:150 AcpH7,8 Magenschleimhaut        | Charge 2 | OK               | OK               | OK   |                  |   |      |   |      |
| MUC5AC 1:150 AcpH7,8 Magenschleimhaut        | Charge 3 | OK               | OK               |      |                  | 0 | 0    | 0 | 0    |
| Napsin A 1:150 AcpH7,8 Niere                 | Charge 1 | OK               | OK               | OK   | OK               |   |      |   |      |
| Napsin A 1:150 AcpH7,8 Niere                 | Charge 2 | OK               | OK               | OK   |                  |   |      |   |      |
| Napsin A 1:150 AcpH7,8 Niere                 | Charge 3 | OK               | OK               |      |                  | 0 | 0    | 0 | 0    |
| p16 1:150 AcpH9 Zervix                       | Charge 1 | OK               | OK               | n.a. | OK               |   |      |   |      |
| p16 1:150 AcpH9 Zervix                       | Charge 2 | OK               | OK               | OK   |                  |   |      |   |      |
| p16 1:150 AcpH9 Zervix                       | Charge 3 | OK               | OK               |      |                  | 0 | 0    | 0 | 0    |
| p53 1:150 AcpH7,8 Ovarialcarcinom serös      | Charge 1 | OK               | etwas schlechter | OK   | OK               |   |      |   |      |
| p53 1:150 AcpH7,8 Ovarialcarcinom serös      | Charge 2 | OK               | etwas schlechter | OK   |                  |   |      |   |      |
| p53 1:150 AcpH7,8 Ovarialcarcinom serös      | Charge 3 | OK               | etwas schlechter |      |                  | 0 | 0    | 0 | 0    |
| p63 1:100 AcpH7,8 Haut                       | Charge 1 | OK               | etwas schlechter | OK   | OK               |   |      |   |      |
| p63 1:100 AcpH7,8 Haut                       | Charge 2 | OK               | etwas schlechter | OK   |                  |   |      |   |      |
| p63 1:100 AcpH7,8 Haut                       | Charge 3 | OK               | etwas schlechter |      |                  | 0 | 0    | 0 | 0    |
| panCK 1:150 AcpH9 Magen                      | Charge 1 | OK               | OK               | OK   | OK               |   |      |   |      |
| panCK 1:150 AcpH9 Magen                      | Charge 2 | OK               | OK               | OK   |                  |   |      |   |      |
| panCK 1:150 AcpH9 Magen                      | Charge 3 | OK               | OK               |      |                  | 0 | 0    | 0 | 0    |
| PD-L1 1:150 AcpH7,8 Colon Adenocarcinom      | Charge 1 | OK               | etwas schlechter | OK   | schlechter       |   |      |   |      |
| PD-L1 1:150 AcpH7,8 Colon Adenocarcinom      | Charge 2 | etwas schlechter | etwas schlechter | OK   |                  |   |      |   |      |
| PD-L1 1:150 AcpH7,8 Colon Adenocarcinom      | Charge 3 | OK               | schlechter       |      |                  | 0 | 0    | 0 | -    |
| PLAP 1:150 AcpH9 Plazenta                    | Charge 1 | OK               | OK               | OK   | etwas schlechter |   |      |   |      |
| PLAP 1:150 AcpH9 Plazenta                    | Charge 2 | n.a.             | OK               | OK   |                  |   |      |   |      |
| PLAP 1:150 AcpH9 Plazenta                    | Charge 3 | OK               | OK               |      |                  | 0 | 0    | 0 | -    |
| PSA 1:150 AcpH7,8 Prostata                   | Charge 1 | OK               | schwankt leicht  | OK   | OK               |   |      |   |      |
| PSA 1:150 AcpH7,8 Prostata                   | Charge 2 | OK               | schwankt leicht  | OK   |                  |   |      |   |      |
| PSA 1:150 AcpH7,8 Prostata                   | Charge 3 | OK               | schwankt leicht  |      |                  | 0 | 0    | 0 | 0    |
| STAR 1:100 AcpH7,8 Nebenniere                | Charge 1 | OK               | OK               | OK   | OK               |   |      |   |      |
| STAR 1:100 AcpH7,8 Nebenniere                | Charge 2 | OK               | OK               | OK   |                  |   |      |   |      |
| STAR 1:100 AcpH7,8 Nebenniere                | Charge 3 | OK               | OK               |      |                  | 0 | 0    | 0 | 0    |
| Synaptophysin 1:150 AcpH9 Magenschleimhaut   | Charge 1 | OK               | OK               | OK   | OK               |   |      |   |      |
| Synaptophysin 1:150 AcpH9 Magenschleimhaut   | Charge 2 | OK               | OK               | n.a. |                  |   |      |   |      |
| Synaptophysin 1:150 AcpH9 Magenschleimhaut   | Charge 3 | OK               | OK               |      |                  | 0 | 0    | 0 | 0    |
| TFE3 1:150 AcpH7,8 Niere                     | Charge 1 | OK               | OK               | OK   | OK               |   |      |   |      |
| TFE3 1:150 AcpH7,8 Niere                     | Charge 2 | OK               | OK               | n.a. |                  |   |      |   |      |
| TFE3 1:150 AcpH7,8 Niere                     | Charge 3 | OK               | OK               |      |                  | 0 | 0    | 0 | 0    |
| TFF1 1:150 AcpH7,8 Lungen Adenokarzinom      | Charge 1 | OK               | OK               | OK   | OK               |   |      |   |      |
| TFF1 1:150 AcpH7,8 Lungen Adenokarzinom      | Charge 2 | OK               | OK               | OK   |                  |   |      |   |      |
| TFF1 1:150 AcpH7,8 Lungen Adenokarzinom      | Charge 3 | OK               | OK               |      |                  | 0 | 0    | 0 | 0    |
| TROP-2 1:150 AcpH7,8 Haut                    | Charge 1 | OK               | OK               | OK   | OK               |   |      |   |      |
| TROP-2 1:150 AcpH7,8 Haut                    | Charge 2 | OK               | OK               | OK   |                  |   |      |   |      |
| TROP-2 1:150 AcpH7,8 Haut                    | Charge 3 | OK               | OK               |      |                  | 0 | 0    | 0 | 0    |
| TTF-1 1:150 AcpH7,8 Niere                    | Charge 1 | OK               | OK               | n.a. | OK               |   |      |   |      |
| TTF-1 1:150 AcpH7,8 Niere                    | Charge 2 | OK               | OK               | OK   |                  |   |      |   |      |
| TTF-1 1:150 AcpH7,8 Niere                    | Charge 3 | OK               | OK               |      |                  | 0 | 0    | 0 | 0    |
| Uroplakin 1a 1:150 AcpH9 Hamblasenkarzinom   | Charge 1 | OK               | OK               | OK   | OK               |   |      |   |      |
| Uroplakin 1a 1:150 AcpH9 Hamblasenkarzinom   | Charge 2 | OK               | OK               | n.a. |                  |   |      |   |      |
| Uroplakin 1a 1:150 AcpH9 Hamblasenkarzinom   | Charge 3 | OK               | OK               |      |                  | 0 | 0    | 0 | 0    |
| Uroplakin 1b 1:150 AcpH7,8 Urothel           | Charge 1 | OK               | OK               | OK   | OK               |   |      |   |      |
| Uroplakin 1b 1:150 AcpH7,8 Urothel           | Charge 2 | OK               | OK               | OK   |                  |   |      |   |      |
| Uroplakin 1b 1:150 AcpH7,8 Urothel           | Charge 3 | OK               | OK               |      |                  | 0 | 0    | 0 | 0    |
| Uroplakin 3b 1:150 AcpH7,8 Urothel           | Charge 1 | OK               | OK               | OK   | OK               |   |      |   |      |
| Uroplakin 3b 1:150 AcpH7,8 Urothel           | Charge 2 | OK               | OK               | OK   |                  |   |      |   |      |
| Uroplakin 3b 1:150 AcpH7,8 Urothel           | Charge 3 | OK               | OK               |      |                  | 0 | 0    | 0 | 0    |
| Villin 1:150 AcpH9 Colon                     | Charge 1 | OK               | OK               | OK   | OK               |   |      |   |      |
| Villin 1:150 AcpH9 Colon                     | Charge 2 | OK               | schwankt leicht  | OK   |                  |   |      |   |      |
| Villin 1:150 AcpH9 Colon                     | Charge 3 | OK               | OK               |      |                  | 0 | 0    | 0 | 0    |

### 3.5 Antikörper-Validierung 1: Western Blot

Insgesamt wurden 103 Antikörper auf ihre Funktionalität im Western Blot analysiert. Die Lysate wurden sowohl aus gefrorenen Gewebeproben als auch Zelllinien mit bekannter positiver und negativer Expression des Zielproteins gewonnen.

#### 3.5.1 Gewebelysate

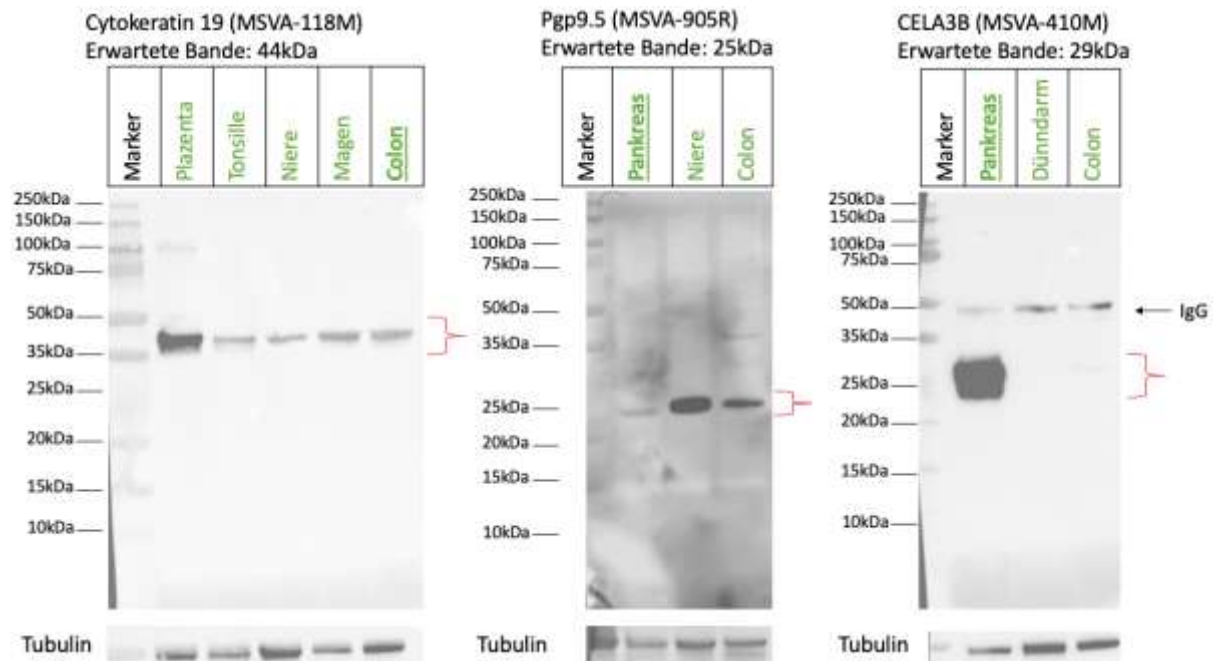
Von den 103 getesteten Antikörpern zeigten 94 Antikörper (91,3 %) im Gewebe eine Bande bei der erwarteten Größe, während bei 8 Antikörpern (7,7 %) in keinem der getesteten Gewebe eine Bande bei der erwarteten Proteingröße gefunden wurde, sowie ein Antikörper (1,0 %) aufgrund fehlender passender Gewebe nicht getestet wurde (Abbildung 34).



**Abbildung 34:** Anteil der Antikörper, die im humanen Testgewebe eine Bande richtiger Größe zeigten.

### 3.5.1.1 Antikörper die eine Bande in erwarteter Größe zeigten

Von den 94 Antikörpern, die eine Bande von erwarteter Größe zeigten, wiesen 34 Antikörper (36,2 %) in mindestens einem (aber nicht unbedingt allen) Positivkontrollgeweben auch nur diese einzige Bande auf. Beispiele für diese Antikörper sind in Abbildung 35 gezeigt, die vollständige Liste dieser Antikörper ist in Tabelle 22 gegeben.



**Abbildung 35:** Beispiele für Antikörper, die eine einzige Bande von erwarteter Größe zeigten: Antikörper Cytokeratin 19, pgp9.5 und CELA3B.

Banden bei 50 kDa wurden durch Kreuzreaktivität des sekundären Antikörpers mit humanem IgG verursacht. Grün markierte Gewebe zeigen Literatur eine Expression des Zielproteins, rot markierte Gewebe zeigen keine Expression. Unterstrichenes Gewebe markiert das für die Analyse ausgewählte Gewebe.

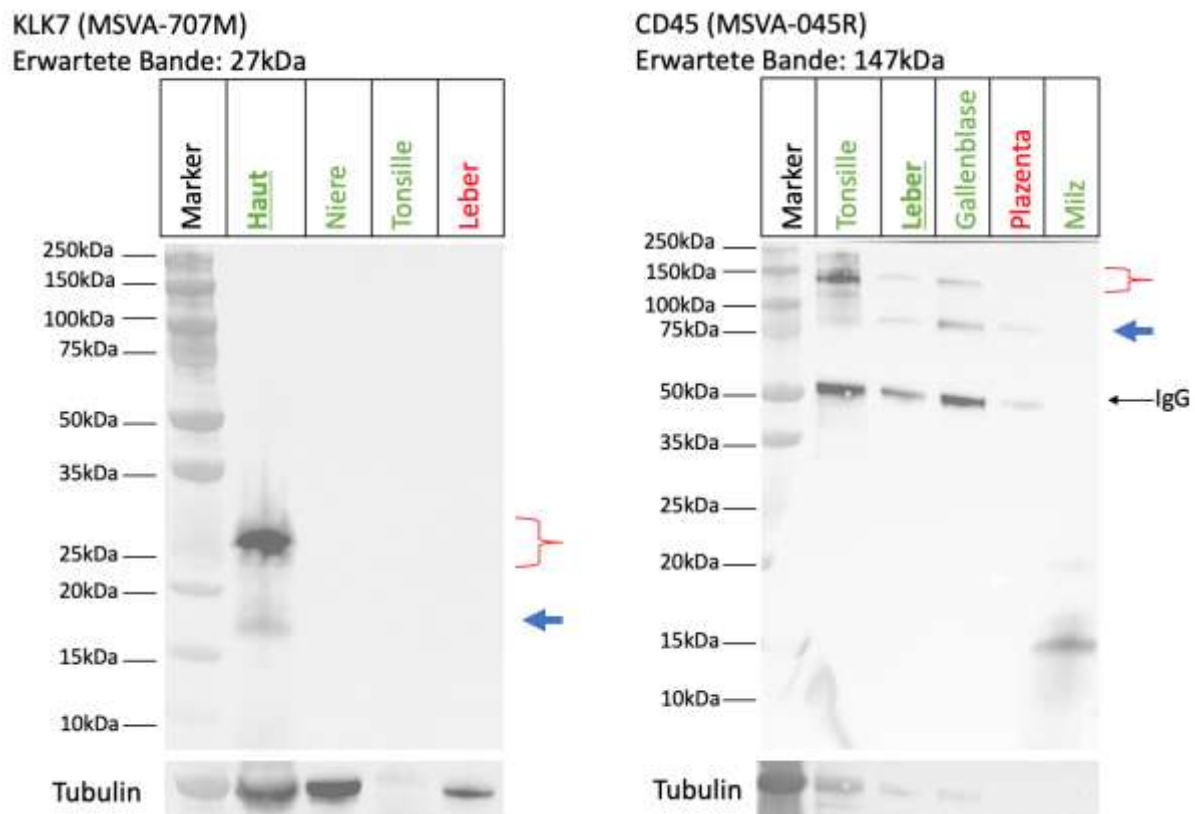
**Tabelle 22:** Liste der Antikörper die nur eine Bande von erwarteter Größe zeigten.

| <b>Antikörper zeigt nur Bande von erwarteter Größe</b> |
|--------------------------------------------------------|
| Factor XIIa                                            |
| Cytokeratin 5                                          |
| Collagen IV                                            |
| SATB2                                                  |
| Pan-Cytokeratin                                        |
| CELA3B                                                 |
| Calponin-1                                             |
| GATA-3                                                 |
| Estrogen Receptor                                      |
| Cytokeratin 19                                         |
| Cytokeratin 7                                          |
| EpCAM                                                  |
| S100P                                                  |
| INI-1                                                  |
| Cytokeratin 13                                         |
| CD 34                                                  |
| CD 5                                                   |
| Cytokeratin 15                                         |
| FABP1                                                  |
| SOX9                                                   |
| pgp9.5                                                 |
| HLA-DRA                                                |
| DOG-1                                                  |
| Cytokeratin 14                                         |
| INSM1                                                  |
| CEA                                                    |
| Caldesmon                                              |
| Mesothelin                                             |
| S100B                                                  |
| Cytokeratin 18                                         |
| Topoisomerase 2a                                       |
| Cytokeratin 6                                          |
| Uroplakin 1a                                           |
| vWF                                                    |

### 3.5.1.2. Antikörper die neben der richtigen Bande zusätzliche Banden zeigten

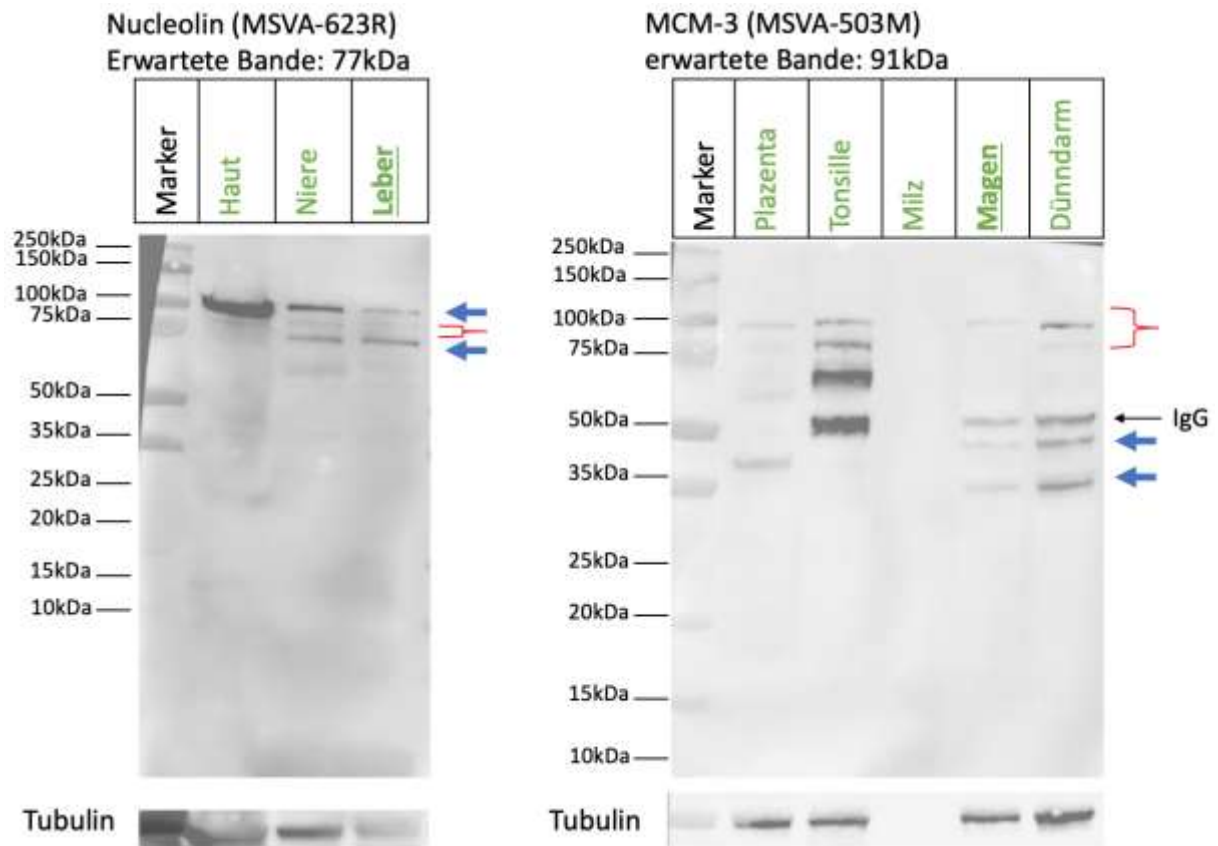
Die weiteren 60 der 94 Antikörper (63,8 %), die im Western Blot „funktionierten“, wurden zunächst anhand des best-geeigneten Positivkontrollgewebes weiter unterteilt. Als bestes Positivkontrollgewebe wurde das Gewebe bestimmt, bei dem die spezifische Bande am deutlichsten zu sehen war und die wenigsten zusätzlichen Banden gesehen wurden.

21 Antikörper dieser 60 Antikörper (35,00 %) zeigten selbst im besten Kontrollgewebe neben der Bande von erwarteter Größe eine weitere Bande (Abbildung 36), 24 Antikörper (40,00 %) zeigten 2-3 Nebenbanden (Abbildung 37) und 15 Antikörper (25,00 %) zeigten 4 oder mehr Nebenbanden (Abbildung 38). Die vollständige Liste dieser Antikörper ist in Tabelle 23 gegeben, die prozentuale Aufteilung ist in Abbildung 39 gezeigt.



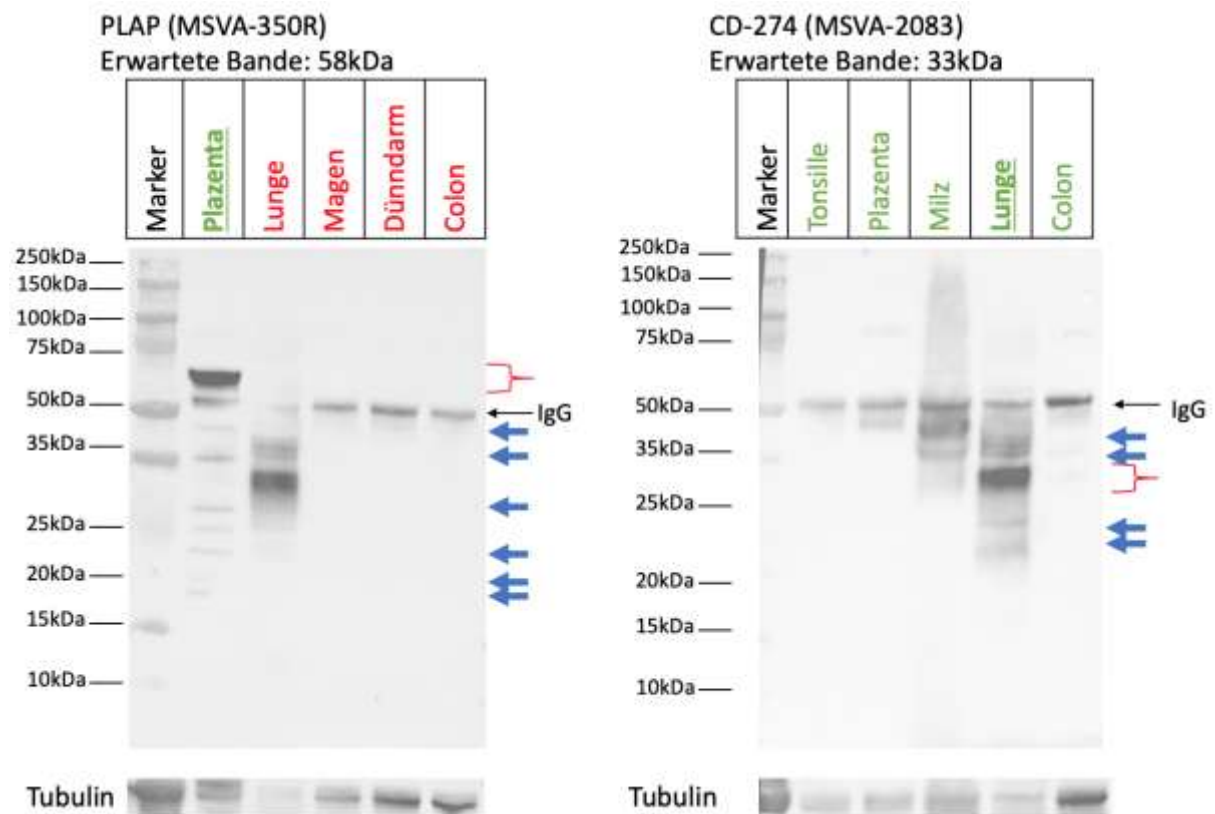
**Abbildung 36:** Beispiele für Antikörper, die neben der Bande von erwarteter Größe noch eine weitere Bande zeigten: Antikörper KLK7 und CD45.

Banden bei 50kDa wurden durch Kreuzreaktivität des sekundären Antikörpers mit humanem IgG verursacht. Grün markierte Gewebe zeigen Literatur eine Expression des Zielproteins, rot markierte Gewebe zeigen keine Expression. Unterstrichenes Gewebe markiert das für die Analyse ausgewählte Gewebe, die blauen Pfeile markieren die Banden unerwarteter Größe.



**Abbildung 37:** Beispiele für Antikörper, die neben der Bande von erwarteter Größe noch zwei bis drei weitere Banden zeigten: Antikörper Nucleolin und MCM-3.

Banden bei 50kDa wurden durch Kreuzreaktivität des sekundären Antikörpers mit humanem IgG verursacht. Grün markierte Gewebe zeigen Literatur eine Expression des Zielproteins, rot markierte Gewebe zeigen keine Expression. Unterstrichenes Gewebe markiert das für die Analyse ausgewählte Gewebe, die blauen Pfeile markieren die Banden unerwarteter Größe.



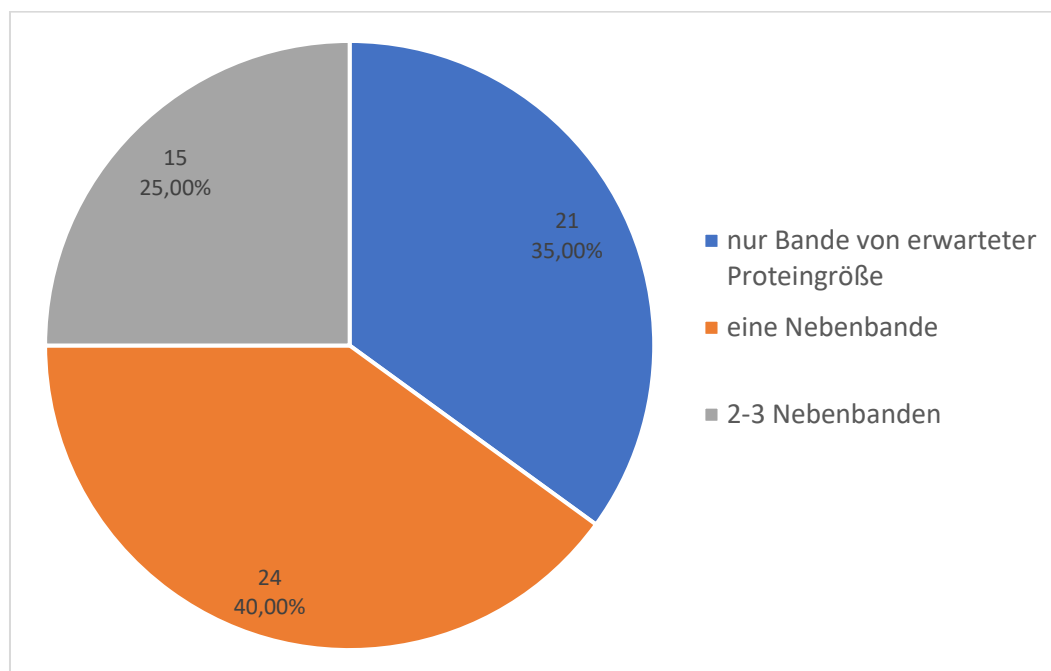
**Abbildung 38:** Beispiele für Antikörper, die neben der Bande von erwarteter Größe noch mindestens vier weitere Banden zeigten: Antikörper PLAP und CD274.

Banden bei 50kDa wurden durch Kreuzreaktivität des sekundären Antikörpers mit humanem IgG verursacht. Grün markierte Gewebe zeigen Literatur eine Expression des Zielproteins, rot markierte Gewebe zeigen keine Expression. Unterstrichenes Gewebe markiert das für die Analyse ausgewählte Gewebe, die blauen Pfeile markieren die Banden unerwarteter Größe.



**Tabelle 23:** Liste der Antikörper die neben der Bande von erwarteter Größe weitere Banden zeigten.

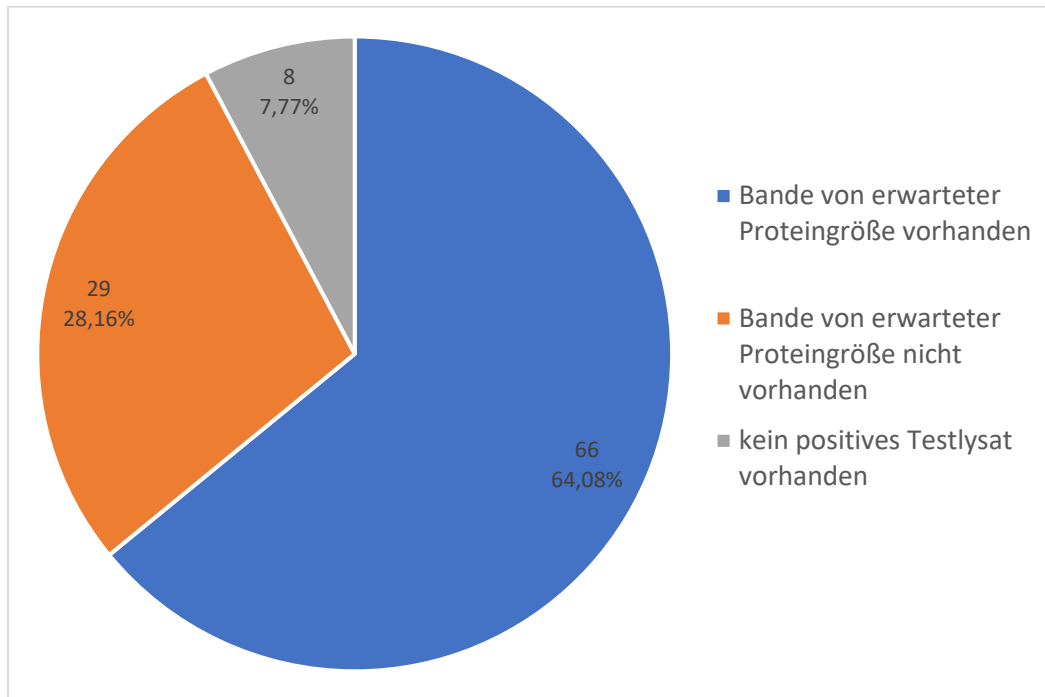
| AK zeigen eine Nebenbande | AK zeigen 2-3 Nebenbanden | AK zeigen größer/gleich 4 Nebenbanden |
|---------------------------|---------------------------|---------------------------------------|
| Villin                    | CD 27                     | Napsin A                              |
| Cytokeratin 10            | Nucleolin                 | PLAP                                  |
| Chromogranin A            | CPA1                      | Cystatin A                            |
| Vimentin                  | CD 1a                     | Androgen Receptor                     |
| Myosin                    | Elastin                   | PAPP-A                                |
| KLK7                      | Myosin H11                | CD274                                 |
| MUC5AC                    | TRIM29                    | CD45RA                                |
| Synaptophysin             | Uroplakin 1b              | CTLA-3                                |
| MUC6                      | Melan A+                  | CD 23                                 |
| Cytokeratin 20            | MCM3                      | FABP4                                 |
| CD 45                     | Desmoglein                | CD 20                                 |
| TACSTD2                   | MBP                       | MCM7                                  |
| GLUT1                     | MUC1                      | CD 3e                                 |
| ACE2                      | CD 7                      | Progesteron Receptor                  |
| AIF1                      | CDH17                     | CD 163                                |
| GFAP                      | CD 22                     |                                       |
| TIM3                      | MyoD1                     |                                       |
| Ki67                      | MSH2                      |                                       |
| MART-1                    | Desmin                    |                                       |
| CD 99                     | CD 4                      |                                       |
| TdT                       | HER2                      |                                       |
|                           | Arginase-1                |                                       |
|                           | Inhibin alpha             |                                       |
|                           | CD 31                     |                                       |



**Abbildung 39:** Anteil der Antikörper, die im humanen Testgewebe eine Bande richtiger Größe sowie weitere Banden zeigten.

### 3.5.2 Humane Zelllinien

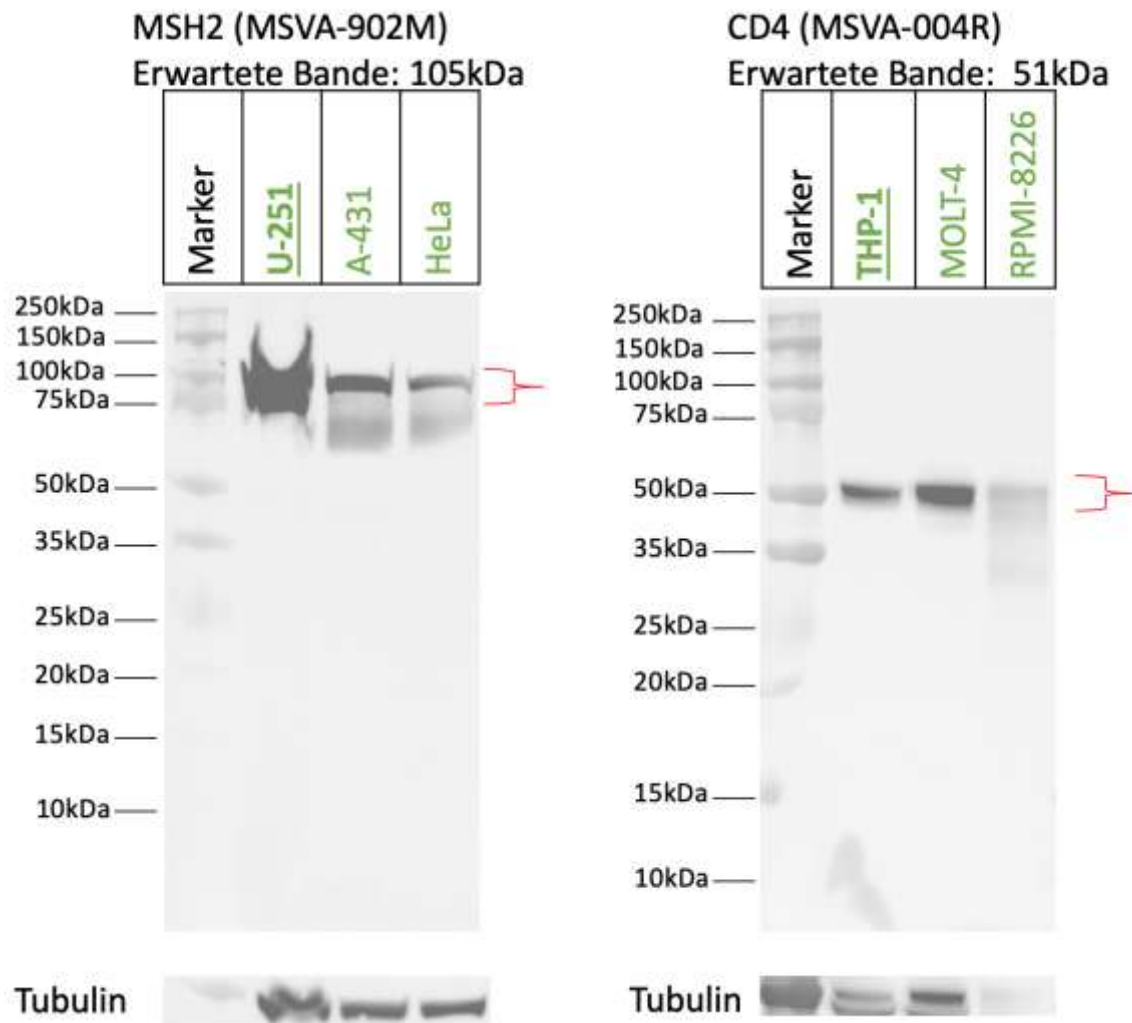
Von den 103 getesteten Antikörpern zeigten 66 Antikörper (64,1 %) in den humanen Zelllinien eine Bande bei der erwarteten Größe, während bei 29 Antikörpern (28,2 %) in keiner der getesteten Zelllinien eine Bande auf bei der erwarteten Proteingröße gefunden wurde, sowie 8 Antikörper (7,8 %), welche aufgrund fehlender passender Ziellinien nicht getestet wurde (Abbildung 40).



**Abbildung 40:** Anteil der Antikörper, die in humanen Zelllinien eine Bande richtiger Größe zeigten.

### 3.5.2.1 Antikörper die eine Bande in erwarteter Größe zeigten

Von den 66 Antikörpern, die eine Bande von erwarteter Größe zeigten, wiesen 21 Antikörper (30,3 %) in mindestens einem (aber nicht unbedingt allen) positiven Zelllinien-Lysaten nur eine einzige Bande, die auch tatsächlich von der erwarteten Größe war. Beispiele für diese Antikörper sind in Abbildung 41 gezeigt, die vollständige Liste dieser Antikörper ist in Tabelle 24 gegeben.



**Abbildung 41:** Beispiele für Antikörper, die eine einzige Bande von erwarteter Größe zeigten:

Antikörper MSH2 und CD4, welche in mindestens einem Zelllinienlysaten nur eine einzige Bande, die auch tatsächlich von der erwarteten Größe war, zeigten. Grün markierte Zelllinien zeigen Literatur eine Expression des Zielproteins, rot markierte Zelllinien zeigen keine Expression. Unterstrichene Zelllinien markieren die für die Analyse ausgewählte Zelllinie.

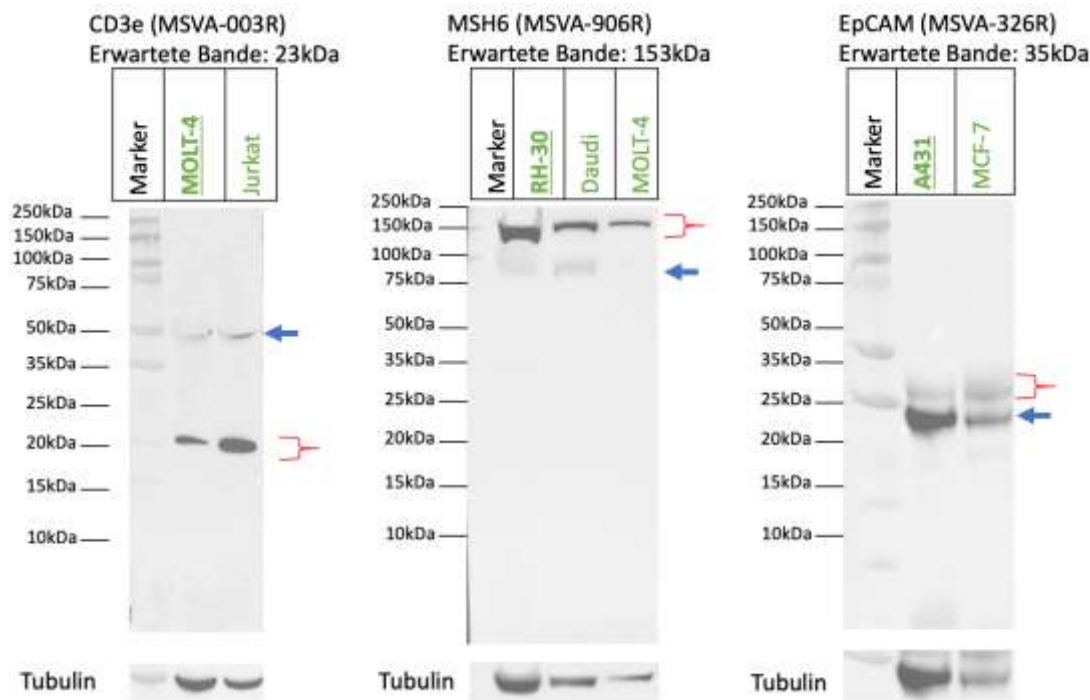
**Tabelle 24:** Liste der Antikörper die nur eine Bande von erwarteter Größe zeigten.

| <b>Antikörper zeigt nur Bande von erwarteter Größe</b> |
|--------------------------------------------------------|
| P16INK4a                                               |
| Desmin                                                 |
| Estrogen Receptor                                      |
| Cytokeratin 19                                         |
| GATA-3                                                 |
| Cytokeratin 10                                         |
| CD 45                                                  |
| MSH2                                                   |
| TdT                                                    |
| CD 4                                                   |
| MCM7                                                   |
| Arginase-1                                             |
| Cytokeratin 15                                         |
| Caldesmon                                              |
| KLK7                                                   |
| CD 99                                                  |
| CD45RA                                                 |
| Ki67                                                   |
| PLAP                                                   |
| HER2                                                   |
| Cytokeratin 7                                          |

### 3.5.2.2 Antikörper die neben der richtigen Bande immer noch zusätzliche Banden zeigten

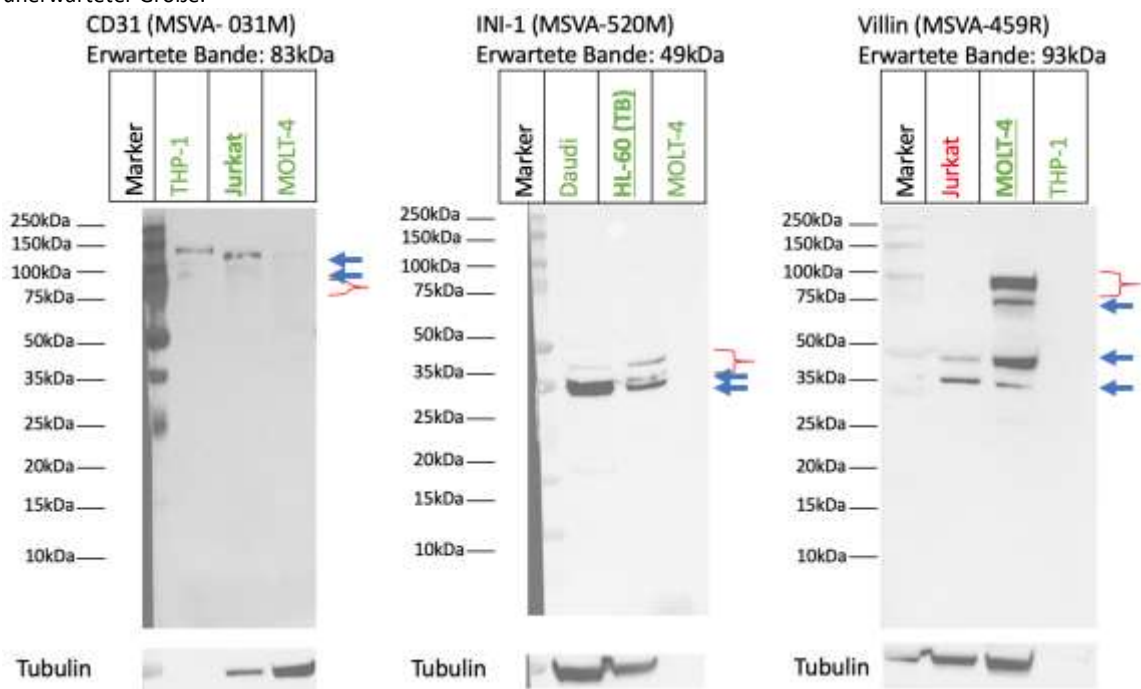
Die weiteren 45 Antikörper der 66 Antikörper (68,2 %), die im Western Blot „funktionierten“ wurden zunächst anhand des best-geeigneten Zelllinienlysats weiter unterteilt. Als bestes Zelllinienlysate wurde die Zelllinie bestimmt, bei der die spezifische Bande am deutlichsten zu sehen war und die wenigsten zusätzlichen Banden gesehen wurden.

20 Antikörper dieser 44 Antikörper (44,4 %) zeigten selbst im besten Zelllinienlysate neben der Bande von erwarteter Größe eine weitere Bande (Abbildung 42), 17 Antikörper (37,8 %) zeigten 2-3 Nebenbanden (Abbildung 43) und 8 Antikörper (17,8 %) zeigten 4 oder mehr Nebenbanden (Abbildung 44). Die vollständige Liste dieser Antikörper ist in Tabelle 25 gegeben, die prozentuale Aufteilung ist in Abbildung 45 gezeigt.



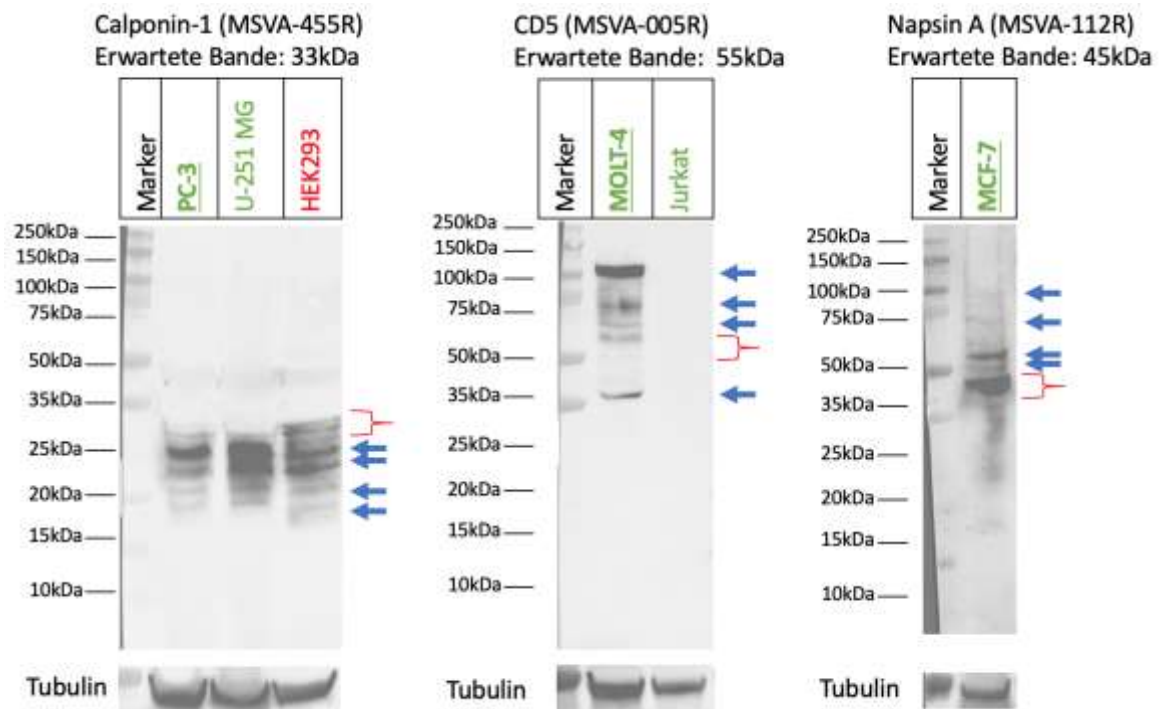
**Abbildung 42:** Antikörper CD3e, MSH6 und EpCAM, welche in ausgewählten Zelllinienlysaten eine Bande von erwarteter Größe sowie eine weitere Bande von unerwarteter Größe zeigten, auch in weiteren Zelllinienlysaten wurde je eine Banden bei erwarteter und eine Bande von unerwarteter Größe detektiert.

Grün markierte Zelllinien zeigen Literatur eine Expression des Zielproteins, rot markierte Zelllinien zeigen keine Expression. Unterstrichene Zelllinien markiert die für die Analyse ausgewählte Zelllinie, die blauen Pfeile markieren die Banden unerwarteter Größe.



**Abbildung 43:** Antikörper CD31, INI-1 und Villin, welche in ausgewählten Zelllinienlysaten eine Bande von erwarteter Größe sowie zwei oder drei weitere Banden von unerwarteter Größe zeigte, auch in weiteren Zelllinienlysaten wurde je eine Banden bei erwarteter und eine Bande von unerwarteter Größe detektiert.

Grün markierte Zelllinien zeigen Literatur eine Expression des Zielproteins, rot markierte Zelllinien zeigen keine Expression. Unterstrichene Zelllinien markiert die für die Analyse ausgewählte Zelllinie, die blauen Pfeile markieren die Banden unerwarteter Größe.

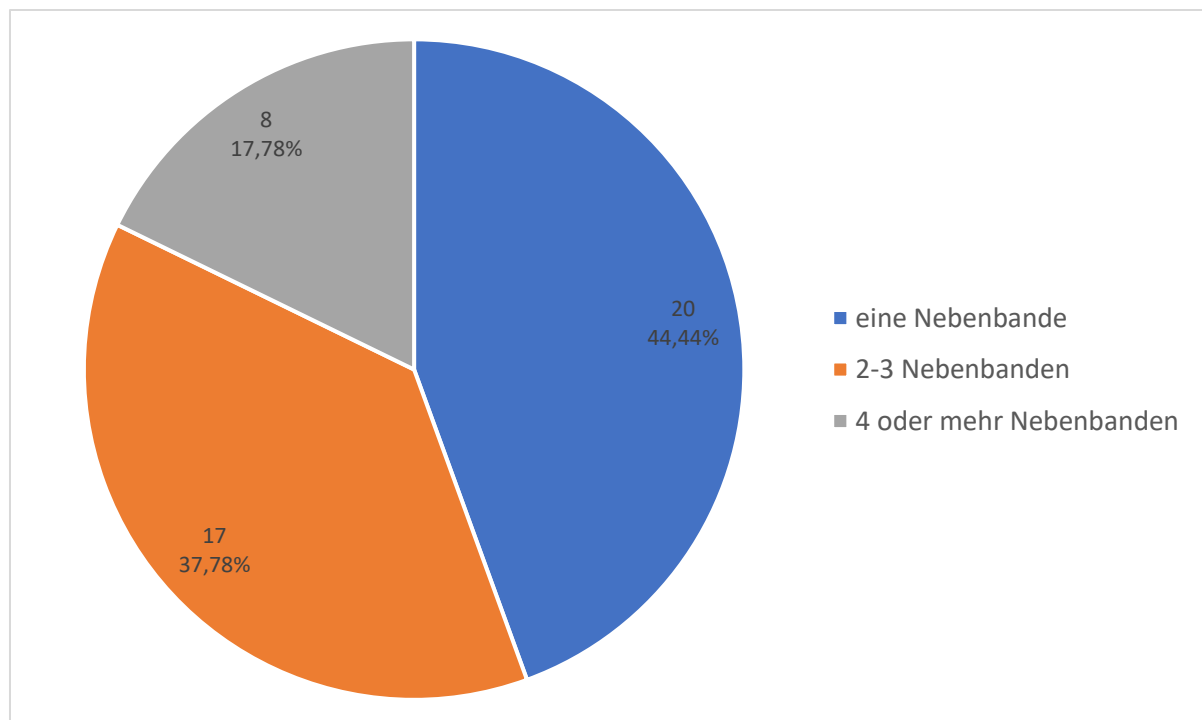


**Abbildung 44:** Antikörper Calponin-1, CD5 und Napsin A, welche in ausgewählten Zelllinienlysaten eine Bande von erwarteter Größe sowie 4 oder mehr weitere Bande von unerwarteter Größe zeigte, auch in weiteren Zelllinienlysaten wurde je eine Banden bei erwarteter und eine Bande von unerwarteter Größe detektiert.

Grün markierte Zelllinien zeigen Literatur eine Expression des Zielproteins, rot markierte Zelllinien zeigen keine Expression. Unterstrichene Zelllinien markieren die für die Analyse ausgewählte Zelllinie, die blauen Pfeile markieren die Banden unerwarteter Größe.

**Tabelle 25:** Liste der Antikörper die neben der Bande von erwarteter Größe weitere Banden zeigten.

| AK zeigen eine Nebenbande | AK zeigen 2-3 Nebenbanden | AK zeigen größer/gleich 4 Nebenbanden |
|---------------------------|---------------------------|---------------------------------------|
| CD3e                      | CD 31                     | CELA3B                                |
| Topoisomerase 2a          | INI-1                     | CD 5                                  |
| Progesteron Receptor      | Factor XIIa               | Calponin-1                            |
| Inhibin alpha             | Cytokeratin 5             | Myosin                                |
| MSH6                      | SOX9                      | GLUT1                                 |
| CD 163                    | Uroplakin 1a              | Uroplakin 1b                          |
| GP2                       | Collagen IV               | Napsin A                              |
| EpCAM                     | Cytokeratin 18            | Cystatin A                            |
| pgp9.5                    | Villin                    |                                       |
| DOG-1                     | Vimentin                  |                                       |
| SATB2                     | MUC5AC                    |                                       |
| Cytokeratin 20            | MUC6                      |                                       |
| TACSTD2                   | Nucleolin                 |                                       |
| MART-1                    | MUC1                      |                                       |
| CD 27                     | CDH17                     |                                       |
| MCM3                      | CD 22                     |                                       |
| Androgen Receptor         | MPO                       |                                       |
| PAPP-A                    |                           |                                       |
| CTLA-3                    |                           |                                       |
| CD 20                     |                           |                                       |



**Abbildung 45:** Anteil der Antikörper, die in humanen Zelllinien eine Bande richtiger Größe sowie weitere Banden zeigten.

### 3.5.3 Nebenbanden durch bekannte Protein-Isoformen

Wie zuvor beschrieben, zeigten 60/45 (Gewebe/Zelllinien) der untersuchten 103 Antikörper selbst in den optimalsten Geweben oder Zelllinien gegebenenfalls im Western Blot neben der Bande von erwarteter Größe noch weitere Banden mit einer Größe, die nicht der kanonischen Proteingröße entsprach.

Bei Testungen im humanen Gewebe konnten bei 3 der 21 Antikörper mit einer Nebenbande (14,3 %) diese Nebenbande durch eine Isoform des Proteins erklärt werden, bei 3 der 24 Antikörpern mit 2-3 Nebenbanden (12,5 %) konnten die Nebenbanden teilweise durch Isoformen des Proteins erklärt werden, bei 4 der 15 Antikörper mit vier oder mehr Nebenbanden (26,7 %) konnten die Nebenbanden teilweise durch Isoformen des Proteins erklärt werden (Tabelle 26).

Bei Testungen in humanen Zelllinien konnten bei 2 der 20 Antikörper mit einer Nebenbande (10,0 %) diese Nebenbande durch eine Isoform des Proteins erklärt werden, bei 6 der 17 Antikörpern mit 2-3 Nebenbanden (35,3 %) konnten die Nebenbanden teilweise durch Isoformen des Proteins erklärt werden, bei einem der 8 Antikörper mit vier oder mehr Nebenbanden (12,5 %) konnten die Nebenbanden teilweise durch Isoformen des Proteins erklärt werden (Tabelle 26).

Eine Darstellung der Antikörper, deren Nebenbanden vollständig durch Isoformen erklärt werden konnte findet sich in Tabelle 27.



**Tabelle 26:** Anzahl Antikörper, deren Nebenbanden teilweise durch Isoformen erklärt werden konnten

| Anzahl Nebenbanden | humanes Gewebe                        |                                                                                  |             |                          | humane Zelllinien                     |                                                                                  |             |                                                  |
|--------------------|---------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------|-------------|--------------------------|---------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------|-------------|--------------------------------------------------|
|                    | Anzahl Antikörper in dieser Kategorie | Anzahl Antikörper, bei welchen Nebenbanden durch Isoformen (teilweise) erklärbar | Prozentsatz | Antikörper               | Anzahl Antikörper in dieser Kategorie | Anzahl Antikörper, bei welchen Nebenbanden durch Isoformen (teilweise) erklärbar | Prozentsatz | Antikörper                                       |
| 1                  | 21                                    | 3                                                                                | 14,29%      | KLK7, ACE2, TIM3         | 20                                    | 2                                                                                | 10,00%      | SATB2, AR                                        |
| 2-3                | 24                                    | 3                                                                                | 12,50%      | Elastin, CD22, CD31      | 17                                    | 6                                                                                | 35,29%      | INI-1, Factor XIIa, CK 18, Nucleolin, CD22, CD31 |
| gleich/größer 4    | 15                                    | 4                                                                                | 26,67%      | AR, CD274, CD45RA, FABP4 | 8                                     | 1                                                                                | 12,50%      | Calponin-1                                       |

**Tabelle 27:** Anzahl Antikörper, deren Nebenbanden komplett durch Isoformen erklärt werden konnten

| Anzahl Nebenbanden | humanes Gewebe                        |                                                                                  |             |            | humane Zelllinien                     |                                                                                  |             |            |
|--------------------|---------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------|-------------|------------|---------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------|-------------|------------|
|                    | Anzahl Antikörper in dieser Kategorie | Anzahl Antikörper, bei welchen Nebenbanden durch Isoformen (teilweise) erklärbar | Prozentsatz | Antikörper | Anzahl Antikörper in dieser Kategorie | Anzahl Antikörper, bei welchen Nebenbanden durch Isoformen (teilweise) erklärbar | Prozentsatz | Antikörper |
| 1                  | 21                                    | 2                                                                                | 9,52%       | KLK7, ACE2 | 20                                    | 1                                                                                | 5,00%       | SATB2      |
| 2-3                | 24                                    | 0                                                                                | 0,00%       |            | 17                                    | 0                                                                                | 0,00%       |            |
| gleich/größer 4    | 15                                    | 0                                                                                | 0,00%       |            | 8                                     | 0                                                                                | 0,00%       |            |

### 3.5.4 Vergleich Gewebelysate mit Zelllinien-Lysaten

Zusammenfassend zeigt sich, dass von den 103 analysierten Antikörpern im humanen Gewebe 94 Antikörper analysiert werden konnten. Hierbei zeigten 36 Antikörper (38,3 %) entweder nur die Bande auf erwarteter Höhe oder zusätzlich weitere Banden welche durch Isoformen des Proteins erklärt werden konnten, 58 Antikörper (61,7 %) zeigten unter anderem Nebenbanden, welche nicht durch Isoformen erklärbar waren. In den Zelllinienlysaten konnten von den 103 getesteten Antikörpern 66 Antikörper analysiert werden, hierbei zeigten 22 Antikörper (33,3 %) nur die Bande erwarteter Größe oder erklärbare Nebenbanden, 44 Antikörper (66,6 %) zeigten zusätzliche Banden welche nicht erklärbar waren (Tabelle 28).

Im Vergleich zwischen den Ergebnissen der Analyse im humanen Gewebe zu humanen Zelllinien ergab sich ein  $\chi^2$ -Wert von 0,52. Somit ist kein signifikanter Unterschied in der Häufigkeit an gut funktionierenden Antikörpern in Abhängigkeit zum Testlysat (Gewebe/Zelllinie) zu beobachten.

**Tabelle 28:** Vier-Felder-Tafel der Kategorisierung der Antikörper für Gewebelysate und Zelllinien-Lysate

|                  | <b>gute AK (nur<br/>eine Bande oder<br/>erklärbare<br/>Nebenbanden)</b> | <b>schlechte AK<br/>(nicht erklärbare<br/>Nebenbanden)</b> | <b>Summe</b> |
|------------------|-------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------|--------------|
| <b>Gewebe</b>    | 36                                                                      | 58                                                         | 94           |
| <b>Zelllinie</b> | 22                                                                      | 44                                                         | 66           |
| <b>Summe</b>     | 58                                                                      | 102                                                        | 160          |

Der Vergleich zwischen den als „gut“ klassifizierten Antikörper zeigte sich, dass 8 Antikörper sowohl im humanen Gewebe als auch in den humanen Zelllinien als „gut“ klassifiziert wurden (

*Tabelle 29*), dies entspricht 22,2 % aller als „gut“ klassifizierten Antikörper bei der Testung im humanen Gewebe und 36,4 % der Antikörper bei Testungen in humanen Zelllinien. 25 der 36 guten Gewebe-Antikörper (69,4 %) wurden bei Testungen nur im humanen Gewebe als „gut“ klassifiziert. 14 der 22 guten Zelllinien-Antikörper (63,6 %) wurden nur in humanen Zelllinien als „gut“ klassifiziert. Es wurden 3 Antikörper, welche bei Testungen im humanen Gewebe als „gut“ klassifiziert wurden, aufgrund fehlender positiver Zelllinien nicht in Zelllinien getestet.

**Tabelle 29:** Liste der Klassifizierung „guter“ Antikörper für Lysate aus Gewebe und Zelllinien.

| Zielprotein       | positives Testlysat |            |
|-------------------|---------------------|------------|
|                   | Gewebe              | Zelllinien |
| Caldesmon         | ✓                   | ✓          |
| Cytokeratin 15    | ✓                   | ✓          |
| Cytokeratin 19    | ✓                   | ✓          |
| Cytokeratin 7     | ✓                   | ✓          |
| Estrogen Receptor | ✓                   | ✓          |
| GATA-3            | ✓                   | ✓          |
| KLK7              | ✓                   | ✓          |
| SATB2             | ✓                   | ✓          |
| Calponin-1        | ✓                   | (✓)        |
| CD 5              | ✓                   | (✓)        |
| CELA3B            | ✓                   | (✓)        |
| Collagen IV       | ✓                   | (✓)        |
| Cytokeratin 18    | ✓                   | (✓)        |
| Cytokeratin 5     | ✓                   | (✓)        |
| DOG-1             | ✓                   | (✓)        |
| EpCAM             | ✓                   | (✓)        |
| Factor XIIIa      | ✓                   | (✓)        |
| INI-1             | ✓                   | (✓)        |

| Zielprotein      | positives Testlysat |            |
|------------------|---------------------|------------|
|                  | Gewebe              | Zelllinien |
| p99.5            | ✓                   | (✓)        |
| SOX9             | ✓                   | (✓)        |
| Topoisomerase 2a | ✓                   | (✓)        |
| Uroplakin 1a     | ✓                   | (✓)        |
| Arginase-1       | (✓)                 | ✓          |
| CD 4             | (✓)                 | ✓          |
| CD 45            | (✓)                 | ✓          |
| CD 99            | (✓)                 | ✓          |
| CD45RA           | (✓)                 | ✓          |
| Cytokeratin 10   | (✓)                 | ✓          |
| Desmin           | (✓)                 | ✓          |
| HER2             | (✓)                 | ✓          |
| Ki67             | (✓)                 | ✓          |
| MCM7             | (✓)                 | ✓          |
| MSH2             | (✓)                 | ✓          |
| PLAP             | (✓)                 | ✓          |
| TdT              | (✓)                 | ✓          |

| Zielprotein     | positives Testlysat |                |
|-----------------|---------------------|----------------|
|                 | Gewebe              | Zelllinien     |
| ACE2            | ✓                   | ✗              |
| CD 34           | ✓                   | ✗              |
| CEA             | ✓                   | ✗              |
| Cytokeratin 13  | ✓                   | ✗              |
| FABP1           | ✓                   | ✗              |
| HLA-DRA         | ✓                   | ✗              |
| INSM1           | ✓                   | ✗              |
| Mesothelin      | ✓                   | ✗              |
| Pan-Cytokeratin | ✓                   | ✗              |
| S100P           | ✓                   | ✗              |
| vWF             | ✓                   | ✗              |
| P16INK4a        | ✗                   | ✓              |
| Cytokeratin 14  | ✓                   | nicht getestet |
| Cytokeratin 6   | ✓                   | nicht getestet |
| S100B           | ✓                   | nicht getestet |

- ✓ Nur Bande von erwarteter Größe sichtbar  
 (✓) Neben Bande von erwarteter Größe weitere Banden sichtbar  
 ✗ Nur Bande von nicht-erwarteter Größe sichtbar

### 3.6 Antikörper-Validierung 2: Kreuzreaktivität

Aufgrund ähnlicher Epitope kann es sowohl innerhalb der Protein-Familie im Menschen als auch zwischen verschiedenen Spezies zu Kreuzreaktionen eines Antikörpers kommen.

#### 3.6.1 PRSS2 vs. Andere PRSS-Proteine

PRSS2 gehört zur Trypsin-Familie der Serin-Proteasen und ist ein Protein mit hoher Ähnlichkeit zu den anderen Proteinen der Familie (89,47 % zu PRSS1, 85,43 % zu PRSS3) (Abbildung 46). Daher können Peptidsequenzen, welche zur Generierung der Antikörper potenziell geeignet sind (siehe 3.1.1 Einfluss der Peptidwahl), nicht einmalig für PRSS2 sein, sondern auch in anderen PRSS-Proteinen vorhanden sein und als Immunisierungspeptide für diese geeignet sein (Abbildung 47). Es ist somit eine hohe Wahrscheinlichkeit für eine Kreuzreaktivität des erstellten Antikörpers vorhanden.



**Abbildung 46:** Sequenzidentität der Proteine PRSS1 (TYR1), PRSS2 (TYR2) und PRSS2 (TYR3) der kanonischen Sequenzen jedes Proteins. Alignment via Uniprot alignment.



Für den Klon PRSS1\_2\_9D1\_3\_1\_2\_1\_2\_4 (Abbildung 48) ist im Western Blot ein Antikörper-Signal nur auf Höhe von 25kDa zu detektieren in Lysaten mit Überexpression von PRSS1 und ein leichtes Signal in Lysaten der Überexpression von PRSS2. In Wildtyp Lysaten und Lysaten mit Überexpression von PRSS3 ist kein Signal zu erkennen. Dieser Klon zeigt im ELISA eine Reaktivität gegenüber den Peptidsequenzen PRSS1\_A und PRSS1\_G. Die Sequenz von PRSS1\_A ist mit recht hoher Ähnlichkeit auch in den Proteinsequenzen von PRSS2 und PRSS3 enthalten und für PRSS2 auch als Immunisierungspeptid geeignet. PRSS1\_G ist nahezu identisch auch als Immunisierungspeptid für PRSS3 und PRSS2 geeignet.

#### **PRSS1\_2\_9D1\_3\_1\_2\_1\_2\_4 (Peptid A, G)**

##### Peptidsequenz

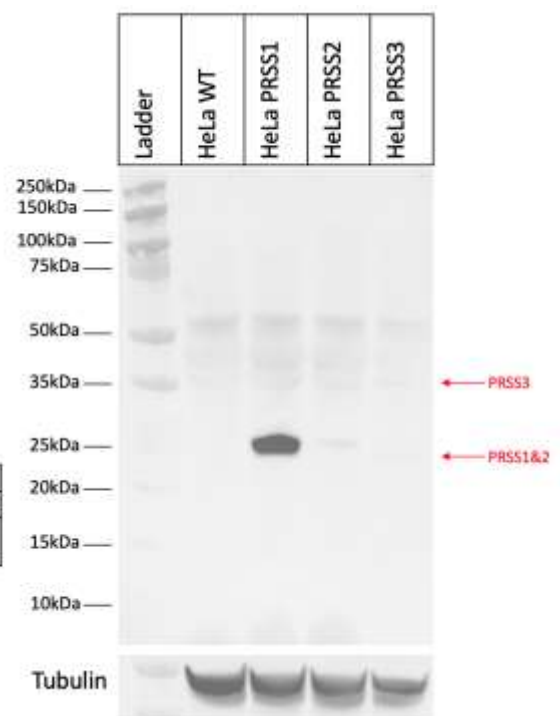
```

DADGCEALGTAVVPFDDDDKIVGGYTCEENSLPY
-----TFVAAALAAPFDDDDKIVGGYTCEENSLPY PRSS1_A ←
-----TFVAAALAAPFDDDDKIVGGYTCEENSLPY PRSS2_A
'SWGDCANKNRPGVYTKVINYVDWIKDTI 300 PRSS3_I
'SWDCGLAKNKPQVYTKVINYVVKWIKNTI 243 PRSS1_G ←
'SWDCGLAKNKPQVYTKVINYVDWIKDTI 243 PRSS2_I
:*** ** :*****:***:

```

##### ELISA-Ergebnisse

| Maus    | Klon | Peptid                 | 1.ELISA | 2.ELISA |         |         |         |         |
|---------|------|------------------------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|
|         |      |                        |         | PRSS1_A | PRSS1_B | PRSS1_C | PRSS1_D | PRSS1_G |
| PRSS1_2 | 9D1  | PRSS1_A,<br>B, C, D, G | 0,4391  | 0,1557  | 0,0334  | 0,0458  | 0,0568  | 0,566   |



**Abbildung 48:** PRSS1\_2\_9D1\_3\_1\_2\_1\_2\_4 Vergleich der verschiedenen, zur Immunisierung verwendeten Peptidsequenzen sowie die Austestung des ausgewählten Klons auf Reaktivität gegen die verwendeten Peptide (rot markiert, links). Austestung auf Kreuzreaktivität zu den verwandten Proteinen PRSS2 und PRSS3 in transfizierten HeLa-Lysaten mittels Überstand des ausgewählten Hybridoma-Klons (rechts).

Für den Klon PRSS1\_3\_8G12(1) (Abbildung 49) ist im Western Blot in den Lysaten mit Überexpression von PRSS1, PRSS2 und PRSS3 ein Antikörper-Signal auf Höhe von 25kDa sowie bei 32kDa zu detektieren. In Wildtyp Lysaten ist nur ein schwaches Signal auf Höhe von 32kDa zu erkennen. Dieser Klon zeigt im ELISA eine Reaktivität gegenüber der Peptidsequenz PRSS1\_B. Die Sequenz von PRSS1\_B ist mit recht hoher Ähnlichkeit auch in den Proteinsequenzen von PRSS2 und PRSS3 enthalten und auch für beide Proteine als Immunisierungspeptid geeignet.

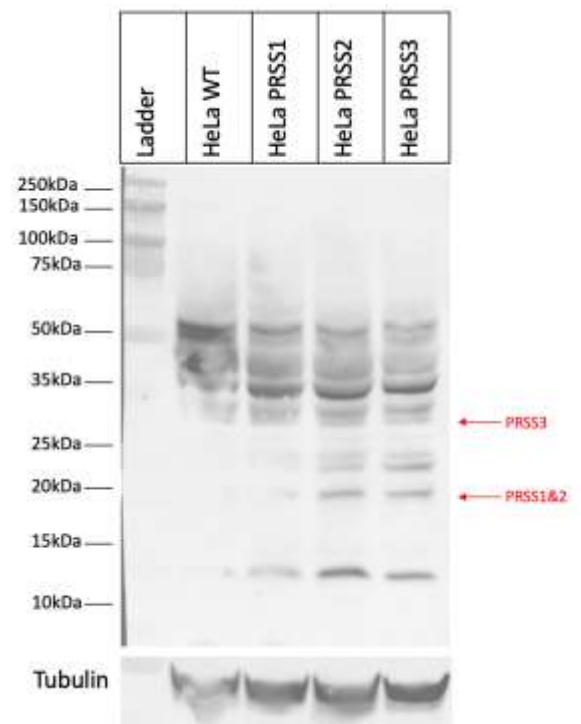
### **PRSS1\_3\_8G12(1) (Peptid B)**

#### **Peptidsequenz**

CYKT **LEVRIGEHRIKYLE** GNEQFINAAI PRSS3\_E  
 YKSRIDWRI **LEVRIGEHRIKYLE** NAAI PRSS1\_B ←  
 CYKSRIQVRL **LEVRIGEHRIKYLE** NAAI PRSS2\_D

#### **ELISA-Ergebnisse**

| Maus    | Klon | Peptid                 | 1.ELISA | 2.ELISA |         |         |         |         |
|---------|------|------------------------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|
|         |      |                        |         | PRSS1_A | PRSS1_B | PRSS1_C | PRSS1_D | PRSS1_G |
| PRSS1_3 | 8G12 | PRSS1_A,<br>B, C, D, G | 0,6052  | 0,0424  | 0,5953  | 0,0931  | 0,0536  | 0,0562  |



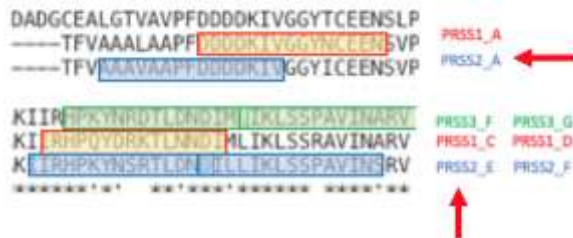
**Abbildung 49:** PRSS1\_3\_8G12(1) Vergleich der verschiedenen, zur Immunisierung verwendeten Peptidsequenzen sowie die Austestung des ausgewählten Klons auf Reaktivität gegen die verwendeten Peptide (rot markiert, links). Austestung auf Kreuzreaktivität zu den verwandten Proteinen PRSS2 und PRSS3 in transfizierten HeLa-Lysaten mittels Überstand des ausgewählten Hybridoma-Klons (rechts).



Für den Klon PRSS2\_3\_5G1 (Abbildung 50) ist im Western Blot detektieren in den Lysaten mit Überexpression von PRSS1, PRSS2 und PRSS3 ein Antikörper-Signal auf Höhe von 25kDa. In Wildtyp Lysaten kein Signal zu erkennen. Dieser Klon zeigt im ELISA eine Reaktivität gegenüber der Peptidsequenz PRSS2\_A. Die Sequenz von PRSS2\_A ist mit recht hoher Ähnlichkeit auch in den Proteinsequenzen von PRSS2 und PRSS3 enthalten, jedoch nur anteilig für PRSS1 als Immunisierungspeptid geeignet.

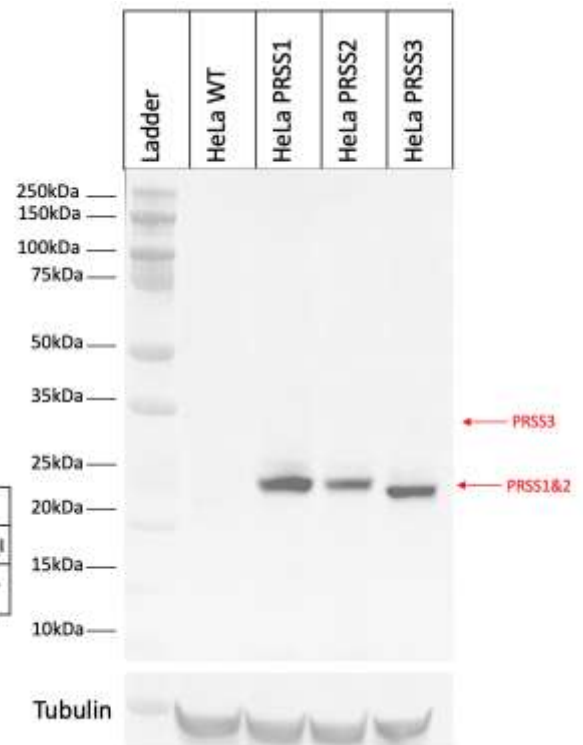
### PRSS2 3 5G1 (Peptid A, E)

#### Peptidsequenz



#### ELISA-Ergebnisse

|         |      |                     | 1.ELISA | 2.ELISA |         |         |         |         |
|---------|------|---------------------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|
| Maus    | Klon | Peptid              |         | PRSS2_A | PRSS2_D | PRSS2_E | PRSS2_F | PRSS2_I |
| PRSS2_3 | 5G1  | PRSS2_A<br>,D,E,F,I | 0,4656  | 0,5504  | 0,035   | 0,0362  | 0,0308  | 0,0137  |



**Abbildung 50:** PRSS2\_3\_5G1 Vergleich der verschiedenen, zur Immunisierung verwendeten Peptidsequenzen sowie die Austestung des ausgewählten Klon auf Reaktivität gegen die verwendeten Peptide (rot markiert, links). Austestung auf Kreuzreaktivität zu den verwandten Proteinen PRSS1 und PRSS3 in transfizierten HeLa-Lysaten mittels Überstand des ausgewählten Hybridoma-Klons (rechts).

Für den Klon PRSS2\_1\_9B4 (Abbildung 51) ist im Western Blot in den Lysaten mit Überexpression von PRSS2 ein Antikörper-Signal auf Höhe von 25kDa detektieren. In Wildtyp Lysaten, sowie Lysaten mit Überexpression von PRR1 oder PRSS3, sind keine Signale zu erkennen. Dieser Klon zeigt im ELISA eine Reaktivität gegenüber der Peptidsequenz PRSS2\_E. Die Sequenz von PRSS2\_E ist mit recht hoher Ähnlichkeit auch in den Proteinsequenzen von PRSS2 und PRSS3 enthalten und auch als nahezu identischer Sequenz für diese beiden Proteine als Immunisierungspeptid geeignet.

### **PRSS2 1 9B4 (Peptid E)**

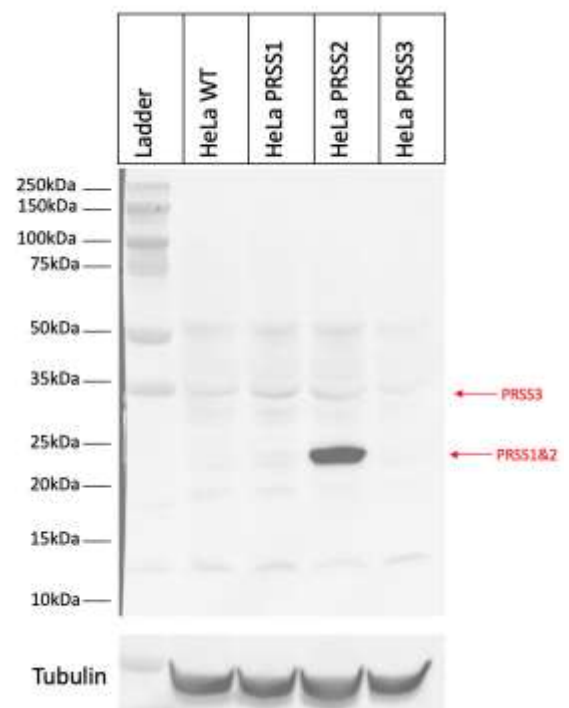
#### **Peptidsequenz**

KIIRPKYNDTLMDIHLIKLSSPAVINARV PRSS3\_F PRSS3\_G  
 KIIRPKYDHLMDIHLIKLSSRAVINARV PRSS1\_C PRSS1\_D  
 KIIRPKYDHLMDIHLIKLSSPAVINARV PRSS2\_E PRSS2\_F



#### **ELISA-Ergebnisse**

| Maus    | Klon | Peptid              | 1.ELISA | 2.ELISA |         |         |         |         |
|---------|------|---------------------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|
|         |      |                     |         | PRSS2_A | PRSS2_D | PRSS2_E | PRSS2_F | PRSS2_I |
| PRSS2_1 | 9B4  | PRSS2_A,<br>D,E,F,I | 0,3885  | 0,0351  | 0,035   | 0,4844  | 0,0308  | 0,0385  |



**Abbildung 51:** PRSS2\_1\_9B4 Vergleich der verschiedenen, zur Immunisierung verwendeten Peptidsequenzen sowie die Austestung des ausgewählten Klon auf Reaktivität gegen die verwendeten Peptide (rot markiert, links). Austestung auf Kreuzreaktivität zu den verwandten Proteinen PRSS1 und PRSS3 in transfizierten HeLa-Lysaten mittels Überstand des ausgewählten Hybridoma-Klons (rechts).

Für den Klon PRSS3\_7\_5E7 (Abbildung 52) ist im Western Blot in den Lysaten mit Überexpression von PRSS3 ein Antikörper-Signal auf Höhe von 25kDa zu detektieren. In Wildtyp Lysaten, sowie Lysaten mit Überexpression von PRSS1 oder PRSS2, sind schwache Signale auf Höhe von 25kDa und 32kDa zu erkennen. Dieser Klon zeigt im ELISA eine Reaktivität gegenüber der Peptidsequenz PRSS3\_I. Die Sequenz von PRSS3\_I ist mit recht hoher Ähnlichkeit auch in den Proteinsequenzen von PRSS1 und PRSS2 enthalten und auch als nahezu identischer Sequenz für diese beiden Proteine als Immunisierungspeptid geeignet.

### PRSS3 7 5E7 (Peptid I)

#### Peptidsequenz

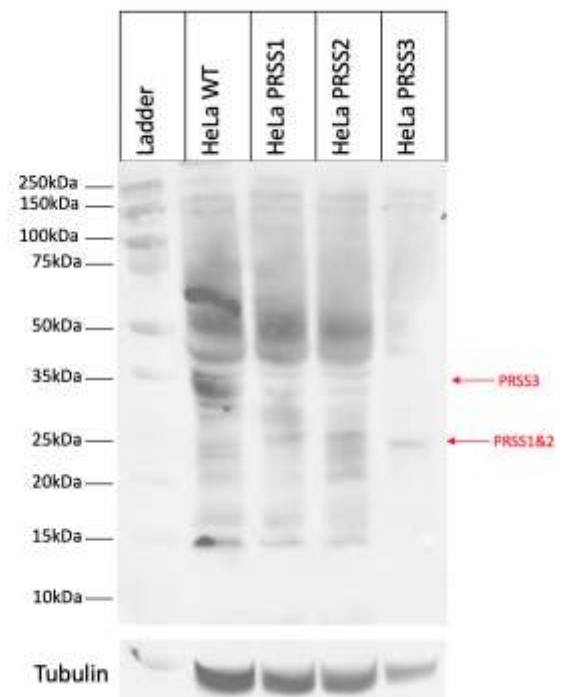
```

sp|P35830|TRY3_HUMAN 'SWG'GLANDRIKGYTKYNYVDWIKDTI 300 PRSS3_I ←
sp|P07477|TRY1_HUMAN 'SWG'GLANDRIKGYTKYNYVKWIKNTI 243 PRSS1_G
sp|P07478|TRY2_HUMAN 'SWG'GLANDRIKGYTKYNYVDWIKDTI 243 PRSS2_I
    *** ** *****

```

#### ELISA-Ergebnisse

| Maus    | Klon | Peptid              | 1.ELISA | 2.ELISA |         |         |         |         |
|---------|------|---------------------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|
|         |      |                     |         | PRSS3_B | PRSS3_E | PRSS3_F | PRSS3_G | PRSS3_I |
| PRSS3_7 | 5E7  | PRSS3_B, E, F, G, I | 0,4336  | 0,0356  | 0,0357  | 0,037   | 0,037   | 0,309   |



**Abbildung 52:** PRSS3\_7\_5E7 Vergleich der verschiedenen, zur Immunisierung verwendeten Peptidsequenzen sowie die Austestung des ausgewählten Klons auf Reaktivität gegen die verwendeten Peptide (rot markiert, links). Austestung auf Kreuzreaktivität zu den verwandten Proteinen PRSS1 und PRSS2 in transfizierten HeLa-Lysaten mittels Überstand des ausgewählten Hybridoma-Klons (rechts).

Für den Klon PRSS3\_7\_2G4 (Abbildung 53) ist im Western Blot detektieren in Lysaten mit Überexpression von PRSS3 ein Antikörper-Signal auf Höhe von 25kDa und 32kDa zu. In Lysaten mit Überexpression von PRSS1 oder PRSS2 sind auch Signale auf Höhe von 25kDa und 32kDa zu erkennen, im Lysat von Wildtypzellen sind keine Signale bei 25kDa oder 32kDa zu erkennen. Dieser Klon zeigt im ELISA eine Reaktivität gegenüber der Peptidsequenz PRSS3\_E. Die Sequenz von PRSS3\_E ist mit recht hoher Ähnlichkeit auch in den Proteinsequenzen von PRSS1 und PRSS2 enthalten und anteilig als Sequenz für diese beiden Proteine als Immunisierungspeptid geeignet.

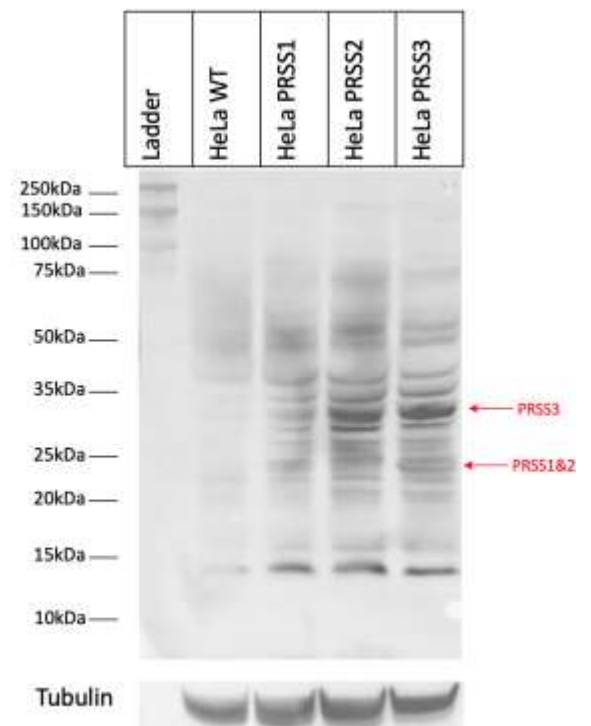
### **PRSS3 7 2G4 (Peptid E)**

#### **Peptidsequenz**

sp|P35830|TRY3\_HUMAN CYKTETDVLGCHNIAVLTGNEOFINAAI PRSS3\_I  
 sp|P87477|TRY1\_HUMAN TYSSTIDVILTETDVLGCHNIAVLTGNEOFINAAI PRSS1\_B  
 sp|P87478|TRY2\_HUMAN CYKSRIQVRLTETDVLGCHNIAVLTGNEOFINAAI PRSS2\_D

#### **ELISA-Ergebnisse**

| Maus    | Klon | Peptid                 | 1.ELISA | 2.ELISA |         |         |         |         |
|---------|------|------------------------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|
|         |      |                        |         | PRSS3_B | PRSS3_E | PRSS3_F | PRSS3_G | PRSS3_I |
| PRSS3_7 | 2G4  | PRSS3_B,<br>E, F, G, I | 0,4032  | 0,0348  | 0,3156  | 0,0338  | 0,0338  | 0,0357  |



**Abbildung 53:** PRSS3\_7\_2G4 Vergleich der verschiedenen, zur Immunisierung verwendeten Peptidsequenzen sowie die Austestung des ausgewählten Klons auf Reaktivität gegen die verwendeten Peptide (rot markiert, links). Austestung auf Kreuzreaktivität zu den verwandten Proteinen PRSS1 und PRSS2 in transfizierten HeLa-Lysaten mittels Überstand des ausgewählten Hybridoma-Klons (rechts).

Für den Klon PRSS3\_7\_5A8 (Abbildung 54) ist im Western Blot kein Antikörper-Signal in Lysaten mit Überexpression von PRSS3 zu detektieren. Auch in Lysaten des Wildtyps oder in Zelllysaten mit Überexpression von PRSS1 oder PRSS2 sind keine Signale zu erkennen. Dieser Klon zeigt im ELISA eine Reaktivität gegenüber der Peptidsequenz PRSS3\_E. Die Sequenz von PRSS3\_E ist mit recht hoher Ähnlichkeit auch in den Proteinsequenzen von PRSS1 und PRSS2 enthalten und anteilig als Sequenz für diese beiden Proteine als Immunisierungspeptid geeignet.

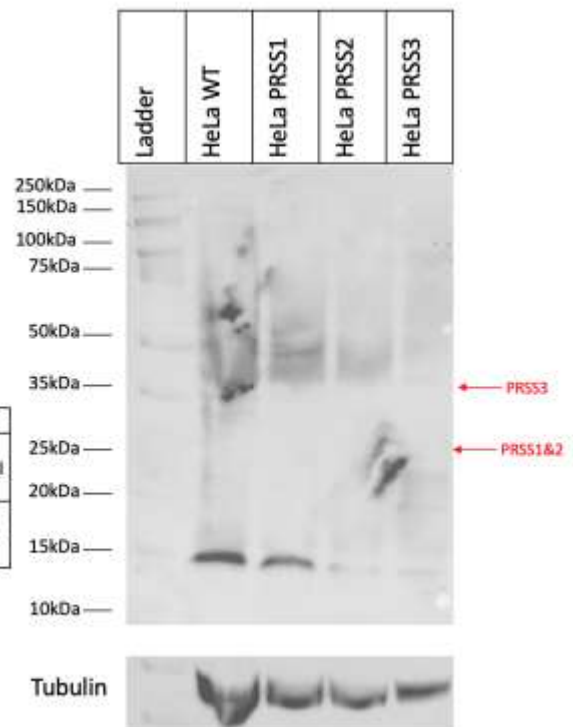
### PRSS3 7 5A8 (Peptid E)

#### Peptidsequenz

sp|P35830|TRY3\_HUMAN CYKTGVNVEGRTNRYLEQNEQFINAAI PRSS3\_E  
 sp|P07477|TRY1\_HUMAN VYSSDQWVLELVLEQNEQFINAAI PRSS1\_B  
 sp|P07478|TRY2\_HUMAN CYKSRIQVRLVRLVLELVLEQNEQFINAAI PRSS2\_D

#### ELISA-Ergebnisse

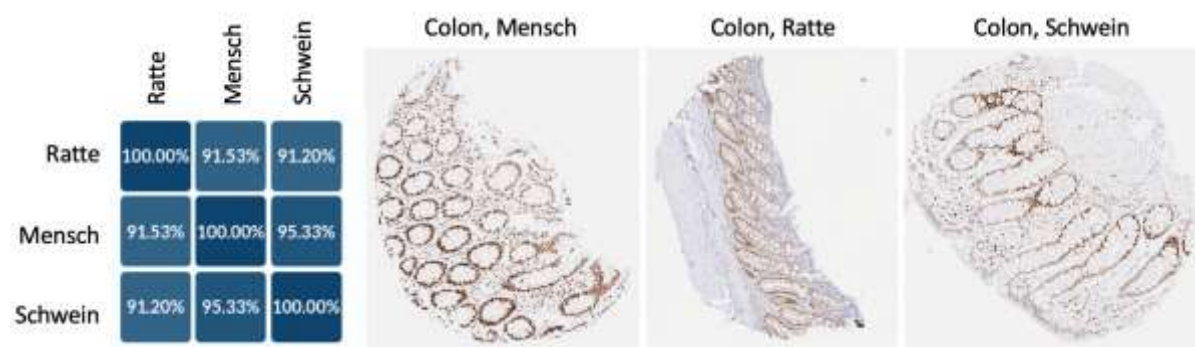
| Maus    | Klon | Peptid              | 1.ELISA |         | 2.ELISA |         |         |         |  |
|---------|------|---------------------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|--|
|         |      |                     |         | PRSS3_B | PRSS3_E | PRSS3_F | PRSS3_G | PRSS3_I |  |
| PRSS3_7 | 5A8  | PRSS3_B, E, F, G, I | 0,424   | 0,0362  | 0,3422  | 0,0337  | 0,0337  | 0,0576  |  |



**Abbildung 54:** PRSS3\_7\_5A8 Vergleich der verschiedenen, zur Immunisierung verwendeten Peptidsequenzen sowie die Austestung des ausgewählten Klons auf Reaktivität gegen die verwendeten Peptide (rot markiert, links). Austestung auf Kreuzreaktivität zu den verwandten Proteinen PRSS1 und PRSS2 in transfizierten HeLa-Lysaten mittels Überstand des ausgewählten Hybridoma-Klons (rechts).

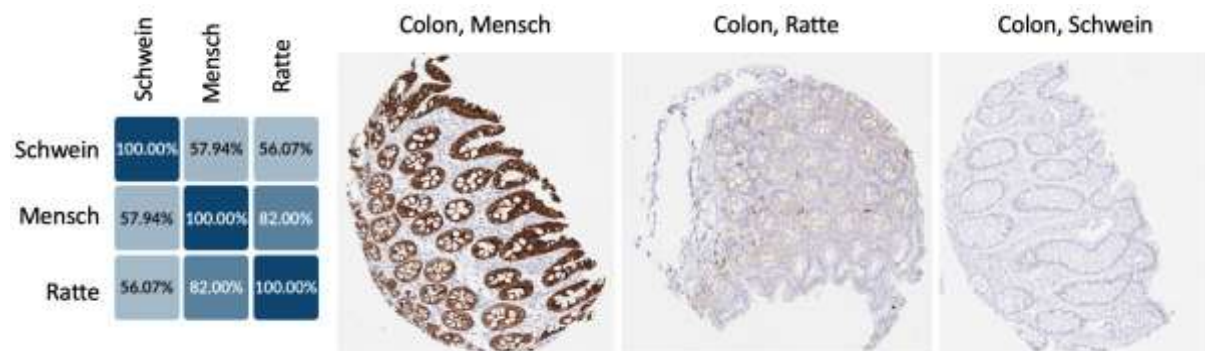
### 3.6.2 Kreuzreaktivität in verschiedenen Spezies

Zur Testung der Kreuzreaktivität der erstellten Antikörper zwischen verschiedenen Spezies wurden Antikörper, welche gegen menschliche Zielproteine gerichtet sind, auf verschiedenen Geweben aus Ratte und Schwein getestet. Hierbei zeigte sich, dass eine hohe Ähnlichkeit der Proteinsequenzen in vielen Fällen vorliegt und somit eine Färbung des gewünschten Proteins in vielen Fällen auch in Ratte oder Schwein möglich ist. Beispielhaft ist hierbei ein Antikörper gegen MSH2 in Abbildung 55 dargestellt. Eine spezifische Färbung durch den Antikörper ist in allen drei Spezies im Colon-Gewebe sichtbar. Die Sequenzähnlichkeit liegt hier zwischen den verschiedenen Spezies bei mehr als 90 %.



**Abbildung 55:** Darstellung der Färbung des Antikörpers MSH2 im Colon-Gewebe von Mensch (links), Ratte (mitte) und Schwein (rechts), sowie die prozentuale Ähnlichkeit der Proteinsequenzen der verschiedene Spezies.

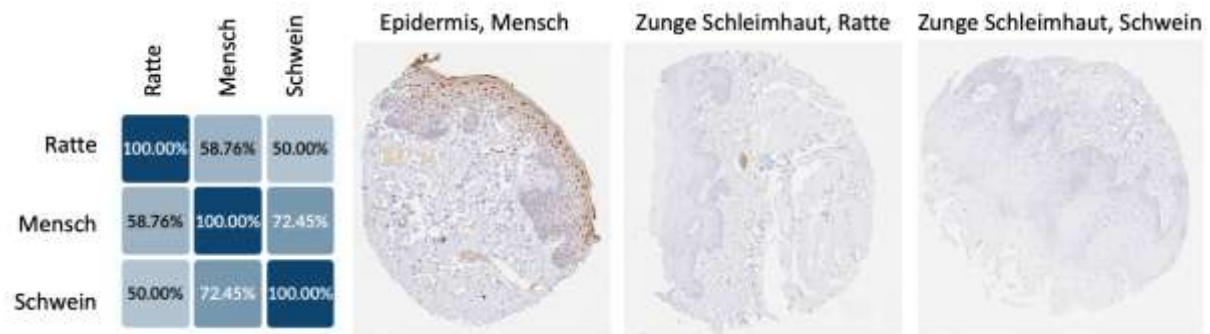
Im Gegensatz hierzu zeigte der Antikörper Cytokeratin 19 keine spezifische Reaktivität im Schwein und eine schwache Reaktivität im Colon-Gewebe der Ratte. Hierbei lag die Sequenzähnlichkeit zum Menschen beim Schwein bei 58 %, bei der Ratte bei 82 % (Abbildung 56).



**Abbildung 56:** Darstellung der Färbung des Antikörpers Cytokeratin 19 im Colon-Gewebe von Mensch (links), Ratte (mitte) und Schwein (rechts), sowie die prozentuale Ähnlichkeit der Proteinsequenzen der verschiedene Spezies.

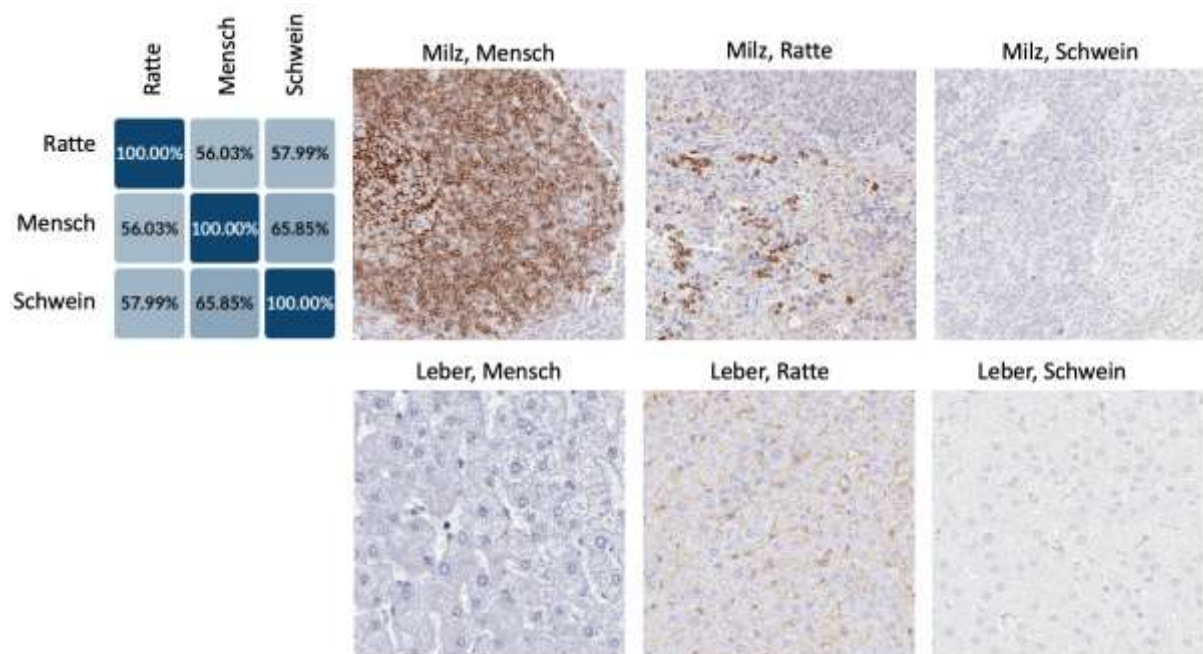


Für den Antikörper Cystatin A konnte im Epidermis-Gewebe von Ratte und Schwein keine Färbung durch den Antikörper beobachtet werden. Die Sequenzähnlichkeit zur menschlichen Proteinsequenz liegt hier bei der Ratte bei 59 % und bei Schwein bei 72 % (Abbildung 57).



**Abbildung 57:** Darstellung der Färbung des Antikörpers Cystatin A im Epidermis-Gewebe von Mensch (links), sowie der Zunge-Schleimhaut von Ratte (mitte) und Schwein (rechts), sowie die prozentuale Ähnlichkeit der Proteinsequenzen der verschiedene Spezies.

Eine unspezifische Färbung durch den Antikörper in Gewebe von Ratte und Schwein ist beispielhaft für den Antikörper CD23 dargestellt. Im Menschen werden hierbei spezifisch Zellen im Tonsillen-Gewebe angefärbt, in der Ratte ist diese Färbung auch erkennbar, im Schwein jedoch nicht. Zudem gibt es in der Ratte eine unspezifische Färbung unter anderem im Gewebe der Leber, welche sowohl im Lebergewebe vom Menschen als auch Schwein nicht erkennbar ist. Für Ratte liegt eine Sequenzähnlichkeit von 56 % zur humane Proteinsequenz von CD23 vor, für das Schwein liegt eine Ähnlichkeit von 66 % vor (Abbildung 58).



**Abbildung 58:** Darstellung der Färbung des Antikörpers CD23 im Milz-Gewebe von Mensch (oberer Reihe, links), sowie Ratte (oberer Reihe, mitte) und Schwein (oberer Reihe, rechts), sowie das Leber - Gewebe von Mensch (untere Reihe, links), Ratte (untere Reihe, mitte) und Schwein (untere Reihe, rechts). Die prozentuale Ähnlichkeit der Proteinsequenzen der verschiedenen Spezies ist in der oberen Reihe ganz links dargestellt.

### 3.7 Antikörper-Validierung 3: Vergleich mit mRNA-Expression in Zelllinien

Die Validierung von Ergebnissen durch die Verwendung von orthogonalen Methoden ist ein wichtiges Instrument in der Forschung, hierbei sollen Ergebnisse durch eine alternative Methode bestätigt werden, um so potentielle Fehler aufzudecken. Es ist für die Bestätigung einer Fragestellung notwendig, dass zwei verschiedene Methoden mit unterschiedlichen Ansätzen (Protein- vs. DNA/RNA-basiert) das gleiche Ergebnis zeigen.

Im Sinne dieses Ansatzes wurde die Expression 13 verschiedener Proteine in 104 FFPE-fixierten Zelllinien sowohl mittels RT-PCR als auch mittels Immunhistochemie analysiert und die Ergebnisse verglichen. Es wurde zunächst geschaut, ob eine verlässliche Färbung der Zelllinien vorhanden ist, um sicher zu gehen das keine Beschädigung der Zelllinie bzw. der RNA vorliegt, da auch die RNA aus den fixierten Zelllinien-Blöcken gewonnen wurde. Es wurde davon ausgegangen, dass eine positive Färbung der Zelllinie in mehr als einem Fall der 13 analysierten Proteine auf eine funktionierende Zelllinie hinweist. Bei 47 der 104 Zelllinien (45,2 %) lag eine Färbung bei mehr als einem gefärbten Zielprotein vor, diese Zelllinien wurden als „funktionierend“ eingruppiert. Bei 36 von 104 Zelllinien (34,6 %) war eine Färbung bei einer der 13 getesteten Proteinen positiv, bei 21 von 104 Zelllinien (20,2 %) war keine Färbung positiv (Tabelle 30). Eine Zelllinie (0,9 %) konnte nicht zur Analyse mittels RT-PCR verwendet werden.

**Tabelle 30:** Darstellung der Verteilung an Zelllinien welche als Zelllinien-Block von getesteten Antikörpern angefärbt werden kann.

|                                                            | Menge an Zelllinien | Prozentualer Anteil |
|------------------------------------------------------------|---------------------|---------------------|
| Zelllinie zeigt bei mehr als einem Antikörper eine Färbung | 47                  | 45,2%               |
| Zelllinie zeigt bei einem Antikörper eine Färbung          | 36                  | 34,6%               |
| Zelllinie zeigt bei keinem der Antikörper eine Färbung     | 21                  | 20,2%               |

In den Zelllinien, welche als funktionierend eingruppiert wurden, konnte für 8 der 13 (61,5%) getesteten Zielproteine eine grobe Übereinstimmung der orthogonalen Methoden und der Literaturergebnisse beobachtet werden. Bei 2 der 13 (15,4%) getesteten Zielproteinen widersprachen sich die Ergebnisse der von uns durchgeführten RT-PCR mit den Literaturergebnissen, bei weiteren 2 der 13 (15,4%) getesteten Zielproteinen zeigten sich sowohl Übereinstimmungen als auch widersprüchliche Ergebnisse zwischen den RT-PCR Ergebnissen und Daten aus der Literatur. Eins der 13 (7,7%) getesteten Zielproteine



widersprach in den Färbeergebnisse der IHC den Ergebnissen aus der RT-PCR und der Literatur. Bei einem weiteren der 13 (7,7%) analysierten Zielprotein zeigte sich in manchen Zelllinien eine Übereinstimmung zwischen den RT-PCR Ergebnissen und den IHC Ergebnissen, in anderen Zelllinien zeigten sich jedoch Widersprüche. Drei der 13 (23,1%) analysierten Zielproteine zeigten in einer oder keiner der gefärbten Zelllinien eine Färbung in der IHC, sodass eine Auswertung nicht möglich war (Tabelle 31).

**Tabelle 31:** Auswertung der Übereinstimmung der Expressionsstärke anhand von Daten erhalten aus RT-PCR , RNA-Expressionsdaten aus der Literatur und Immunhistochemie der analysierten Targets in verschiedenen Zelllinien. Eine gute Übereinstimmung der Ergebnisse wird durch „+“ symbolisiert, widersprüchliche Ergebnisse im Vergleich werden durch „-“, symbolisiert. Teilweise Übereinstimmung und Widerspruch wird durch „~“ symbolisiert.

|               | Übereinstimmung<br>RT-PCR Ergebnisse<br>mit Literatur | Übereinstimmung<br>RT-PCR Ergebnisse<br>mit IHC-Färbung |
|---------------|-------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------|
| CD56          | -                                                     | -                                                       |
| CD163         | -                                                     | n.a.                                                    |
| CDH16         | ~                                                     | n.a.                                                    |
| CEA           | +                                                     | +                                                       |
| DOG-1         | +                                                     | +                                                       |
| EpCAM         | +                                                     | +                                                       |
| GATA3         | +                                                     | +                                                       |
| HER2          | +                                                     | +                                                       |
| Inhibin alpha | +                                                     | +                                                       |
| KLK7          | +                                                     | n.a.                                                    |
| Napsin A      | +                                                     | +                                                       |
| P16           | ~                                                     | ~                                                       |
| Pgp9.5        | +                                                     | +                                                       |

Beispielhaft der Vergleich für die RT-PCR und IHC-Färbeergebnisse für das Zielprotein EpCAM, in Abbildung 59 sind hierbei exemplarisch Färbungen von Zelllinien mit hohen EpCAM mRNA-Levels (somit niedrigstem delta cT-Wert) dargestellt. Die Färbeintensität passt hierbei mit beobachtetem und erwarteten mRNA-Level für EpCAM zusammen (Abbildung 59, Tabelle 32).



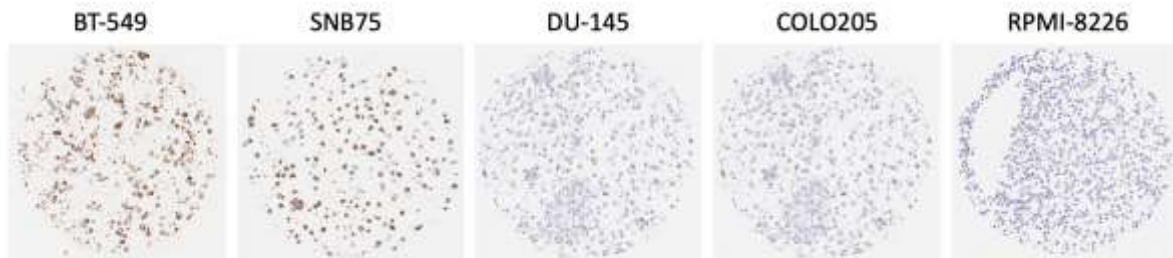
**Abbildung 59:** Färbeintensität verschiedener beispielhafter Zelllinien für den Antikörper EpCAM.

**Tabelle 32:** Darstellung der delta cT-Werte und der relativen RNA-Expression der in der RT-PCR analysierten Zelllinien für das Zielprotein EpCAM, Vergleichswerte aus der Literatur sowie die Färbeintensität der Zelllinien für den Antikörper gegen EpCAM.

Relative RNA-Expression wird als delta cT-Wert sowie prozentual relativ zur Zelllinie OVCAR-5 zur besseren Darstellung der Expression. Nicht analysierte Zelllinien werden durch „n.a.“ angezeigt. Die Färbeintensitäten reichen von stark „+++“, moderat „++“, schwach „+“ bis negativ „0“.

|            | RNA-Expression    |                         |                                                     | Protein-Expression  |
|------------|-------------------|-------------------------|-----------------------------------------------------|---------------------|
|            | RT-PCR Ergebnisse |                         | Literaturvergleich                                  |                     |
|            | $\Delta$ cT       | Relative RNA-Expression | normalisiertes RNA- Transkript pro Millionen (nTPM) | Färbeintensität IHC |
| H226       | -3,4              | 134%                    | 0,3                                                 | 0                   |
| HT-29      | -3,3              | 133%                    | 630,0                                               | +++                 |
| ZR-75      | -2,3              | 125%                    | 180,0                                               | +++                 |
| HCT-116    | -1,8              | 121%                    | 246,0                                               | +++                 |
| COLO205    | -1,2              | 118%                    | n.a.                                                | +++                 |
| OVCAR-4    | -0,9              | 116%                    | 421,0                                               | +++                 |
| HCC2998    | -0,2              | 112%                    | n.a.                                                | +++                 |
| SW707      | -0,1              | 111%                    | n.a.                                                | +++                 |
| COLO-206F  | 0,1               | 110%                    | 1109,0                                              | +++                 |
| HS-578T    | 0,5               | 108%                    | 0,6                                                 | 0                   |
| HEK        | 0,6               | 107%                    | 52,8                                                | n.a.                |
| T47-D      | 1,1               | 105%                    | 162,0                                               | +++                 |
| ASPC-1     | 1,2               | 105%                    | 1204,0                                              | +++                 |
| TK-10      | 1,5               | 103%                    | 181,0                                               | ++                  |
| SEM-1      | 1,6               | 102%                    | 0,6                                                 | ++                  |
| PC-3       | 1,7               | 102%                    | 141,0                                               | +                   |
| A431       | 1,8               | 102%                    | 357,0                                               | +++                 |
| MCF-7      | 1,8               | 101%                    | 335,0                                               | +++                 |
| T47-D      | 1,9               | 101%                    | 162,0                                               | +++                 |
| OVCAR-5    | 2,1               | 100%                    | 651,0                                               | +++                 |
| MDA-MB-468 | 2,6               | 98%                     | 339,0                                               | +++                 |
| DU-145     | 2,6               | 98%                     | 93,0                                                | ++                  |
| K-562      | 3,1               | 96%                     | 91,0                                                | +                   |
| SW 80      | 3,3               | 95%                     | n.a.                                                | ++                  |
| LS174T     | 3,4               | 94%                     | n.a.                                                | +++                 |
| HOP92      | 3,6               | 94%                     | 13,0                                                | +                   |
| LOX IMVI   | 4,0               | 92%                     | 0,4                                                 | 0                   |
| IEKVX      | 4,1               | 92%                     | 110,0                                               | ++                  |
| OVCAR-3    | 4,3               | 91%                     | 276,0                                               | +++                 |
| MALME 3M   | 4,4               | 91%                     | 1,1                                                 | 0                   |
| Rh-30      | 4,6               | 90%                     | 2,2                                                 | 0                   |
| TGR OV1    | 4,7               | 90%                     | n.a.                                                | ++                  |
| JEG3       | 4,7               | 90%                     | n.a.                                                | +++                 |
| H322M      | 4,8               | 89%                     | 725,0                                               | ++                  |
| Molt-4     | 4,9               | 89%                     | 0,5                                                 | 0                   |
| ACHN       | 5,1               | 88%                     | 58,0                                                | +                   |
| ADR-RES    | 5,1               | 88%                     | n.a.                                                | +                   |
| SCCL-MT1   | 5,1               | 88%                     | n.a.                                                | ++                  |
| MDA-MB-453 | 5,2               | 88%                     | 323,0                                               | +++                 |
| SW732      | 5,2               | 88%                     | n.a.                                                | +                   |
| SW1961     | 5,3               | 88%                     | n.a.                                                | +                   |
| H23        | 5,3               | 87%                     | 5,7                                                 | +                   |
| SW756      | 5,4               | 87%                     | n.a.                                                | ++                  |
| UO 31      | 5,4               | 87%                     | 27,0                                                | +                   |
| SW2224     | 5,5               | 87%                     | n.a.                                                | +                   |
| THP1       | 5,5               | 87%                     | 0,7                                                 | 0                   |
| SW-620     | 5,5               | 87%                     | 376,0                                               | ++                  |
| SF-268     | 5,6               | 86%                     | 5,7                                                 | 0                   |
| SW-451     | 5,6               | 86%                     | n.a.                                                | +++                 |
| OVCAR-8    | 5,9               | 85%                     | 16,0                                                | +                   |
| SW780      | 5,9               | 85%                     | 124,0                                               | ++                  |
| MDA-MB 435 | 6,2               | 85%                     | 0,1                                                 | n.a.                |
| SW608      | 6,3               | 84%                     | n.a.                                                | ++                  |
| SK-OV-3    | 6,5               | 84%                     | 56,0                                                | +                   |
| H460       | 7,0               | 82%                     | 1,9                                                 | +                   |
| LNCap      | 7,0               | 82%                     | 93,0                                                | ++                  |
| RPMI8226   | 7,3               | 81%                     | 112,0                                               | 0                   |
| SR         | 7,6               | 80%                     | 1,5                                                 | ++                  |
| A549       | 7,6               | 80%                     | 6,0                                                 | +                   |
| SF-539     | 7,6               | 80%                     | 0,9                                                 | 0                   |
| MDA-MB-231 | 7,8               | 80%                     | 18,0                                                | +                   |
| RD-ES      | 8,1               | 79%                     | 1,8                                                 | 0                   |
| SW579      | 8,2               | 78%                     | 2,3                                                 | 0                   |
| SW1503     | 8,2               | 78%                     | n.a.                                                | +                   |
| 786-0      | 8,3               | 78%                     | 6,0                                                 | ++                  |
| EL-4       | 8,5               | 78%                     | n.a.                                                | 0                   |
| SK-MEL-5   | 9,2               | 76%                     | 1,4                                                 | 0                   |
| SK-MEL-28  | 9,4               | 75%                     | 1,2                                                 | 0                   |
| SW 872     | 9,9               | 74%                     | n.a.                                                | 0                   |
| UACC-62    | 10,1              | 74%                     | 1,3                                                 | 0                   |
| H522       | 10,2              | 73%                     | 55,6                                                | 0                   |
| CCRF-CEM   | 10,3              | 73%                     | n.a.                                                | 0                   |
| MIA PaCa-2 | 10,4              | 73%                     | 0,5                                                 | n.a.                |
| SW1353     | 10,4              | 73%                     | 2,9                                                 | 0                   |
| HDLM-3     | 11,2              | 71%                     | n.a.                                                | 0                   |
| SW13       | 11,2              | 71%                     | n.a.                                                | 0                   |
| Raji       | 11,5              | 70%                     | 0,2                                                 | 0                   |
| SIHA       | 11,5              | 70%                     | 4,6                                                 | 0                   |
| RXF393     | 11,8              | 70%                     | n.a.                                                | +                   |
| SW1949     | 11,9              | 69%                     | n.a.                                                | 0                   |
| UACC-257   | 12,1              | 69%                     | 0,6                                                 | 0                   |
| T98G       | 12,6              | 68%                     | 0,9                                                 | 0                   |
| RPMI-6410  | 12,7              | 68%                     | n.a.                                                | 0                   |
| M14        | 14,2              | 65%                     | n.a.                                                | 0                   |
| SN12C      | 14,5              | 64%                     | n.a.                                                | 0                   |
| SNB-19     | 14,8              | 64%                     | n.a.                                                | 0                   |

Als Beispiel für ein Zielprotein, bei dem die Ergebnisse aus RT-PCR, der Literatur und der Immunhistochemie nicht zusammenpassen, wird hier p16 (Gen *CDKN2A*) verwendet. Sowohl die Ergebnisse der RT-PCR und der Literatur widersprechen sich hier teilweise stark. Auch die Färbeergebnisse der Zelllinien für das Zielprotein entsprechen häufig nicht den erwarteten Ergebnissen abgeleitet von den RT-PCR Ergebnissen (Abbildung 60, Tabelle 33).



**Abbildung 60:** Färbeintensität verschiedener beispielhafter Zelllinien für den Antikörper P16.

**Tabelle 33:** Darstellung der delta cT-Werte und der relativen RNA-Expression der in der RT-PCR analysierten Zelllinien für das Zielprotein p16 (Gen *CDKN2A*), Vergleichswerte aus der Literatur sowie die Färbeintensität der Zelllinien für den Antikörper gegen EpCAM.

Relative RNA-Expression wird als delta cT-Wert sowie prozentual relativ zur Zelllinie OVCAR-5 zur besseren Darstellung der Expression. Nicht analysierte Zelllinien werden durch „n.a.“ angezeigt. Die Färbeintensitäten reichen von stark „+++“, moderat „++“, schwach „+“ bis negativ „0“.

|            | RNA-Expression    |                         |                                                    | Protein-Expression  |
|------------|-------------------|-------------------------|----------------------------------------------------|---------------------|
|            | RT-PCR Ergebnisse |                         | Literaturvergleich                                 | Färbeintensität IHC |
|            | $\Delta$ cT       | Relative RNA-Expression | normalisiertes RNA-Transkript pro Millionen (nTPM) |                     |
| ADR-RES    | -10,4             | 145%                    | n.a.                                               | +++                 |
| BT-549     | -10,1             | 141%                    | 581,0                                              | +++                 |
| OVCAR-8    | -10,0             | 140%                    | 325,0                                              | +++                 |
| HEK        | -9,8              | 137%                    | 366,4                                              | n.a.                |
| COLO205    | -8,8              | 125%                    | n.a.                                               | 0                   |
| H522       | -8,8              | 125%                    | 398,0                                              | ++                  |
| SIHA       | -7,5              | 111%                    | 327,0                                              | +++                 |
| LNCap      | -7,2              | 109%                    | 28,3                                               | 0                   |
| HCC2998    | -7,0              | 108%                    | n.a.                                               | ++                  |
| SW732      | -7,0              | 107%                    | n.a.                                               | 0                   |
| M14        | -6,8              | 106%                    | n.a.                                               | 0                   |
| THP1       | -6,7              | 105%                    | 0,4                                                | n.a.                |
| T47-D      | -6,7              | 105%                    | 45,5                                               | 0                   |
| IEKVX      | -6,1              | 101%                    | 112,8                                              | 0                   |
| SW 80      | -6,0              | 100%                    | n.a.                                               | 0                   |
| HELA       | -6,0              | 100%                    | 869,9                                              | 0                   |
| SN12C      | -5,8              | 99%                     | n.a.                                               | +                   |
| A431       | -5,3              | 95%                     | 7,2                                                | 0                   |
| DU-145     | -5,2              | 94%                     | 376,0                                              | +                   |
| SW 1045    | -5,2              | 94%                     | n.a.                                               | 0                   |
| HCT-116    | -4,9              | 93%                     | 61,0                                               | 0                   |
| OVCAR-4    | -4,9              | 93%                     | 239,0                                              | +++                 |
| SW1949     | -4,5              | 90%                     | n.a.                                               | 0                   |
| HT-29      | -3,8              | 86%                     | 232,2                                              | 0                   |
| SK-MEL-5   | -3,6              | 85%                     | 0,4                                                | ++                  |
| PC-3       | -3,4              | 84%                     | 125,3                                              | 0                   |
| TGR OV1    | -3,1              | 83%                     | n.a.                                               | +                   |
| A549       | -3,0              | 82%                     | 0,1                                                | 0                   |
| SF-539     | -2,7              | 81%                     | 386,0                                              | +++                 |
| SEM-1      | -2,7              | 81%                     | 359,0                                              | +                   |
| LOX IMVI   | -2,3              | 79%                     | 0,1                                                | 0                   |
| RD-ES      | -2,0              | 77%                     | 81,0                                               | ++                  |
| MDA-MB-453 | -2,0              | 77%                     | 28,0                                               | ++                  |
| ASPC-1     | -1,9              | 77%                     | 378,1                                              | n.a.                |
| COLO-206F  | -1,7              | 76%                     | 185,1                                              | 0                   |
| SK-MEL-2   | -1,5              | 76%                     | 67,6                                               | n.a.                |
| 3T3        | -1,4              | 75%                     | n.a.                                               | n.a.                |
| K-562      | -1,0              | 73%                     | 0,6                                                | 0                   |
| HDLM-3     | -0,9              | 73%                     | n.a.                                               | 0                   |
| MDA-MB 435 | -0,8              | 73%                     | 251,9                                              | 0                   |
| LS174T     | -0,5              | 72%                     | n.a.                                               | 0                   |
| SK-OV-3    | -0,3              | 71%                     | 0,1                                                | 0                   |
| Daudi      | -0,2              | 70%                     | 77,6                                               | 0                   |
| Raji       | 0,1               | 69%                     | 206,4                                              | 0                   |
| HEP-G2     | 0,3               | 69%                     | 16,8                                               | 0                   |
| MDA-MB-231 | 0,5               | 68%                     | 0,9                                                | 0                   |
| Rh-30      | 0,6               | 68%                     | 196,0                                              | ++                  |
| UO 31      | 0,7               | 68%                     | 4,8                                                | 0                   |
| H23        | 0,8               | 67%                     | 49,0                                               | 0                   |
| SNB75      | 0,8               | 67%                     | 261,0                                              | +++                 |
| SW707      | 0,8               | 67%                     | n.a.                                               | 0                   |
| H322M      | 1,0               | 67%                     | 0,4                                                | 0                   |
| HL-60(TB)  | 1,9               | 64%                     | 41,2                                               | 0                   |
| SW780      | 2,0               | 64%                     | 1,1                                                | 0                   |
| MALME 3M   | 2,9               | 61%                     | 0,0                                                | 0                   |
| MIA PaCa-2 | 3,1               | 61%                     | 0,8                                                | 0                   |
| SR         | 3,1               | 60%                     | 18,2                                               | 0                   |
| UACC-62    | 4,1               | 58%                     | 1,7                                                | n.a.                |
| SNB-19     | 4,7               | 56%                     | n.a.                                               | 0                   |
| 786-0      | 4,9               | 56%                     | 0,2                                                | 0                   |
| SCCL-MT1   | 5,1               | 56%                     | n.a.                                               | 0                   |
| SW579      | 5,3               | 55%                     | 0,5                                                | 0                   |
| OVCAR-5    | 6,1               | 54%                     | 0,7                                                | 0                   |
| U251       | 6,5               | 53%                     | 0,3                                                | 0                   |
| H226       | 6,6               | 53%                     | 3,3                                                | 0                   |
| H460       | 7,2               | 51%                     | 0,1                                                | 0                   |
| SF-295     | 7,3               | 51%                     | 0,2                                                | 0                   |
| SW2224     | 7,3               | 51%                     | n.a.                                               | 0                   |
| SW1961     | 7,5               | 51%                     | n.a.                                               | 0                   |
| RPMI8226   | 7,7               | 50%                     | 207,1                                              | 0                   |
| TK-10      | 7,8               | 50%                     | 276,4                                              | 0                   |
| SW-451     | 8,3               | 49%                     | n.a.                                               | n.a.                |
| SF-268     | 9,0               | 48%                     | 1,1                                                | 0                   |
| CAKI-1     | 9,1               | 48%                     | 0,3                                                | 0                   |
| ACHN       | 11,1              | 45%                     | 3,5                                                | 0                   |
| HOP62      | 11,2              | 45%                     | 5,5                                                | 0                   |
| HOP92      | 12,5              | 43%                     | 72,1                                               | 0                   |

## 4. Diskussion

Ziel dieser Dissertation war die Untersuchung von verschiedenen Einflussfaktoren auf die Generierung und Leistungsanalyse von monoklonalen Antikörpern, sowie die Übertragbarkeit von Ergebnissen aus der Immunhistochemie. Untersuchte Parameter waren hierbei die Auswahl der Peptidsequenz des Immunisierungspeptids, die Fusionsmethode, die Pufferzusammensetzungen in der Immunhistochemie und die Haltbarkeit von Antikörpern. Zudem wurde die Übertragbarkeit der Antikörper-Validierung auf den Western Blot und die RT-PCR betrachtet, was im Folgenden eingeordnet werden soll.

### 4.1 Antikörper-Herstellung

#### 4.1.1 Peptidauswahl für die Antikörper-Herstellung

Die Spezifität eines Antikörpers ist einer der zentralen Parameter für die Qualität einer immunhistologischen Färbung. Die Spezifität wird durch die Anbindung des Antikörpers an ein bestimmtes Epitop in Zielprotein erzeugt, welches durch den Fc-Anteil des Antikörpers erkannt wird. Bei der Erstellung monoklonaler Antikörper wird zur Immunisierung der Mäuse eine Peptidsequenz verwendet, welche einen Ausschnitt aus der Sequenz des Zielproteins darstellt. Von der Verwendung des gesamten Zielproteins wird, aufgrund von Kostengründen und Problemen bei der Immunisierung des Proteins in einer Form wie es im Gewebe vorliegt (Faltung, post-translationale Modifikationen, Degeneration durch Co-Administration mit Adjuvant), abgesehen (Parray et al., 2020).

Die Auswahl der Sequenz erfolgt unter anderem durch einen Peptidscan. In der vorliegenden Dissertation wurde hierfür das HUSAR-Programm (Heidelberg Unix Sequence Analysis Resources) verwendet. Es analysiert Variablen wie Oberflächenpräsenz der Aminosäuren, Glykosylierungsstellen und Hydrophilität der Aminosäuren. Eine Auswertung der verschiedenen Parameter, gemessen an ihrer Aussagekraft zur Vorhersage einer erfolgreichen Peptidsequenz, zeigte folgendes: eine hohe durchschnittliche Oberflächenpräsenz, eine hohe durchschnittliche Flexibilität, eine Kombination aus einer hohen Hydrophilität und eines hohen Antigenizitätsindex sowie die Abwesenheit von Glykosylierungsstellen scheinen Indikatoren für eine erfolgreiche Peptidsequenz zu sein. Der Kernbereich-Prädiktor und Sekundärstruktur-Prädiktoren scheinen hingegen kein Indikator für den Erfolg der Peptidsequenz zu sein. Diese Beobachtungen decken sich mit der Literatur. So ist bekannt, dass ein Epitop, welches gut durch Antikörper erkannt werden kann, auf der Oberfläche des

Proteins liegen sollte, um so auch im nativen Zustand des Proteins durch den Antikörper detektierbar zu sein (Liang et al., 2009). Eine hohe Flexibilität der Aminosäuren ist auch relevant, da so verschiedene Konformationen des Peptids besser erreicht werden können und das native Protein genauer repräsentiert wird (Westhof et al., 1984). Wie durch Subramanian and Chinnappan, 2013 beschrieben, scheint die Hydrophilität der Aminosäuren der Peptidsequenz einen Einfluss auf den Transport der Peptide mittels des Proteins TAP (transporter associated with antigen processing) in das raue endoplasmatische Retikulum zu haben und somit die Präsentation des Peptids zum MHC II- Komplex zu beeinflussen. Zudem führt eine hohe Hydrophilität zu einer wahrscheinlicheren Sekundärstruktur als alpha-Helix, bei welcher die Peptidsequenz nach der Faltung linearer vorliegen bleibt im Gegensatz zu den beta-Faltblatt-Strukturen mit ihren schnellen Richtungswechseln. Hydrophobe Aminosäuren sind im Gegensatz dazu aufgrund hydrophober Kräfte nach der Proteinfaltung wahrscheinlicher im Inneren des Proteins zu finden (Eisenberg et al., 1984; Kyte and Doolittle, 1982; Simm et al., 2016). Zusätzlich scheint eine hohe Hydrophobität des Antikörpers dazu führen, dass Aggregate durch den Antikörper entstehen (Chong and Ham, 2014). Die Antigenizität beschreibt die relative Häufigkeit bestimmter Aminosäuren im Epitop, auf der Proteinoberfläche und im Protein. Es kann somit anhand der Aminosäurenkomposition der Peptidsequenz ein relativer Wert ermittelt werden, der die Antigenizität aufgrund der wahrscheinlichen Lage der Aminosäuren im Protein beschreibt. Es wurde beobachtet, dass die Antigenizität der Aminosäuren Cystein, Valin und Leucin besonders hoch ist, welches alle hydrophobe Aminosäuren sind und, sofern sie auf der Proteinoberfläche vorhanden sind, sehr häufig eine wichtiger Faktor bei der Antigenizität des Bereichs sind (Kolaskar and Tongaonkar, 1990). Man kann also sagen, dass die Hydrophobität bzw. Hydrophilität der Aminosäuren in der Peptidsequenz einen starken Einfluss auf die Antigenizität der Peptidsequenz hat (Kyte and Doolittle, 1982). Die Abwesenheit von Glykoslierungsstellen ist insofern relevant und vorteilhaft, da Glykosylierungen von Aminosäuren des Immunisierungspeptids die Prozessierung und den Transport des Peptids, sowie die Präsentation auf dem MHC-II Molekül negativ beeinflussen (Hiltbold et al., 1998; Li et al., 2008). Eine Glykosylierung des Zielproteins bedeutet jedoch auch, dass die Glykosylierungsstelle für Glykosylierungsenzyme zugänglich ist und somit entweder auf der Oberfläche oder trotz Faltung ins Innere für Enzyme (und somit gegebenenfalls auch Antikörper) zugänglich ist (Thaysen-Andersen and Packer, 2012). Der Kernbereich-Prädiktor beschreibt den Bereich des Peptides, welcher bei der Anbindung auf

das MHC II Molekül innerhalb der Bindungsgrube liegt. Dieser Bereich umfasst etwa neun Aminosäuren, der C- und N-terminale Bereich des Peptides kann hierbei über die Bindungsgrube hinausschauen und wirkt sich nicht auf die Interaktion zwischen Antigen und MHC II Molekül aus (Stern and Wiley, 1994). Zur Anbindung in die Bindungsgrube wird ein spezifisches Bindungsmotiv verwendet, welches vorhergesagt werden kann. Alle weiteren Aminosäuren sind Peptid-spezifisch und stellen so das individuelle Epitop dar, welches den B-Zellen über das MHC II Molekül präsentiert wird. Eine hohe Übereinstimmung der Peptidsequenz mit dem spezifischen Bindungsmotiv als Kernbereich-Prädiktor für die MHC II Bindung erhöht den Erfolg der Präsentation des Peptides auf dem MHC II Molekül und somit die Erstellung von Antikörpern gegen das Peptid (Tadros et al., 2023).

Es gibt viele weitere Programme welche lineare B-Zell Epitope vorhersagen wie PREDITOP (Pellequer et al., 1993), PEOPLE (Alix, 1999), BEPITOPE (Odorico and Pellequer, 2003) und BcePred (Saha and Raghava, 2004), welche alle ähnliche Variablen in unterschiedlicher Gewichtung mit einbeziehen. Ein direkter Vergleich der verschiedenen Programme bei der Auswahl der vielversprechendsten Peptidsequenz wäre hier zielführend, ist aufgrund der Einstellung der Nutzung des HUSAR-Programms jedoch nicht möglich. In Zukunft muss daher ein neues Programm zur Vorhersage der Peptidsequenz ausgewählt werden. Wie hier gezeigt, sind aufgrund ähnlicher verwendeter Variablen zur Vorhersage der Epitope keine großen Änderungen in den Ergebnissen zu erwarten und die gemachten Beobachtungen zur Wichtigkeit der verschiedenen Parameter in der Vorhersagekraft sollte sich bestätigen. In der Literatur wurde zuvor schon beschrieben, dass die Auswahl der Epitope mittels eines der Programme die Qualität der gewählten Epitope nicht weiter verbessert als eine zufällige Auswahl der Peptidbereiche (Blythe and Flower, 2005).

Ein weiterer bekannter Faktor ist die Lage der gewählten Peptidsequenz im Protein. Hierbei wird davon ausgegangen, dass N- und besonders C-terminale Sequenzen im Protein als Epitope besonders gut zur Generierung von Antikörpern geeignet sind, da eine höhere Konservierung der Proteine in diesem Bereich vorliegt als in anderen Bereichen (Cecil et al., 2014; McCallum et al., 2021). In der vorliegenden Arbeit zeigt sich, dass die Lage der Peptidsequenz keinen zwingenden Einfluss auf den Erfolg bei der Peptidsequenz in der Generierung von Antikörpern für die Hybridoma-Methode hatte und sowohl aus der Mitte der Sequenz wie auch aus dem N-terminalen Bereich Sequenzen zu guten Ergebnissen führten.

Jedoch erbrachte die Peptidsequenz aus der Mitte der Proteinsequenz mehr erfolgreiche Hybridoma-Klone als die Peptidsequenz, welche am N-terminalen Ende der Proteinsequenz lag. Wie durch Bakhshesh et al. gezeigt, ist das N-terminale Ende der Proteinsequenz besonders häufig das Epitop von Antikörpern, da dieser Bereich auch nach der Proteinfaltung auf der Oberfläche des Proteins, somit leicht zugänglich ist und der Antikörper gut anbinden kann (Bakhshesh et al., 2018). Auch ist das N-terminale Ende der Proteinsequenz häufig durch post-translationale Modifikationen einmalig und eignet sich so besonders für spezifische monoklonale Antikörper (Chen and Kashina, 2021). Das in der vorliegenden Arbeit dies nicht bestätigt wurde, kann an einer ungünstigen Auswahl der spezifischen Peptidsequenz oder am untersuchten Zielprotein selbst liegen, welches aufgrund von Faltung das N-terminale Ende nicht für Antikörper zugänglich hat.

Die verwendeten Peptidsequenzen wurden anhand der Ergebnisse des Peptidscans, der Lage im Protein sowie im Vergleich zu anderen, schon bestehenden kommerziellen Antikörpern ausgewählt. Von fünf Zielproteinen, welche auf diese Weise mit je den fünf vielversprechendsten Peptiden immunisiert wurden, zeigte sich bei vier dieser Zielproteine eine Immunantwort für alle immunisierten Peptide. Allerdings war die Immunantwort meist für ein bis zwei Peptide am stärksten. Das zeigt, dass die Vorhersage der bestmöglichen Peptidsequenz keine Garantie für eine effiziente Antikörper-Generierung ist. Ursache hierfür könnte die beschriebene Kombination an Entscheidungsgrundlagen sein. So werden zum Beispiel durch eine Kombination der Ergebnisse aus dem Peptidscan und dem Versuch terminale Bereiche der Proteinsequenz zu verwenden, unterschiedliche Ansätze in der Zugänglichkeit zum Zielprotein betrachtet, welche in Kombination nicht zielführend sind. Wie durch Sanchez-Trincado et al. und Greenbaum et al. beschrieben, zeigt auch eine Kombination von verschiedenen Algorithmen zur Vorhersage von linearen Epitopen keine starke Verbesserung im Vergleich zur Verwendung von nur einem Algorithmus (Greenbaum et al., 2007; Sanchez-Trincado et al., 2017). Ein anderes Paper postuliert sogar, dass die Epitop-Vorhersagekraft eines einzelnen Algorithmus basierend auf den biochemischen und strukturellen Eigenschaften der Proteinsequenz nur minimal besser ist als der Zufall (Blythe and Flower, 2005). Es ist anzumerken, dass bei allen betrachteten Methoden nur strukturelle Epitope analysiert werden, diese beschreiben alle Aminosäuren welche bei einer Anbindung des Antikörpers mit dem Antikörper in Kontakt kommen. Funktionelle Epitope hingegen

beschreiben eine kleinere Menge an Aminosäuren, welche essenzielle für die Bindung des Antikörpers sind und nicht zwingend die gleichen Aminosäuren umfasst wie für das strukturelle Epitop. Eine Vorhersage von funktionellen Epitopen basiert aber meist auf funktionellen Assays (Austausch verschiedener Aminosäuren in der Proteinsequenz und anschließender Untersuchung der Bindungsenergie) oder Analyse von Protein-Antikörper-Komplexen was eine Kenntnis von möglichen Antikörpern beinhaltet und somit bei der Generierung von neuen Antikörpern nicht hilfreich ist. Hierbei wird deutlich, dass eine Verbesserung der Assays zur Vorhersage von B-Zell Epitopen dringend notwendig ist (Dang et al., 2023; Ponomarenko and Bourne, 2007).

Da die Generierung der Antikörper-produzierenden B-Lymphozyten in der Maus stattfindet, ist es höchst relevant, dass die verwendeten Peptidsequenzen möglichst einmalig für das menschliche Zielprotein sind, da diese sonst nicht als „fremd“ vom murinen Immunsystem erkannt werden und keine Antikörper gegen die Sequenzen generiert würden bzw. autoreaktive Antikörper gegen das Maus-Proteom erstellt würden (Rawal et al., 2021). Es ist daher zielführend, bei der Auswahl der Peptidsequenzen solche Sequenzen auszuwählen, welche die geringstmögliche Ähnlichkeit mit der murinen Proteinsequenz haben. Dies wurde für alle potenziellen Peptidsequenzen für das Zielprotein analysiert und nur solche für die spätere Immunisierung der Mäuse ausgewählt, welche eine sehr geringe Ähnlichkeit zu murinen Proteinen hatte.

Es konnte gezeigt werden, dass eine geringe Ähnlichkeit der Peptidsequenz zur murinen Sequenz sowohl für den Erfolg der Immunisierung bzw. Generierung von Hybridomaklonen als auch für eine hohe Antikörper-Produktion vorteilhaft sind. Dies ist insofern schwierig, da bei den Protein-codierenden Genen zwischen Mensch und Maus eine Homologie von etwa 80% besteht, und eine Homologie des gesamten Genoms von etwa 40% vorliegt (Mouse Genome Sequencing Consortium, 2002).

Die Höhe des ELISA-Werts vier Wochen nach der Fusion ist ausschlaggebend für die Entscheidung, ob der Hybridomaklon ein Antikörper-produzierender Klon ist und wie hoch die Antikörper-Produktion in Relation zur Zellmenge ist. Es werden gezielt solche Klone weiterverwendet, welche trotz geringer Zellzahl einen hohen Antikörper-Titer erstellen. Die Hoffnung ist hierbei, dass gerade solche Hybridomaklone die Antikörper-Produktion nicht so schnell einstellen im Gegensatz zu Klonen mit wesentlich geringeren Produktionsmengen



(Kromenaker and Srienc, 1994). Zudem ist durch ELISA-Arrays erkennbar, gegen welches Peptid die produzierten Antikörper reaktiv sind. Im hier gemachten Vergleich, ob der ELISA-Wert mit der Qualität der immunhistologischen Färbung korreliert, kann diese Hypothese nicht bestätigt werden. Ein Antikörper, der einen hohen ELISA-Wert erzeugt, zeigt zum einen eine hohe Affinität für das im ELISA verwendete Peptid. Dieses liegt linearisiert vor oder kann, trotz der geringen Länge des Peptides, sich falten. Ein Antikörper gegen dieses lineare Peptid erkennt somit nicht zwingend der Quartärstruktur des Zielproteins, sodass auch eine Anbindung im Gewebe bei der IHC nicht stattfinden kann. Durch die Verwendung von linearen Peptidsequenzen werden nur potenzielle strukturelle Epitope zur Immunisierung verwendet, funktionelle Epitope mit wenigen, essenziellen und weiter auseinander liegenden Aminosäuren werden so nicht getestet und potenzielle Antikörper werden nicht generiert (Smith-Gill, 1994). Zudem gibt die Höhe des ELISA-Werts über die Menge an Antikörper im Zellkulturüberstand der erstellten Hybridomaklone Auskunft, welches verwendete Immunisierungspeptid die meisten reaktiven Antikörper gegenüber dem Zielpeptid erstellt hat und welcher dieser Klone eine hohe Antikörper-Produktion haben. Der ELISA-Wert gibt jedoch keine Aussage über die Färbeeigenschaften der Klone, ähnliches wurde auch von Sakaguchi et al. beschrieben (Sakaguchi et al., 2021). Wie durch Lad et al. beschrieben, werden durch die verwendete Sandwich-ELISA-Methode hingegen nur solche Antikörper detektiert, welche mit hoher Affinität oder in einer hohen Konzentration im Zellkulturüberstand vorhanden sind (Lad et al., 2015). Dies kann dazu führen, dass „gute“ Klone mit einem geringeren Titer und hoher Affinität gegen „schlechte“ Klone mit höherem Titer aber geringerer Affinität verlieren, da die guten Klone aufgrund der geringeren Konzentration ein schwächeres ELISA-Signal ergeben. Zudem stellt das Ergebnis des ELISA-Tests nur eine Momentaufnahme dar. Ein lang bekanntes Problem der Hybridoma-Technologie ist das potenzielle Einstellen der Antikörper-Produktion durch die Klone nach einer gewissen Zeit (Kromenaker and Srienc, 1994; Mitra and Tomar, 2021; Pogson et al., 2016).

Die Auswahl der Peptidsequenzen für die Immunisierung der Mäuse ist elementar für den späteren Erfolg der monoklonalen Antikörper aus den erstellten Hybridoma-Klonen. Gerade bei der Auswahl der Sequenz sollten einige Variablen wie die Antigenizität beachtet werden, um die best-mögliche Peptidsequenz auswählen zu können. Es ist dabei egal wo der exakte Bereich innerhalb der Proteinsequenz liegt, jedoch sollte die Sequenz möglichst einmalig im humanen Proteom sowie eine geringe Übereinstimmung mit dem Proteom des Wirtstieres (hier: der Maus) haben. Die Detektion einer starken Antikörper-Produktion des Hybridoma-Klons bzw. affiner Antikörper mittels des ELISA-Assays ist nicht aussagekräftig über den Erfolg des Antikörpers, da ein Rückschluss auf die Färbequalität nicht möglich ist.

#### 4.1.2 Einfluss des Fusionsverfahrens

Die Hybridoma-Technologie, als Fusionierung von murinen B-Lymphozyten aus immunisierten Mäusen mit immortalen humanen Zelllinien, wurde 1975 durch G. Köhler erstmal verwendet und ist lange Zeit der Goldstandard in der Erstellung von monoklonalen Antikörpern gewesen (Köhler and Milstein, 1975). Wie zuvor beschrieben, ist diese Technologie ineffizient und langwierig (4.1 Antikörper Herstellung). Daher wurden verschiedene Methoden und Optimierungen erforscht, um monoklonale Antikörper Kosten- und Zeit-sparender zu erstellen.

Als eine kostengünstige Optimierung des Hybridoma-Verfahrens kann vor der Fusion der murinen B-Lymphozyten mit den humanen Myelomalzellen ein B-Zell Panning stattfinden, bei welchem die murinen B-Lymphozyten zunächst auf eine Platte gegeben werden, auf welche zuvor das verwendete Immunisierungspeptid angebunden wurde. Es binden nur solche B-Lymphozyten an die Immunisierungspeptide und werden später weiter verwendet, welche die entsprechenden Antikörper gegen diese Peptide auf ihrer Zelloberfläche exprimieren (Adam, 2016; Lightwood et al., 2006; Wysocki and Sato, 1978).

Die Methode des B-Zell Pannings beschreibt somit eine Selektion des Pools an B-Lymphozyten, welcher die Menge an eingesetzten B-Lymphozyten zwar vermindert, aber die Qualität der noch vorhandenen B-Lymphozyten und somit auch derer produzierter Antikörper erhöht. Es wäre daher zu erwarten, dass durch das B-Zell Panning eine erhöhte Menge an positiven Hybridomaklonen im Vergleich zur Standard-Fusionierungsmethode entsteht. Es zeigt sich jedoch, dass die Menge an ELISA-positiven (und somit Antikörper-produzierenden) Hybridomaklonen bei solchen Hybridomaklonen mit vorherigem B-Zell Panning wesentlich

geringer ist; der ELISA-Wert der Hybridomaklone, welche aus dem B-Zell Panning entstanden sind, ist hingegen mindestens gleich hoch oder sogar höher. Es ist anzumerken, dass in den betrachteten Versuchen keiner der analysierten Hybridomaklone, sowohl mit vorherigem B-Zell Panning als auch ohne Panning, final weitergeführt wurde und somit keine zufriedenstellenden Hybridomaklon generiert werden konnten. Eine verringerte Anzahl an ELISA-positiven Klonen kann durch die verringerte Anzahl an B-Zellen in der Fusion erklärt werden, jedoch sollte aufgrund des Pannings der Anteil an ELISA-positiven Klonen innerhalb der Gesamtmenge an Klonen gestiegen sein. Eine Erklärung für diese Diskrepanz kann die Ineffizienz der PEG-induzierten Fusionierung sein. Nur ein sehr geringer Bruchteil der B-Zellen, welche in die Fusion eingehen, werden final auch zu Hybridomaklonen fusioniert. Die Literatur beschreibt die Effizienz für PEG-induzierte Fusion mit weniger als 1% (Yu et al., 2008). Die Hybridomaklone aus dem Panning zeigten ähnlich hohe ELISA-Werte, wie solche Klone, welche ohne Panning erstellt wurden. Dies bestätigt, dass der Antikörpertiter im Medium bzw. Affinität der von den Hybridomaklonen erstellten Antikörper vergleichbar ist zu Antikörpern von Klonen ohne Panning.

Jedoch konnten mit dem B-Zell Panning keine vergleichbaren Ergebnisse wie in der Literatur erzielt werden: Vergleicht man die beobachteten Zahlen aus den Versuchen mit den Ergebnissen anderer, so wird bei Smeland et al. von einem Anteil von etwa 70 % an B-Lymphozyten in der Gesamtpopulation sowie 21 % T-Zellen nach einer Wiederholung des Pannings gesprochen, was sich nicht mit den Beobachtungen von 1,5% an B-Lymphozyten und 1,7% an T-Zellen in dieser Arbeit deckt (Smeland et al., 1985). Ein B-Zell Panning, wie es von Adam et al. und Smeland et al. beschrieben wurde, führte zu keiner reproduzierbaren Effizienz in der Anreicherung von B- und Reduktion von T-Zellen (Adam, 2016; Smeland et al., 1985). Auch die Qualität der generierten Hybridomaklone, gemessen an sezerniertem Antikörper mittels ELISA-Wert und positiven Färbereigenschaften, konnte durch das Panning nicht gesteigert werden. Ursache hierfür könnte der unterschiedliche Aufbau des Versuchs in Bezug auf das angebundene Peptid sein, da bei Adam et al. und Smeland et al. nur recht allgemein von Antigen bzw. Teile des Antigens gesprochen wird (Adam, 2016; Smeland et al., 1985). Die Wahl der Peptidsequenz ist höchst relevant (siehe 4.1.1 Peptid Auswahl für die Antikörper-Herstellung). Dies kann auch die bei uns beobachtete erhöhte unspezifische Bindung und Reduktion von Zellen aus der Gesamtzellpopulation erklären, da nicht nur der gewünschte Zelltyp (B-Lymphozyten) bzw. Antikörper an die angebundenen Peptidsequenzen gebunden

hat. Das Panning und der Zellverlust ist somit rein zufällig und selektiert nicht für bestimmte Zellen. Eine Anwendung findet das B-Zell Panning, so wie es hier beschrieben wurde, in der neueren Literatur kaum noch. Die Weiterentwicklung des B-Zell-Pannings mittels magnetischer Kugeln, welche mit dem Antigen bestückt sind, und anschließender FACS-Sortierung der B-Zellen, haben jedoch auch heute noch Anwendung (Sun et al., 2017; Traggiai et al., 2004). Eine Optimierung der Hybridoma-Technik durch die Methode, wie sie hier verwendet wurde, kann jedoch nicht empfohlen werden.

Eine neuere Methode zur Optimierung des Klonierungsprozesses ist die Kultivierung der Hybridomazellen in semi-solid Medium. Hierbei wird durch die Kultivierung der Zellen in Methylzellulose-haltigem, zähflüssigem Medium eine Durchmischung der Hybridomaklone verhindert, da sie ausgehend von einer vereinzelter Zelle zu monoklonalen Zellkolonien heranwachsen. Es liegt ab Beginn eine Klonalität vor und ein Überwachsen langsam wachsender Klone kann so verhindert werden (Davis et al., 1982). Es zeigt sich hierbei, dass mit dieser Methode der Prozess der Klonierung signifikant beschleunigt werden kann, da mehrere Wochen des Subklonierens zum Erreichen der Monoklonalität entfallen. Ein Nachteil dieser Methode sind die hohen Materialkosten. Im Vergleich zum B-Zell Panning und dem ursprünglichen Fusionierungsprotokoll konnte gezeigt werden, dass durch die Kultivierung der Hybridomazellen in semi-solid Medium final mehr Klone mit guter Antikörper-Produktion (hohe ELISA-Werte) sowie guten Färbereigenschaften erzielt werden konnten, als mit den anderen untersuchten Methoden. Jedoch zeigten sich nur bei den Klonen, welche durch die semi-solid Methode erstellt wurden, ein Verlust der Antikörper-Produktion über die Zeit hinweg. Es ist jedoch anzumerken, dass wesentlich mehr Klone mit dieser Methode erstellt wurden, sodass bei einer gleichen Wahrscheinlichkeit zum Produktionsverlust in den Klonen bei den anderen zwei Methoden aufgrund der geringen Klonanzahl der Verlust der Antikörperproduktion nicht unbedingt detektierbar sein muss.

Generell entsteht durch die Fusionierung zunächst ein tetraploider Hybridomaklon, welcher genetisch instabil ist und in manchen Fällen aufgrund der mehreren vorhandenen Allele für die leichten und schweren Ketten des Antikörpers mehrere unterschiedliche Antikörper produziert. Erst nach einer gewissen Zeit wird der tetraploide Chromosomensatz zu einem haploiden Chromosomensatz gewandelt. Durch diesen Chromosomenverlust, sowie durch Rekombinationsevents zwischen den Allelen kann es zum Verlust der Fähigkeit zur Antikörper

Produktion kommen, was die Instabilität der Klone erklärt (Andreeff et al., 1985; Bartal and Hirshaut, 1987; Bradbury et al., 2018; Hanack et al., 2019). Schon bei der Erstbeschreibung der semi-solid Methode wurde eine erhöhte Stabilität der Hybridomaklone beobachtet, der Verlust der Fähigkeit Antikörper zu produzieren wurde auch über 12 Monate hinweg nur bei 10 % der analysierten Klone festgestellt (Davis et al., 1982). Dies ist nicht auf fehlende Tetraploidie oder Abwesenheit von Rekombinationsvorgänge, sondern potenziell eher auf Konditionen im Semi-solid Medium zurückzuführen, welche die genomische Stabilität der Klone fördern. Zudem ist durch den veränderten Versuchsablauf mit weniger Zelltransfers sowie die verbesserten Wachstumsbedingungen auch für schwache Klone eine erhöhte Überlebensmöglichkeit auch von schwachen Klonen vorhanden. Wie durch Kromenaker et al. beschrieben, wachsen manche Klone mit hoher Antikörperproduktion zunächst sehr langsam und würden unter normalen Kultivierungsbedingungen durch schneller wachsende Klone überwachsen werden (Kromenaker and Srienc, 1994).

Durch Weiterentwicklungen der Methode kann dem Zellkulturmedium ein Fluorophor-gekoppelter Antikörper hinzugegeben werden, welcher spezifisch gegen IgG aus der Maus gerichtet ist und so durch Fluoreszenz stark Antikörper-produzierende Klone noch im semi-solid Medium markiert. Durch diese Weiterentwicklung soll durch das Entfallen des Subklonierens und der ELISA-Testung auf Antikörper-produzierende Hybridomaklone Zeit gespart werden. Zudem ist auch hier, im Vergleich zur bisherigen Testung des Zellkulturüberstands mittels ELISA, ein sofortiger und vereinfachterer Abgleich der Relation aus Fluoreszenzsignal und Klongröße möglich (Mann, 2007). Das Konzept der Detektion von Antikörper-produzierender Hybridomaklone im semi-solid Medium wurde als doppelt so effizient in der Detektion von positiven Klonen beschrieben als das bisherige Vorgehen (X. Li et al., 2018).

Leider konnte mit den gezeigten Versuchen der Ablauf der Hybridoma-Generierung nur leicht verbessert werden. Der aktuelle Stand der Forschung setzt bei der Generierung auf die Sortierung der erstellten Klone mittels Fluoreszenz-aktivierter Zellsortierung (FACS). Hierbei werden mittels Fluoreszenz-markierte Antigene aus dem Zielproteins passende Hybridoma-Klone ausgewählt und vereinzelt, diese Zellen werden anschließend expandiert und liegen ab dem Sortieren monoklonal vor (Akagi et al., 2018).

#### 4.2 Einfluss der Puffer-Zusammensetzung auf die immunhistologische Färbung

In der Immunhistochemie ist es essenziell, dass das Durchführungsprotokoll etabliert, optimiert und verlässlich ist. Es liegt dem Institut für Pathologie des Universitätsklinikums Eppendorf ein detailliertes Protokoll vor, nach welchem Instituts-internen Färbungen per Hand durchgeführt werden. Auffällig ist hier, dass die verwendeten kommerziellen Puffer zum Waschen und Verdünnen der Antikörper eine einfache Zusammensetzung zu haben scheinen und daher kostengünstiger selbst herzustellen sein müssten. Auch eine chemische Analyse von zwei kommerziellen Puffern zeigte, dass die Komposition der Puffer wenig komplex ist und bis auf wenige sehr gering enthaltene Komponenten (wie Caprylsäure) den bekannten Komponenten entspricht. Es wurde daher in der weiteren Austestung von einem „typischen“ Puffer bestehend aus Puffersalz, Trägerprotein, Detergens und Konservierungsmittel ausgegangen.

Zur Austestung der Zusammensetzung wurden die möglichen einzelnen Komponenten des „typischen“ Puffers genauer untereinander und das erzielte Färbeergebnis mit dem von kommerziellen Puffern verglichen. Es zeigte sich, dass die Ergebnisse je nach Antikörper variieren. Hierbei gab es Antikörper, welche bei nahezu jeder Pufferzusammensetzung vergleichbare Ergebnisse wie mit dem kommerziellen Puffer erzielten. Andere Antikörper erzielten nur im kommerziellen Puffer zufriedenstellende Färbeergebnisse. Ein Einfluss des Puffersalzes war nicht zu beobachten, nur bei einem Anteil von mehr als 10 % BSA wurden Verbesserungen des Färbeergebnisses mit den selbst erstellten Puffern bei einigen Antikörpern erreicht. Keine der weiteren getesteten Komponenten zeigten Verbesserungen der Färbeergebnisse mit dem selbst erstellten Puffer.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass es durch die Analysen nicht möglich war, einen kommerziellen Puffer nachzustellen, welcher vergleichbare Färbeergebnisse mit empfindlichen Antikörpern erbringt. Trotz chemischer Analyse des Puffers und Literaturrecherche konnte keine Komponente gefunden werden, welche ausschlaggebend ist. Es wurde beobachtet, dass nicht jedes getestete Trägerprotein denselben Einfluss auf die Funktionalität des Puffers zu haben scheint. Trägerproteine werden generell zur Stabilisierung der Antikörper-Lösung verwendet, um so ein Ausfallen der Antikörper aus der Lösung und die Adhäsion der Antikörper an der Gefäßwand zu verhindern (Chavez et al., 2016; Pandit et al., 2022). Jedoch schien hierfür nur bovinem Serumalbumin (BSA) als Proteinquelle und nicht fetales Kälberserum (FCS), Ziegenserum oder Isotyp-Kontrollantikörper ausreichend zu sein,

sodass die Funktion von Serumalbumin ausschlaggebend zu sein scheint. BSA besteht im Gegensatz zu fetalem Kälberserum und Ziegenserum nicht aus einem Proteingemisch, sondern nur aus dem Protein Serumalbumin. Durch die Reinheit kommt es zur besseren Verhinderung von unspezifischen Bindungen und hat bessere proteinstabilisierende Eigenschaften als die Serumprotein-Gemische (Güven et al., 2014; Pandit et al., 2022; Thakral et al., 2021). Die Puffersalze PBS und TBS schnitten in den Austestungen gleichwertig ab, alle anderen getesteten Puffer erwiesen sich als unzureichend. Es ist hierbei bekannt, dass je nach Art und Konzentration des verwendeten Puffersalzes Proteine eher stabilisiert werden oder aus der Lösung ausfallen. Eine hohe Salzkonzentration führt jedoch eher zum Ausfallen der Proteine, unabhängig von der Art des Salzes (Arosio et al., 2012). Auch andere getestete Chemikalien zeigten keinen Effekt in unseren Versuchen. Die Zugabe von Zuckern wie zum Beispiel Sorbitol, Dextrose oder, wie von uns verwendet, Trehalose wurden als stabilisierend für Proteinlösungen beschrieben wird (Bhambhani et al., 2012). Die Verwendung von Proclin 300 anstelle von Natriumazid, welches als Alternative aufgrund der besseren Konservierung, höheren Kompatibilität mit anderen Chemikalien und geringerer Toxizität beschrieben wurde, zeigte in unseren Versuchen keinen positiven Effekt. Dies kann durch eine verringerte Funktionalität bei hohen Proteinkonzentrationen (0,5-2 %), durch primäre und sekundäre Amine (z. B. Aminosäuren wie Alanin, Arginin, Asparagin, Glutamin, Histidin, Lysin oder Prolin) sowie Sensitivität gegenüber reduzierenden Stoffen und starken Nukleophilen (z. B. Salze) verursacht sein. Somit könnte Proclin 300 im Anwendungszustand nicht funktionell gewesen sein (Affatato, 2004; Sigma Aldrich, 2009). Caprylsäure wurde von anderen Arbeitsgruppen als Protein-stabilisierend in Puffern für die Immunhistochemie beschrieben, in der vorliegenden Arbeit konnte keine Verbesserung durch die Anwendung dieser Komponenten gezeigt werden (Traul et al., 2000).

Es ist möglich, dass die ausschlaggebende Komponente in so geringen Anteilen vorliegt, dass sie durch chemische Analysen nicht detektiert werden konnte, da sie außerhalb des sensitiven Bereichs der Methoden zur Analyse der getesteten kommerziellen Puffer (Flüssigchromatographie mit Massenspektrometrie-Kopplung (LCMS), Ionenchromatographie mit optischer Emissionsspektrometrie mit induktiv gekoppeltem Plasma (ICP IONIC)) liegt.

Es ist zudem möglich, dass die Funktionalität des Antikörpers oder der enthaltenen Komponenten durch die verschiedenen erstellten Puffer eingeschränkt bzw. der Antikörper

dadurch degradiert wurde. Es wurde gezeigt, dass sowohl der pH-Wert, Salze als auch Antioxidationsmittel die Stabilität der Antikörper im Puffer beeinflussen. Auch durch Proteolyse kann der Antikörper degradiert werden (Arosio et al., 2011; Hehle et al., 2016; Laptoš and Omersel, 2018). Des Weiteren kann der Antikörper durch chemische Interaktionen (van-der-Waals Kräfte, hydrophobische Interaktion, Disulfidbrücken, Wasserstoffbrückenbindungen) aggregieren und so funktionslos werden, hierbei spielt die Proteinsequenz des Antikörpers wie zuvor diskutiert (4.1.1 PeptidAuswahl in der Antikörper-Herstellung) aufgrund von Hydrophobität der Aminosäuren in der Sequenz eine große Rolle (Brown, 2015; Nokwe et al., 2014).

#### 4.3 Einfluss der Pufferart auf die Antikörper-Haltbarkeit

Viele kommerzielle Hersteller verkaufen ihre Antikörper vorverdünnt, das heißt, der Antikörper kann direkt verwendet werden (ready-to-use). Jedoch besteht die Gefahr, dass die Haltbarkeit des Antikörpers stark beeinflusst ist, da Antikörper dazu neigen bei zu geringen Konzentrationen aus der Lösung auszufallen und so unbrauchbar zu werden (Pandit et al., 2022). Daher wird vom Hersteller zumeist eine Mindesthaltbarkeit für das Produkt angegeben, innerhalb welcher Zeit eine Funktionalität des Antikörpers gewährleistet sein soll; jedoch wird meist von vielen Monaten bis Jahren gesprochen (Abcam, 2024d; Cell Signaling, 2024).

Zur Evaluation der Mindesthaltbarkeit wurden für zwei Antikörper aus Antikörper-Konzentrat mit entsprechender individueller Verdünnung im Puffer ein ready-to-use Antikörper mit verschiedenen Puffern erstellt, für zwei Jahre gelagert und einmal pro Monat für eine Färbung verwendet. Im Vergleich ist erkennbar, dass die Färbeintensität bei beiden getesteten Antikörpern über die Zeit abnimmt, bei einem Antikörper jedoch schneller. Der kommerzielle Puffer ist bei beiden Antikörpern besser geeignet für eine langfristige Lagerung im verdünnten Zustand, der Puffer aus PBS, BSA, Tween-20 und  $\text{NaN}_3$  erhält über die Zeit hinweg nur bei dem höher konzentrierten Antikörper ein vergleichbares Färbeergebnis zum kommerziellen Puffer. Eine Verdünnung in reinem PBS ist für beide getesteten Antikörper für die Langzeitlagerung nicht geeignet.

Ein ausschlaggebender Faktor in diesem Versuch ist die Verdünnung der beiden getesteten Antikörper. Der „stabilere“ Antikörper wurde nur halb so stark verdünnt wie die „instabileren“ Antikörper (1:900 vs. 1:2000). Wie durch andere Autoren schon beschrieben wurde, hat besonders die Verdünnung einen starken Einfluss auf die Stabilität der Antikörper, da bei zu



geringer Proteinkonzentration im Verdünnungspuffer die Antikörper ausfallen und Aggregate bilden können bzw. durch Adsorption an der Gefäßwand haften (Großhans et al., 2019; Mahler et al., 2009; Nakanishi et al., 2001). Auch die Anwesenheit von stabilisierenden Komponenten im Verdünnungspuffer haben, wie im Kapitel zuvor gezeigt, starken Einfluss auf die langfristige Haltbarkeit und Funktionalität der Antikörper-Verdünnung. So können gerade bei Lagerungen über längere Zeit Oxidation, Deamidierung oder Aggregation durch unspezifische oder kovalente Bindungen (unter anderem beeinflusst durch die Ladung der Aminosäuresequenz) entstehen, welche die Funktionalität des Antikörpers stark beeinflussen (Fukuda et al., 2015; Mahler et al., 2009; Manning et al., 2010).

So können auch die Thermostabilität und Empfindlichkeit gegenüber der Handhabung im Versuch beeinflusst werden. Verschiedene Chemikalien verändern die Schmelztemperatur von Proteinen signifikant und auch die Empfindlichkeit gegenüber Scherkräften wie beim Pipettieren oder Vortexen werden beeinflusst (Koenigsberg and Heldwein, 2018; Tavakoli-Keshe et al., 2014; Thomas and Geer, 2011).

Dies erklärt, warum eine Lagerung der Antikörper in reinem PBS ein wesentlich schlechteres Ergebnis erzielte als eine Lagerung in kommerziellem Puffer oder dem zuvor beschriebenen selbst erstellten Puffer mit BSA als Trägerprotein. Eine Langzeitlagerung eines verdünnten Antikörpers ist somit unbedingt in kommerziellem Puffer zu empfehlen, da hier Komponenten enthalten sind, welche den Antikörper besser stabilisieren als der selbst erstellte Puffer.

#### 4.4 Haltbarkeit von Antikörpern

In Bezug auf das vorherige Kapitel (4.3 Einfluss der Puffer-Zusammensetzung auf die Antikörper-Haltbarkeit) wurde der Einfluss der Lagerbedingungen genauer evaluiert. Hierzu wurden in Anlehnung an ein Testassay der Welthilfsorganisation (Duncan et al., 2018) der Einfluss verschiedener Lagerungs- und Transportbedingungen auf die Funktionalität des Antikörpers in der Immunhistochemie analysiert. Zur Nachstellung einer Langzeitbetrachtung wurde hier unter Verwendung der Arrhenius-Gleichung mittels erhöhter Temperatur eine beschleunigte Alterung der Antikörper herbeigeführt (Kuzman et al., 2021; Wang and Roberts, 2013). Im Gegensatz zum Kapitel zuvor wurde hier ein Antikörper-Konzentrat verwendet. Es sind verschiedene Testabläufe mit 52 Antikörpern durchlaufen und Färbungen durchgeführt worden, welche mit der initialen Färbung vor Lagerungsbeginn zur Evaluation der Funktionalität der Antikörper verglichen wurden.

Es zeigte sich hierbei, dass alle der getesteten Antikörper auch nach unterschiedlichsten Lagerung nach Versuchsende noch funktionell waren und Färbeergebnisse erbrachten, welche mit den initialen Ergebnissen vergleichbar sind. Bei einer Lagerung bei Raumtemperatur oder 37°C zeigte kein Antikörper einen signifikanten Leistungsverlust, eine Lagerung bei -20°C hingegen verminderte die Leistung von nur wenigen Antikörpern leicht.

Auch hiermit konnte gezeigt werden, dass die Stabilität von Antikörpern sehr individuell ist und eine Lagerung unter den empfohlenen Bedingungen (Lagerung bei -20 °C oder 4 °C) wie unter nicht-empfohlenen Bedingungen (Lagerung bei Raumtemperatur oder 37 °C) unterschiedlich starke Effekte auf die Funktionalität der Antikörper in der Immunhistochemie haben kann. Dieses individuelle Verhalten deckt sich mit den Beobachtungen aus der Literatur: Der jeweilige Antikörper selbst, die Zusammensetzung des Puffers und das Handling haben potenziell starken Einfluss auf die Funktionalität bei erhöhten Temperaturen und somit auf die Langzeitlagerung der Antikörper (Kukis et al., 1999; Michaut et al., 2014). Die Zugabe von Zuckern, Mehrfachalkoholen, Peptiden und bakteriostatischen Komponenten zum gelösten Antikörper wurden als förderlich für die Erhöhung der Lagerungszeit beschrieben (Bansal et al., 2017; Bhambhani et al., 2012; Kubiak et al., 2016; Ó'Fágáin and Colliton, 2017). Auch eine Lagerung bei -20°C in lyophilisierter Form mit möglichst seltenem Auftauen des Antikörpers wurde als förderlich für die Stabilität der Antikörper beschrieben (Cleland et al., 2001; Park et al., 2013).

Die Einflüsse, welche in den vorherigen Kapiteln schon genauer erörtert wurden, haben bei einer langfristigen Lagerung bzw. bei einer Lagerung unter erhöhten Temperaturen im Sinne der Beschleunigung der Reaktionsgeschwindigkeit bei erhöhter Temperatur einen noch stärkeren Einfluss. Es ist zu erwarten, dass bei gleicher Antikörperkonzentration von etwa 1 mg/mL unterschiedliche Haltbarkeiten, verursacht durch zu hohe bzw. zu niedrige Antikörperkonzentrationen, nicht vorhanden sind (siehe 4.3 Einfluss der Pufferart auf die Antikörper-Haltbarkeit, Großhans et al., 2019).

Zur Evaluation des Funktionsverlust wird meist eine Analyse der Antikörper nach Versuchsbeendigung durchgeführt. Es werden hierbei mittels Elektrophorese, Kationenaustausch-Chromatographie oder Peptidmassenfingerprint chemische Modifikationen detektiert. Zur Analyse von Konzentration-verursachten Funktionsverlusten der Antikörper durch Aggregatbildung werden die Antikörper durch Größenausschluss-Chromatographie analysiert (Kuzman et al., 2021). Die in unserem Versuch verwendete Immunfärbung kann nicht nach chemischen Modifikationen oder Aggregatbildung differenzieren, durch Abwesenheit der Immunfärbung kann nur auf einen generellen Funktionsverlust rückgeschlossen werden. Eine weitere Testung der Antikörper wäre somit für eine genauere Analyse der Ursache des Funktionsverlusts sinnvoll. Da jedoch mehr als die Hälfte der Antikörper auch nach Beendigung des Versuchs noch funktionsfähig waren, ist diese Evaluation nicht notwendig, wenn nur eine generelle Aussage über die Funktionsfähigkeit der Antikörper getroffen werden soll.

Beobachtete Haltbarkeitsunterschiede bei kurzfristiger Lagerung bei erhöhten Temperaturen sind daher auf die unterschiedlichen Lagerungstemperaturen, auf die individuellen Antikörpersequenz sowie auf Pipettierfehler zurückzuführen. Die Sinnhaftigkeit der Simulation einer Langzeitlagerung wurde schon zuvor bemängelt, da nur im Bereich von 5- 40° C eine Linearität in der Arrhenius-Gleichung gilt und somit eine Vorhersage möglich ist (Kuzman et al., 2021; Wang and Roberts, 2013). Jedoch ist dies die Zeit- effizientere Methode gegenüber einer individuellen Ermittlung der individuellen Haltbarkeit durch Langzeitlagerung der Antikörper. Zur Ermittlung der Langzeithaltbarkeit wird bei der verwendeten Methode mittels der Arrhenius-Gleichung von einer kurzfristigen Haltbarkeit bei erhöhten Temperaturen auf die langfristige Haltbarkeit bei Standardlagerungstemperaturen geschlossen (Waterman, 2011; Waterman et al., 2014). Dem entgegenzuhalten ist, dass biologischen Materialien sich

nicht immer entsprechend der Arrhenius-Gleichung verhalten. Besonders relevant ist hierbei die temperaturbedingte Linearität der Gleichung, zusätzlich können auch andere Faktoren wie die Beschaffenheit der Reaktionsgefäß-Oberfläche Einfluss auf die Aggregationsbereitschaft des Antikörpers haben (Kayser et al., 2011; Paborji et al., 1994; Zidar et al., 2020). Die Europäische Arzneimittelagentur geht davon aus, dass ein Rückschluss auf die Haltbarkeit mittels Arrhenius-Gleichung nur für die doppelte Zeit der analysierten Zeit, maximal 12 Monate, möglich ist (Europäische Arzneimittelagentur, 2018).

Zusammenfassend lässt sich also sagen, dass die beschleunigte Alterung der verschiedenen getesteten Antikörper für die meisten Antikörper innerhalb der getesteten Zeit keinen Verlust ihrer Färbequalität aufzeigte. Hier ist keine weitere Aussage zur Haltbarkeit zu treffen, außer dass sie außerhalb des getesteten Zeitraums liegt.

#### 4.5 Antikörper-Validierung 1: Western Blot

Die in dieser Arbeit verwendeten Antikörper wurden alle spezifisch dafür ausgewählt, in der Immunhistochemie eine zuverlässige Färbung ohne unbekannte unspezifische Färbungen zu erstellen. Hierbei wurde das Augenmerk nur auf die Immunhistochemie gelegt. Eine Verwendung der Antikörper im Western Blot, was ein weiterer sehr häufiger Verwendungszweck von unkonjugierten primären Antikörpern in der Forschung darstellt, wurde hierbei nicht evaluiert. Es sollte nun getestet werden, ob ein Rückschluss von der Leistung in der Immunhistochemie auf die Leistung im Western Blot gemacht werden kann. Hierzu wurden 105 Antikörper, welche alle für die Verwendung in der Immunhistochemie validiert sind, sowohl im Western Blot mit humanem Gewebe als auch mit humanen Zelllinien auf ihre Spezifität im Western Blot getestet. Es wurde betrachtet, ob der verwendete Antikörper im Lysat das Zielprotein spezifisch mit einer Bande bei erwarteter Proteingröße detektiert. Bei weiteren Protein-Banden, die durch den Antikörper detektiert wurden, wurde analysiert, ob diese gegebenenfalls eine erklärbare Relation, wie Isoformen oder Abbauprodukte, zum Zielprotein haben.

Bei Western Blots aus Lysaten humanen Gewebes und Zelllinien konnten ähnliche Ergebnisse in Bezug auf spezifischen und unspezifischen Banden erzielt werden. Für beide Lysatquellen zeigten etwas mehr als die Hälfte der analysierten Antikörper nur eine einzige Bande. Ein kleiner Teil der Antikörper zeigte zusätzlich noch weitere Banden von erklärbarer Herkunft, wie Isoformen und Abbauprodukte. Ein recht großer Anteil von Antikörpern mit zusätzlichen Banden zeigte Banden, welche von unspezifischen Bindungen des Antikörpers an andere Proteine stammen und keine erklärbare Herkunft haben. Diese Antikörper sind für eine spezifische Detektion des Zielproteins in Lysaten ungeeignet, da die Identität der unspezifischen Bindung unbekannt ist.

Zusammenfassend kann man sagen, dass eine Validierung von Antikörpern in der Immunhistochemie nicht ausreichend für die Verwendung im Western Blot ist. Nur ein geringer Anteil der Antikörper, welche hervorragend in der Immunhistochemie funktionieren, ist auch für den Western Blot verwendbar.

Ein großes Problem hierbei ist, dass die zu detektierenden Epitope im FFPE-Gewebe (Formalin-fixiertes und Paraffin-eingebettetes Gewebe) der Immunhistochemie anders vorliegen als im enzymatisch aufgeschlossenen Gewebe im Western Blot. Durch die Formalin-Fixierung liegen Epitope zunächst kreuzvernetzt vor, was durch die Epitop-Demaskierung mittels Hitze größtenteils rückgängig gemacht werden kann. Die Epitope liegen anschließend zum größten Teil nicht mehr kreuzvernetzt in ihrer Tertiärstruktur vor, durch die noch vorhanden Faltungen liegen die Epitope jedoch noch ähnlich wie im frischen Gewebe vor (Gown, 2004; Pileri et al., 1997; Ramos-Vara, 2005; Shi et al., 1991). Für den Western Blot werden die Proben lysiert, erhitzt und dadurch die Proteine denaturiert. Somit liegen Proteine linearisiert und teilweise fragmentiert vor, sodass nur lineare Epitope durch den Antikörper detektiert werden können (Sule et al., 2023).

Es ist daher offensichtlich, dass nur Antikörper mit linearen Epitopen sowohl im Western Blot als auch in der Immunhistochemie funktionieren können. Eine direkte Übertragbarkeit der Funktionalität des Antikörpers von der Immunhistochemie auf den Western Blot und anders herum ist daher nicht möglich, die orthogonale und anwendungsspezifische Validierung von Antikörpern wurde daher schon von mehreren gefordert und etabliert (Bourbeillon et al., 2010; Uhlen et al., 2016).

Kommerzielle Hersteller zeigen ihre Validierung der Antikörper für den Western Blot mittels Zelllinien. Nur ein viel geringerer Anteil der getesteten Antikörper war fähig, in Zelllinien das Zielprotein (und weitere Nebenbanden) zu detektieren als im humanen Gewebe. Der Anteil an Antikörpern, welcher ausschließlich das Zielprotein, weitere Isoformen davon oder unbekannte Nebenbanden detektierte, war im humanen Gewebe ähnlich zu den Zelllinien. Jedoch zeigt dieser Unterschied im Anteil an Antikörpern, welche das Zielprotein im jeweiligen Lysat detektieren können, dass ein starker Unterschied im Proteom der verwendeten Lysate vorliegen muss. Da die Zelllinien prinzipiell immortalisierte Zellen humanen Gewebes darstellen, kann man davon ausgehen, dass das Proteom ähnlich ist und somit ähnliche Ergebnisse im humanen Gewebe und den Zelllinien zu erwarten wären. Jedoch wurde mehrfach gezeigt, dass durch die Immortalisierung und langen Kultivierung der Zelllinien das Proteom stark verändert wurde und Zelllinien im Vergleich zu frischem humanem Gewebe ein wesentlich geringeres Repertoire an Proteinen exprimiert (Beck et al., 2011; Lopes-Ramos et al., 2017; Pontén et al., 2009). Eine Verwendung von Zelllinien als Repräsentation von menschlichem Gewebe ist somit nicht empfehlenswert und stellt eine Unterrepräsentation des humanen Proteoms dar.

Des Weiteren spielt die Erstellung der Lysate und ihre Qualität eine wichtige Rolle in der Detektierbarkeit des Zielproteins durch den Antikörper im Western Blot. Zelllinien liegen als vereinzelte und gereinigte Zellen vor. Bei der Herstellung von Zelllysaten kann man so standardisierte Bedingungen schaffen, die eine Vergleichbarkeit erleichtern. Bei humanem Gewebe hingegen gibt es viele Faktoren welche die Lysat-Erstellung erschweren. Die hier verwendeten Gewebeproben sind Reste von Biopsien oder Routineeingriffen, welche zu einem beliebigen Zeitpunkt während des Eingriffs aus dem Patienten entnommen, weiter aufbereitet, zugeschnitten und mittels flüssigen Stickstoffs eingefroren werden. Anschließend werden sie bei -80 °C gelagert, nach beliebiger Zeit entnommen und von uns weiterverwendet. Hierbei wird das Gewebe von Blut gereinigt und potenzielles Fett entfernt. Nun wird das Gewebe mechanisch aufgeschlossen, hierbei wird das Gewebe durch flüssigen Stickstoff gekühlt. Aufgrund der unterschiedlichen Rigidität der verwendeten Gewebe muss jedes Gewebe unterschiedlich lange bearbeitet werden, bis ein Aufschließen der Zellen stattfindet. All dies zeigt, dass verschiedene Gewebelysate selbst bei bester Bearbeitung unterschiedlich behandelt wurden und es keine Standardisierung wie bei der Lyse von Zelllinien geben kann. Der Aufschluss von humanem Gewebe durch mechanische

Zerkleinerung und anschließender enzymatischer Lyse der Zellen ist zudem wesentlich härter als eine ausschließliche enzymatische Lyse der Zelllinien. Es ist daher zu erwarten, dass die Proteine aus dem humanen Gewebe stärker in Mitleidenschaft gezogen werden als die der Zelllinien. Zudem ist, wie zuvor beschrieben, kein komplettes Entfernen aller weiteren Bestandteile des Gewebes (vor allem Blut) möglich. Die Blutproteine können die Resultate der Western Blots verändern.

Es zeigt sich somit, warum vor allem kommerzielle Hersteller bei der Antikörper Validierung weitestgehend auf Zelllinien zurückgreifen. Zelllinienlysate können einfacher in großen Mengen und reproduzierbarer hergestellt werden. Das Proteom der Zelllinien ist zudem kleiner, sodass weniger Kreuzreaktivitäten des Antikörpers mit anderen Proteinen möglich sind. Eine Validierung der Antikörper in Zelllinien ist somit einfacher, aber gerade bei einer potenziellen Verwendung der Antikörper in humanen Gewebelysaten nicht ausreichend, da durch das eingeschränkte Proteom potenzielle Kreuzreaktivitäten des Antikörpers mit anderen humanen Proteinen nicht erkannt werden.

Ähnliche Vergleiche zwischen humanem Gewebe und Zelllinien zeigten auch bei anderen Arbeitsgruppen signifikante Unterschiede im Proteom der verschiedenen Lysatquellen. Es konnte eine veränderte Expression mehrerer Proteine in den Zellen beobachtet werden, welche schon durch kurzfristige Kultivierung von wenigen Tagen erkennbar wurde. Auch bei sekundären, immortalisierten Zelllinien zeigte sich dies. Es war Veränderung der Expression verschiedener Proteine beobachtet worden, welche unter anderem mit der Wachstumskontrolle und dem Fettsäuremetabolismus in Verbindung gebracht werden konnten und als Anpassung an die Kultivierung in der Zellkultur gewertet wurden (Celis et al., 1999; Ornstein et al., 2000). Des Weiteren ist bei einem direkten Vergleich zu beachten, dass Zelllinien nur aus einem Anteil des Gewebes erstellt wurden und Gewebelysate eine Mischung aller Zellen des Gewebes darstellen. So werden die verschiedenen Expressionsstärken von Proteinen in verschiedenen Bereichen des Gewebes im Gewebelysat als Gesamtexpression im Western Blot dargestellt. In Zelllinienlysaten wird die Expression des bestimmten Teilbereichs des Gewebes dargestellt, aus welchem die Zelllinie erstellt wurde. Zusätzlich kommt hinzu, dass die Expression von Proteinen durch die Immortalisierung potenziell verändert sein kann (Somuncu et al., 2020).

#### 4.6 Antikörper-Validierung 2: Kreuzreaktivität

Wie zuvor beschrieben (4.5 Antikörper Validierung 1: Western Blot) zeigen Antikörper auch im Western Blot Banden und somit Anbindung an Proteine, welche nicht das Zielprotein darstellen. Dies kann durch unspezifische Bindung des Antikörpers an diese Proteine durch ähnliche Epitope stattfinden oder durch Kreuzreaktivität mit verwandten Proteinen, welche nicht nur ein ähnliches Epitop haben, sondern auch funktionell und evolutionär direkt verwandt sind. Besonders relevant wird dies bei großen Proteinfamilien, welche eine ähnliche Funktion und somit zumindest teilweise ähnliche Proteinsequenzen haben. Ein Beispiel hierfür ist die Serinprotease – Familie, bestehend unter anderem aus Trypsin, Elastase und Thrombin. Häufig gibt es daher Antikörper gegen mehrere Mitglieder der Proteinfamilie, da der Antikörper gegen ein Epitop gerichtet ist, welches in mehreren Familienmitgliedern vorhanden ist. Die Gewinnung eines Antikörpers, welcher gegen ein spezifisches Familienmitglied gerichtet ist, ist in diesen Fällen umso schwieriger.

In der vorliegenden Arbeit wurden verschiedene, durch die Hybridoma-Technologie erstellte, Antikörper gegen Trypsin 2 (PRSS2), sowie gegen die verwandten Proteine Trypsin 1 (PRSS1) und Trypsin 3 (PRSS3) auf Kreuzreaktivität getestet. Alle drei Proteinsequenzen weisen, aufgrund ihrer Mitgliedschaft in der gleichen Proteinfamilie, eine hohe Ähnlichkeit auf und auch die gewählten Immunisierungspeptide zeigten eine starke Übereinstimmung in den gewählten Peptidsequenzen.

Es zeigte sich bei der Analyse mehrere erstellter Hybridomaklone eine Kreuzreaktivität zu den verwandten Trypsin-Familienmitgliedern bei manchen Klonen durch Peptide, welche nicht ausschließlich kreuzreaktive Klone generierten. Für PRSS1 und PRSS2 konnten spezifische Antikörper erstellt werden, nur für PRSS3 konnte kein PRSS3-spezifischer Antikörper erstellt werden. Die getesteten Klone waren entweder mit allen drei Trypsin-Familienmitgliedern reaktiv oder komplett unselektiv, da keine Bande von erwarteter Größe der Trypsin-Proteine detektierbar war.



Es scheint also unabhängig von Peptidsequenz und Sequenzähnlichkeit untereinander zu sein, ob ein Hybridomaklon aus diesen Peptidsequenzen Familienmitglied-spezifisch ist, eine Kreuzreaktivität zeigt oder unspezifisch ist. Dies ist damit zu erklären, dass das finale Epitop des Antikörpers nur wenigen Aminosäuren abdeckt, das verwendete Immunisierungspeptid hingegen etwa 15 Aminosäuren lang ist (Subramanian and Chinnappan, 2013; Trier et al., 2019). So kann je nach gebildetem Epitop ein Bereich verwendet werden, welcher in der Sequenz anderer Familienmitglieder auch vorkommt, da für alle gewählten Peptide der Trypsin-Familienmitglieder eine relativ hohe Ähnlichkeit gefunden wurden. Je nach Verwendungszweck des Antikörpers ist diese Pan-Spezifität des erstellten Antikörpers gegenüber allen drei Trypsin-Familienmitgliedern tolerabel, jedoch sinkt die Reproduzierbarkeit eines Versuchs mit sinkender Spezifität und Selektivität des verwendeten Antikörpers. Pan-spezifische Antikörper haben hierbei den Vorteil einer gewissen Robustheit gegenüber Modifikationen und Prozessierungen des Zielproteins, da so gegebenenfalls unabhängig von der Modifikation wie Phosphorylierungen das Zielprotein erkannt werden kann (Starr et al., 2021).

Eine Kreuzreaktivität ist jedoch nicht nur innerhalb der Proteinfamilie wahrscheinlich, auch zwischen verschiedenen Spezies ist eine Reaktivität, je nach Konservierung der Proteinsequenz, möglich. Wie in der Maus bereits gezeigt, ist durch die hohe Sequenzähnlichkeit und evolutionäre Konservierung vieler Proteine eine hohe Kreuzreaktivität der Antikörper zu murinen Proteinen beobachtet worden und somit auch in anderen ähnlich nahe verwandten Spezies zu erwarten (Temming et al., 2020). Es zeigte sich, dass vor allem in der Ratte viele humane Antikörper auch hier das Zielprotein spezifisch detektieren. Im Schwein sind hingegen weniger humane Antikörper für das porkine Zielprotein spezifisch. Eine unspezifische Färbung konnte hier vor allem in der Ratte beobachtet werden, im Schwein wurde zumeist entweder eine spezifische oder keine Färbung beobachtet. Dies ist damit zu erklären, dass es gerade zwischen Mensch und Ratte eine große Menge an orthologen Proteinen gibt (Makałowski and Boguski, 1998), zwischen Mensch und Schwein jedoch einige Unterschiede im Expressionsprofil gibt (Karlsson et al., 2022). Je nach Anwendung des Antikörpers kann diese Beobachtung vorteilhaft sein, da eine Generierung eines Antikörpers mit zufälliger zusätzlicher Funktionalität in Ratte oder Schwein eine Erweiterung des Anwendungsgebiets ist, ohne einen Mehraufwand zu benötigen. Da sowohl Ratte als auch Schwein einen recht kleinen Anteil der verwendeten Versuchstiere ausmacht,

und hier zumeist mit humanisierten gentechnischen Proteinen gearbeitet wird, ist der Markt für Antikörper für beide Spezies klein. Eine gezielte Erstellung von Antikörpern, welche spezifisch für einen der beiden Spezies sind, lohnt sich daher nicht. Eine zufällige Spezifität des Antikörpers auch in diesen Spezies ist hingegen erfreulich und stellt je nach Anwendung kein Problem dar. Nur bei Anwendungen, bei welchen zwischen dem Ursprung des untersuchten Zielproteins zwischen Mensch, Ratte oder Schwein unterschieden werden soll, wäre eine Spezifität in mehreren Spezies störend.

#### 4.7 Antikörper-Validierung 3: Vergleich mit mRNA-Expression in Zelllinien

In der Validierung von Forschungsergebnissen ist es wichtig, orthogonale Methoden zu verwenden. Idee ist, dass ein Ergebnis mit zwei unterschiedlichen Methoden reproduzierbar sein sollte. Hierbei sollte eine Methode zum Beispiel Antikörper-basiert sein (Immunhistochemie, Western Blot, ELISA) und die orthogonale Methode zum Beispiel eine Gensequenz-basierte Nachweismethode verwendet (RT-PCR mittels Primer, FISH mittels Sonden) (Uhlen et al., 2016). Dieses Konzept wurde auch auf die Ergebnisse der immunhistologischen Färbung von Zelllinien durch 13 Antikörper angewendet, als orthogonale Methode wurde hierbei für diese Proteine eine RT-PCR durchgeführt und die Ergebnisse der 104 Zelllinien in den beiden Methoden verglichen.

Bei einer Analyse zur Verlässlichkeit der Färbung der FFPE-Zelllinien zeigte sich, dass etwa 20% der Zelllinien keine Färbung bei keinem der getesteten Proteine aufwiesen. Es ist somit nicht auszuschließen, dass diese Zelllinien aufgrund unterschiedlichster Faktoren im Herstellungsprozess einen Schaden genommen haben und so nicht korrekt in der Immunhistochemie angefärbt werden. Mögliche Faktoren sind hierbei vor allem eine Überfixierung der Zellen, da hierbei eine übermäßige und nicht-reversible Kreuzvernetzung der Proteine stattfindet (Boenisch, 2005; Miller et al., 2005; Van Alstine et al., 2002). Weitere Möglichkeiten sind eine zu lange bzw. unterschiedlich lange Lagerung in flüssigem Paraffin, was aufgrund der Wärme zu einer Degradation von Proteinen und RNA führen kann (Detmer et al., 2016).

Der Abgleich der Ergebnisse aus der immunhistochemischen Färbung und der RT-PCR ergab nur bei acht Proteinen eine vollständige Übereinstimmung der Ergebnisse und somit eine mit orthogonalen Methoden bestätigte Funktionalität des Antikörpers in der Immunhistochemie. Bei drei Proteinen ist aufgrund der geringen Anzahl an IHC-positiven Zelllinien eine konkrete Aussage schwierig, da hier die zu geringe Sensitivität der verwendeten Methoden ein Problem darstellen kann. Für zwei Proteine widersprechen sich die Ergebnisse aus Immunhistochemie und RT-PCR mindestens teilweise. Auch im Vergleich mit der Literatur (Uhlen et al., 2025a, 2025b, 2025c, 2025d, 2025e, 2025f, 2025g, 2025h, 2025i, 2025j, 2025k, 2025l, 2025m) zeigten nur neun der 13 Proteine eine Übereinstimmung mit der Literatur in ihren RNA-Expressionslevel, vier der 13 untersuchten Zielproteine widersprechen in ihren RT-PCR Ergebnissen den Literaturangaben mindestens teilweise. Dies deutet auf ein Problem bei der von uns durchgeführten RT-PCR hin, da die RNA-Expressionslevel aus der Literatur fast immer mit den Färbeergebnissen der IHC übereinstimmen.

Ein Problem kann die geringe absoluten RNA-Menge in den jeweiligen Zellen der Zelllinien sein, da die RNA-Expressionsdaten der verschiedenen Proteine eine große Spannweite an RNA-Mengen in den Zellen aufzeigten. Manche der untersuchten Proteine zeigten hierbei in der am höchsten exprimierenden Zelllinie nur einen Bruchteil der Expressionshöhe wie für andere Proteine, was die Möglichkeit des Detektionslimits aufzeigt (Uhlen et al., 2024a, Uhlen et al., 2024b)). Diese Beobachtung korreliert mit unseren Beobachtungen zur Abwesenheit der Färbung in der Immunhistochemie. Mit einhergehend ist hier die Problematik, dass für eine RT-PCR genügend RNA bzw. cDNA eingesetzt werden muss, um oberhalb des Detektionslimits zu bleiben (Forootan et al., 2017). Ist in der Zelllinie nur eine geringe Menge der Protein-RNA vorhanden, braucht es hohe Einsatzmengen an Zellen um die minimale Einsatzmenge an RNA zu erhalten, was logistisch in der Zellkultur problematisch sein kann. Die Einsatzmenge an RNA und somit cDNA muss somit zuvor optimiert werden. Dies kann durch eine Verdünnungsreihe der einzusetzenden cDNA erfolgen, hierbei kann die Detektierbarkeit eines Houskeeping-Genes wie beta Aktin verwendet werden, was in großen Mengen vorhanden ist und zur Berechnung der relativen RNA-Expression im Fortgang mittels der  $\Delta$ CT-Methode verwendet wird (Livak and Schmittgen, 2001). Durch die optimale Einsatzmenge an cDNA kann verhindert werden, dass aufgrund zu geringer Einsatzmenge ein Anstieg des Signals in der RT-PCR außerhalb des dynamischen Bereichs stattfindet, ab welchem die Detektionsgrenze der meisten Geräte erreicht ist (Ma et al., 2021).

Neben den technischen Beschränkungen zeigt dieser Versuch jedoch, dass bei Proteinen, welche in den verwendeten Zelllinien hohe RNA-Expressionen zeigten, teilweise keine gute Übereinstimmung zwischen IHC- und RT-PCR-Ergebnissen vorhanden ist. Dies kann einerseits darauf zurückgeführt werden, dass nicht zwingend die Menge der RNA eines Proteins der Menge des final erstellten Proteins entspricht bzw. die Proteinkonzentrationen in der Zelle nicht immer mit der RNA-Menge korrelieren. Hierbei ist zu beachten, dass die Translation der RNA in Proteine von der Stabilität der RNA, Effizienz der Translation, Regulation der Proteinbiosynthese, post-translationaler Modifikationen und dem Proteinabbau abhängig ist und von Zelllinie, Protein und Kontext unterschiedlich sein kann (Alberts et al., 2011). Zudem kann die Diskrepanz auf die verringerte Proteomgröße in Zelllinien zurückgeführt werden, da in Zelllinien nicht alle Proteine und deren RNA vorhanden bzw. exprimiert sind, welche im Ursprungsgewebe der Zelllinie exprimiert wurden. Dies ist auf genetische Veränderungen des Zellgenoms im Laufe der Immortalisierung der Zellen zurückzuführen, wie zum Beispiel durch die erhöhte Genexpression, Genexpressionsunterdrückung oder Mutation von Zellzyklus-Kontrollgenen während der Immortalisierung (Beck et al., 2011; De Bardet et al., 2023; Irfan Maqsood et al., 2013; Pontén et al., 2009). Eine weitere Möglichkeit, warum die Ergebnisse aus RT-PCR und Immunhistochemie nicht zusammenpassen, könnte hier auch eine Verwechslung der Zelllinien zu einem Zeitpunkt der Probenaufbereitung sein. Hierbei wäre es notwendig, durch besondere Merkmale wie eine besonders starke Proteinexpression bestimmter Proteine (SK-BR-3 mit HER2) oder durch Sequenzierung die Zelllinien zu identifizieren.

Zelllinien scheinen bei einer orthogonalen Validierung für Antikörper, welche später potenziell in Gewebeproben verwendet werden sollen, keine gute Wahl zu sein. Gewebeproben wären somit die bessere Wahl für diesen Versuch, jedoch sollte der hier durchgeführte Versuch die Erstellung und Einsetzbarkeit von FFPE-Zelllinien evaluieren.

## 5. Zusammenfassung

Die Immunhistochemie ist eine der wichtigsten Methoden der Biologie und Medizin, welche durch die Verwendung von validierten Antikörpern Proteine zuverlässig erkennen kann. Hierbei ist es essenziell, dass die verwendeten Antikörper validiert sind, um so ihre Selektivität und Spezifität zu erfassen. Ziel der Validierung ist es, Antikörper zu finden, welche nur das Zielprotein detektieren und keine unspezifischen Bindungen mit weiteren Proteinen eingehen. Nur solche Antikörper garantieren ein aussagekräftiges Färbeergebnis.

Wie auch durch die IVDR-Regularien gefordert, ist es vor dem Einsatz der Antikörper daher unbedingt notwendig, die Färbeeigenschaften neuer Antikörper umfänglich zu testen und die Konditionen, unter welchen sie eingesetzt werden, zu optimieren.

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass sowohl die Dauer der Lagerung als auch die Zusammensetzung des Verdünnungspuffers die Qualität als auch die Reproduzierbarkeit der Färbeergebnisse durch monoklonale Antikörper stark beeinflussen kann. Eine Verwendung von kommerziellen Verdünnungspuffern erstellt eine wesentlich bessere Qualität der Färbungen, welche im Vergleich zu selbst erstellten Puffern auch besser reproduzierbar ist. Für die meisten Antikörper konnte eine Verwendbarkeit etwas über das Verfallsdatum hinaus beobachtet werden, sofern sie in kommerziellen Verdünnungspuffern verdünnt wurden. Die entsprechende Haltbarkeit ist jedoch Antikörper-spezifisch und ist durch die biochemischen Eigenschaften des jeweiligen Antikörpers beeinflusst.

Zur Validierung von Antikörpern konnte gezeigt werden, dass Aufgrund der besseren Repräsentation des späteren Anwendungsgebiets und der damit verbundenen größeren Protein-Vielfalt humanes Gewebe das bessere Validierungslysat im Vergleich zu humanen Zelllinien ist. Es konnte ein starker Unterschied der Leistung der Antikörper bei der Validierung im Western Blot im humanen Gewebe zu humanen Zelllinien beobachtet werden. Ein Antikörper, welcher nur spezifische Banden für das Zielprotein zeigt, konnte im humanen Gewebe seltener ermittelt werden; hinzu kommt auch die häufiger detektierbare Kreuzreaktivität von Antikörpern innerhalb nah verwandter Proteinfamilien. Eine Übertragung der Ergebnisse der IHC von FFPE-fixierten Zellen auf Ergebnisse der RT-PCR zur Evaluierung der RNA-Mengen desselben Zielproteins im FFPE-fixierten Zellen ist nur begrenzt möglich, was durch technische Limitationen der FFPE-Fixierung von Zellen verursacht sein kann. Eine Übertragbarkeit der Ergebnisse sollte durch Optimierung der RNA-Gewinnung im Sinne der orthogonalen Validierung von Ergebnissen prinzipiell jedoch möglich sein.

Die Generierung von monoklonalen Antikörpern mittels der Erstellung von Hybridoma-Klonen durch Fusion von murinen B-Lymphozyten und humane Myeloma-Zellen ist eine alte, aber immer noch häufig verwendete Methode. Diese Methode hat eine geringe Effizienz und wird von vielen Faktoren beeinflusst. Optimierungsparameter zur Effizienzsteigerung der Methode sollten daher als Alternative zu anderen Methoden ermittelt werden, welche schneller, effizienter aber auch teurer in der Generierung von monoklonalen Antikörpern sind.

Es konnte gezeigt werden, dass bei der Generierung von monoklonalen Antikörpern die gezielte Auswahl der Immunisierungspeptide mittels Algorithmen oder biochemischer Faktoren nicht maßgeblich über den Erfolg des Versuchs entscheidet. Die Aminosäurekomposition, die Glykosylierung der Sequenz sowie die Lage des Peptids innerhalb des ganzen Zielproteins scheinen keinen konkreten Einfluss auf den Erfolg zu haben. Die Homologie der verwendeten humanen Peptidsequenzen mit dem murinen Genom ist jedoch von hoher Relevanz. Nur eine geringe Homologie ermöglicht eine erfolgreiche Generierung von monoklonalen Antikörpern, welche spezifisch für das humane Proteom sind. Zur Vorhersage des weiteren Erfolg des erstellten monoklonalen Antikörpers ist die Höhe des ELISA-Werts zur Evaluierung der Antikörper-Produktionsmengen kein ausreichender Maßstab. Dies ist potenziell der Diskrepanz zwischen Produktionsmenge und Affinität des Antikörpers im *in vitro* Konzept der Generierung von Antikörper im Gegensatz zum Reifungsprozess im menschlichen Körper geschuldet. Die Produktion von monoklonalen Antikörpern mittels Generierung von Hybridoma-Klonen aus murinen B-Lymphozyten und humanen Myeloma-Zellen ist auch nach hier gemachten Optimierungsversuchen eine ineffiziente Methode, die Verwendung anderer Methoden wie das B-Zell-Panning oder der Semi-Solid Methode führt zu keiner nennenswerten Effizienzsteigerung. Die Hybridoma-Methode bleibt somit weiterhin eine wenig effiziente Methode im Vergleich zu neueren Techniken zur Generierung monoklonaler Antikörper.

## 6. Literaturverzeichnis

- Abcam, 2024a. Antigen retrieval and permeabilization for IHC [WWW Document]. URL <https://www.abcam.com/en-ar/technical-resources/guides/ihc-guide/antigen-retrieval-and-permeabilization> (accessed 7.16.24).
- Abcam, 2024b. Antibody Diluent (ab64221) Specification [WWW Document]. URL <https://www.abcam.com/en-de/products/buffers/antibody-diluent-ab64211#tab=datasheet>
- Abcam, 2024c. Antibody storage guide.
- Abcam, 2024d. How to choose and use antibodies [WWW Document]. URL <https://www.abcam.com/en-de/technical-resources/guides/antibody-basics/how-to-choose-and-use-antibodies#achecklistforchoosingprimaryantibodies>
- Adam, L., 2016. High throughput monoclonal antibody generation by b cell panning and proliferation. WO2016149137A1.
- Affatato, S., 2004. Sodium-azide versus ProClin 300: influence on the morphology of UHMWPE particles generated in laboratory tests. *Biomaterials* 25, 835–842. [https://doi.org/10.1016/S0142-9612\(03\)00603-3](https://doi.org/10.1016/S0142-9612(03)00603-3)
- Akagi, S., Nakajima, C., Tanaka, Y., Kurihara, Y., 2018. Flow cytometry-based method for rapid and high-throughput screening of hybridoma cells secreting monoclonal antibody. *J. Biosci. Bioeng.* 125, 464–469. <https://doi.org/10.1016/j.jbiosc.2017.10.012>
- Akashi, K., Traver, D., Miyamoto, T., Weissman, I.L., 2000. A clonogenic common myeloid progenitor that gives rise to all myeloid lineages. *Nature* 404, 193–197. <https://doi.org/10.1038/35004599>
- Alberts, B., Nover, L., Bronold, M. (Eds.), 2011. *Lehrbuch der molekularen Zellbiologie*, 3. Aufl., 2. Nachdr. ed. Wiley-VCH, Weinheim.
- Alix, A.J.P., 1999. Predictive estimation of protein linear epitopes by using the program PEOPLE. *Vaccine* 18, 311–314. [https://doi.org/10.1016/S0264-410X\(99\)00329-1](https://doi.org/10.1016/S0264-410X(99)00329-1)
- Andreeff, M., Bartal, A., Feit, C., Hirshaut, Y., 1985. Clonal Stability and Heterogeneity of Hybridomas: Analysis by Multiparameter Flow Cytometry. *Hybridoma* 4, 277–287. <https://doi.org/10.1089/hyb.1985.4.277>
- Arosio, P., Barolo, G., Müller-Späth, T., Wu, H., Morbidelli, M., 2011. Aggregation Stability of a Monoclonal Antibody During Downstream Processing. *Pharm. Res.* 28, 1884–1894. <https://doi.org/10.1007/s11095-011-0416-7>
- Arosio, P., Jaquet, B., Wu, H., Morbidelli, M., 2012. On the role of salt type and concentration on the stability behavior of a monoclonal antibody solution. *Biophys. Chem.* 168–169, 19–27. <https://doi.org/10.1016/j.bpc.2012.05.004>
- Ausserwöger, H., Schneider, M.M., Herling, T.W., Arosio, P., Invernizzi, G., Knowles, T.P.J., Lorenzen, N., 2022. Non-specificity as the sticky problem in therapeutic antibody development. *Nat. Rev. Chem.* 6, 844–861. <https://doi.org/10.1038/s41570-022-00438-x>
- Bakhshesh, M., Ranjbar, M., Almasi, S., 2018. Immunoinformatic analysis of glycoprotein from bovine ephemeral fever virus. *Biomed. Biotechnol. Res. J. BBRJ* 2, 208. [https://doi.org/10.4103/bbrj.bbrj\\_71\\_18](https://doi.org/10.4103/bbrj.bbrj_71_18)
- Bandilla, K.K., McDuffie, F.C., Gleich, G.J., 1969. Immunoglobulin classes of antibodies produced in the primary and secondary responses in man. *Clin. Exp. Immunol.* 5, 627–641.
- Bansal, R., Dhawan, S., Chattopadhyay, S., Maurya, G.P., Haridas, V., Rathore, A.S., 2017. Peptide Dendrons as Thermal-Stability Amplifiers for Immunoglobulin G1 Monoclonal Antibody Biotherapeutics. *Bioconjug. Chem.* 28, 2549–2559. <https://doi.org/10.1021/acs.bioconjchem.7b00389>

Bartal, A.H., Hirshaut, Y., 1987. Current Methodologies in Hybridoma Formation, in: Bartal, A.H., Hirshaut, Y. (Eds.), *Methods of Hybridoma Formation*. Humana Press, Totowa, NJ, pp. 1–40. [https://doi.org/10.1007/978-1-4612-4826-2\\_1](https://doi.org/10.1007/978-1-4612-4826-2_1)

Battifora, H., Kopinski, M., 1986. The influence of protease digestion and duration of fixation on the immunostaining of keratins. A comparison of formalin and ethanol fixation. *J. Histochem. Cytochem.* 34, 1095–1100. <https://doi.org/10.1177/34.8.2426335>

Beck, M., Schmidt, A., Malmstroem, J., Claassen, M., Ori, A., Szymborska, A., Herzog, F., Rinner, O., Ellenberg, J., Aebersold, R., 2011. The quantitative proteome of a human cell line. *Mol. Syst. Biol.* 7, 549. <https://doi.org/10.1038/msb.2011.82>

Bhambhani, A., Kissmann, J.M., Joshi, S.B., Volkin, D.B., Kashi, R.S., Russell Middaugh, C., 2012. Formulation Design and High-Throughput Excipient Selection Based on Structural Integrity and Conformational Stability of Dilute and Highly Concentrated IgG1 Monoclonal Antibody Solutions. *J. Pharm. Sci.* 101, 1120–1135. <https://doi.org/10.1002/jps.23008>

Bhoyar, L., Mehar, P., Chavali, K., 2024. An overview of DNA degradation and its implications in forensic caseworks. *Egypt. J. Forensic Sci.* 14, 15. <https://doi.org/10.1186/s41935-024-00389-y>

Blandino, R., Baumgarth, N., 2019. Secreted IgM: New tricks for an old molecule. *J. Leukoc. Biol.* 106, 1021–1034. <https://doi.org/10.1002/JLB.3RI0519-161R>

Blythe, M.J., Flower, D.R., 2005. Benchmarking B cell epitope prediction: Underperformance of existing methods. *Protein Sci.* 14, 246–248. <https://doi.org/10.1110/ps.041059505>

Boenisch, T., 2005. Effect of Heat-Induced Antigen Retrieval Following Inconsistent Formalin Fixation: *Appl. Immunohistochem. Mol. Morphol.* 13, 283–286. <https://doi.org/10.1097/01.0000146524.74402.a4>

Bogen, S., Vani, K., Sompuram, S., 2009. Molecular mechanisms of antigen retrieval: antigen retrieval reverses steric interference caused by formalin-induced cross-links. *Biotech. Histochem.* 84, 207–215. <https://doi.org/10.3109/10520290903039078>

Bourbeillon, J., Orchard, S., Benhar, I., Borrebaeck, C., De Daruvar, A., Dübel, S., Frank, R., Gibson, F., Gloriam, D., Haslam, N., Hiltker, T., Humphrey-Smith, I., Hust, M., Juncker, D., Koegl, M., Konthur, Z., Korn, B., Krobisch, S., Muyldermans, S., Nygren, P.-Å., Palcy, S., Polic, B., Rodriguez, H., Sawyer, A., Schlapshy, M., Snyder, M., Stoevesandt, O., Taussig, M.J., Templin, M., Uhlen, M., Van Der Maarel, S., Wingren, C., Hermjakob, H., Sherman, D., 2010. Minimum information about a protein affinity reagent (MIAPAR). *Nat. Biotechnol.* 28, 650–653. <https://doi.org/10.1038/nbt0710-650>

Bradbury, A.R.M., Trinklein, N.D., Thie, H., Wilkinson, I.C., Tandon, A.K., Anderson, S., Bladen, C.L., Jones, B., Aldred, S.F., Bestagno, M., Burrone, O., Maynard, J., Ferrara, F., Trimmer, J.S., Görnemann, J., Glanville, J., Wolf, P., Frenzel, A., Wong, J., Koh, X.Y., Eng, H.-Y., Lane, D., Lefranc, M.-P., Clark, M., Dübel, S., 2018. When monoclonal antibodies are not monospecific: Hybridomas frequently express additional functional variable regions. *mAbs* 10, 539–546. <https://doi.org/10.1080/19420862.2018.1445456>

Brown, M., 2015. *Analyzing Protein Aggregation in Biopharmaceuticals*.

Busby, M., Xue, C., Li, C., Farjoun, Y., Gienger, E., Yofe, I., Gladden, A., Epstein, C.B., Cornett, E.M., Rothbart, S.B., Nusbaum, C., Goren, A., 2016. Systematic comparison of monoclonal versus polyclonal antibodies for mapping histone modifications by ChIP-seq. *Epigenetics Chromatin* 9, 49. <https://doi.org/10.1186/s13072-016-0100-6>

Büyücek, S., Schrap, N., Menz, A., Lutz, F., Chirico, V., Viehweger, F., Dum, D., Schlichter, R., Hinsch, A., Fraune, C., Bernreuther, C., Kluth, M., Hube-Magg, C., Möller, K., Reiswich, V., Luebke, A.M., Lebok, P., Weidemann, S., Sauter, G., Lennartz, M., Jacobsen, F., Clauditz, T.S., Marx, A.H., Simon, R., Steurer, S., Burandt, E., Gorbokon, N., Minner, S., Krech, T., Freytag,



M., 2024. Prevalence and clinical significance of Claudin-3 expression in cancer: a tissue microarray study on 14,966 tumor samples. *Biomark. Res.* 12. <https://doi.org/10.1186/s40364-024-00702-w>

Carl Roth, 2024. Antibody Diluent (#0070.1) Specification [WWW Document]. URL <https://www.carlroth.com/en/en/enhancers/antibody-diluent-green/p/0070.1>

Cecil, D.L., Holt, G.E., Park, K.H., Gad, E., Rastetter, L., Childs, J., Higgins, D., Disis, M.L., 2014. Elimination of IL-10–Inducing T-Helper Epitopes from an IGFBP-2 Vaccine Ensures Potent Antitumor Activity. *Cancer Res.* 74, 2710–2718. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-13-3286>

Celis, A., Rasmussen, H.H., Celis, P., Basse, B., Lauridsen, J.B., Ratz, G., Hein, B., Ostergaard, M., Wolf, H., Orntoft, T., Celis, J.E., 1999. Short-term culturing of low-grade superficial bladder transitional cell carcinomas leads to changes in the expression levels of several proteins involved in key cellular activities. *Electrophoresis* 20, 355–361. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1522-2683\(19990201\)20:2<355::AID-ELPS355>3.0.CO;2-N](https://doi.org/10.1002/(SICI)1522-2683(19990201)20:2<355::AID-ELPS355>3.0.CO;2-N)

Cell Signaling, 2024. How should I store my antibody? [WWW Document]. URL <https://www.cellsignal.com/learn-and-support/technical-support/how-should-i-store-my-antibody/000002058>

Chang, S., Lamm, S.H., 2003. Human Health Effects of Sodium Azide Exposure: A Literature Review and Analysis. *Int. J. Toxicol.* 22, 175–186. <https://doi.org/10.1080/10915810305109>

Chavez, B.K., Agarabi, C.D., Read, E.K., Boyne li, M.T., Khan, M.A., Brorson, K.A., 2016. Improved Stability of a Model IgG3 by DoE-Based Evaluation of Buffer Formulations. *BioMed Res. Int.* 2016, 1–8. <https://doi.org/10.1155/2016/2074149>

Chen, L., Kashina, A., 2021. Post-translational Modifications of the Protein Termini. *Front. Cell Dev. Biol.* 9, 719590. <https://doi.org/10.3389/fcell.2021.719590>

Chong, S., Ham, S., 2014. Interaction with the Surrounding Water Plays a Key Role in Determining the Aggregation Propensity of Proteins. *Angew. Chem.* 126, 4042–4045. <https://doi.org/10.1002/ange.201309317>

Cleland, J.L., Lam, X., Kendrick, B., Yang, J., Yang, T., Overcashier, D., Brooks, D., Hsu, C., Carpenter, J.F., 2001. A specific molar ratio of stabilizer to protein is required for storage stability of a lyophilized monoclonal antibody. *J. Pharm. Sci.* 90, 310–321. [https://doi.org/10.1002/1520-6017\(200103\)90:3<310::AID-JPS6>3.0.CO;2-R](https://doi.org/10.1002/1520-6017(200103)90:3<310::AID-JPS6>3.0.CO;2-R)

Coons, A.H., Creech, H.J., Jones, R.N., 1941. Immunological Properties of an Antibody Containing a Fluorescent Group. *Exp. Biol. Med.* 47, 200–202. <https://doi.org/10.3181/00379727-47-13084P>

Coons, A.H., Leduc, E.H., Kaplan, M.H., With the Technical Assistance of Jeanne M. Connolly, 1951. LOCALIZATION OF ANTIGEN IN TISSUE CELLS. *J. Exp. Med.* 93, 173–188. <https://doi.org/10.1084/jem.93.2.173>

Dang, X., Guelen, L., Lutje Hulsik, D., Ermakov, G., Hsieh, E.J., Kreijtz, J., Stammen-Vogelzangs, J., Lodewijks, I., Bertens, A., Bramer, A., Guadagnoli, M., Nazabal, A., Van Elsas, A., Fischmann, T., Juan, V., Beebe, A., Beaumont, M., Van Eenennaam, H., 2023. Epitope mapping of monoclonal antibodies: a comprehensive comparison of different technologies. *mAbs* 15, 2285285. <https://doi.org/10.1080/19420862.2023.2285285>

Dapson, R.W., 1993. Fixation for the 1990's: a Review of Needs and Accomplishments. *Biotech. Histochem.* 68, 75–82. <https://doi.org/10.3109/10520299309104670>

Davis, J.M., Pennington, J.E., Kubler, A.-M., Conscience, J.-F., 1982. A simple, single-step technique for selecting and cloning hybridomas for the production of monoclonal antibodies. *J. Immunol. Methods* 50, 161–171. [https://doi.org/10.1016/0022-1759\(82\)90222-8](https://doi.org/10.1016/0022-1759(82)90222-8)

De Bardet, J.C., Cardentey, C.R., González, B.L., Patrone, D., Mulet, I.L., Siniscalco, D., Robinson-Agramonte, M.D.L.A., 2023. Cell immortalization: In Vivo Molecular Bases and In Vitro Techniques for Obtention. *BioTech* 12, 14. <https://doi.org/10.3390/biotech12010014>

Delves, P.J., Martin, S.J., Burton, D.R., Roitt, I.M., 2017. Roitt's essential immunology, 13th edition. ed. Wiley Blackwell, Chichester, West Sussex ; Hoboken, [NJ].

Detmer, J., Qiu, X., Matias, M., Wang, Z., Baumeister, M., Ray, M., Sudin, E., Uzgiris, A.J., 2016. Optimization of storage conditions for formalin-fixed paraffin-embedded tissue sections to be used in molecular testing. *J. Clin. Oncol.* 34, e23137–e23137. [https://doi.org/10.1200/JCO.2016.34.15\\_suppl.e23137](https://doi.org/10.1200/JCO.2016.34.15_suppl.e23137)

Duncan, R.J.S., Best, S., Braniff, S., Lanigan, M., Healy, D., Meurant, R., 2018. Establishing stability of in vitro diagnostic medical devices (TGS-2).

Ehrlich, P., 1910. Anwendung und Wirkung von Salvarsan.

Ehrlich, P., 1900. Croonian lecture.—On immunity with special reference to cell life. *Proc. R. Soc. Lond.* 66, 424–448. <https://doi.org/10.1098/rspl.1899.0121>

Eisenberg, D., Weiss, R.M., Terwilliger, T.C., 1984. The hydrophobic moment detects periodicity in protein hydrophobicity. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 81, 140–144. <https://doi.org/10.1073/pnas.81.1.140>

EuroMAbNet, 2024. Positive and negative controls for antibody validation [WWW Document]. URL <https://www.euromabnet.com/guidelines/positive-negative-controls.php>

Europäische Arzneimittelagentur, 2018. Guideline on the requirements for quality documentation concerning biological investigational medicinal products in clinical trials.

Europäisches Parlament, Rat der Europäischen Union, 1998. Richtlinie 98/79/EG des Europäischen Parlaments und des Rates vom 27. Oktober 1998 über In-vitro-Diagnostika, 98/79/EG.

Forootan, A., Sjöback, R., Björkman, J., Sjögreen, B., Linz, L., Kubista, M., 2017. Methods to determine limit of detection and limit of quantification in quantitative real-time PCR (qPCR). *Biomol. Detect. Quantif.* 12, 1–6. <https://doi.org/10.1016/j.bdq.2017.04.001>

Fraenkel-Conrat, H., Brandon, B.A., Olcott, H.S., 1947. The reaction of formaldehyde with proteins; participation of indole groups; gramicidin. *J. Biol. Chem.* 168, 99–118.

Frank, S.A., 2002. Immunology and evolution of infectious disease. Princeton University Press, Princeton.

Fukuda, J., Iwura, T., Yanagihara, S., Kano, K., 2015. Factors to Govern Soluble and Insoluble Aggregate-formation in Monoclonal Antibodies. *Anal. Sci. Int. J. Jpn. Soc. Anal. Chem.* 31, 1233–1240. <https://doi.org/10.2116/analsci.31.1233>

Goodnow, C.C., Crosbie, J., Adelstein, S., Lavoie, T.B., Smith-Gill, S.J., Brink, R.A., Pritchard-Briscoe, H., Wotherspoon, J.S., Loblay, R.H., Raphael, K., Trent, R.J., Basten, A., 1988. Altered immunoglobulin expression and functional silencing of self-reactive B lymphocytes in transgenic mice. *Nature* 334, 676–682. <https://doi.org/10.1038/334676a0>

Gorbokon, N., Baltruschat, S., Lennartz, M., Luebke, A.M., Höflmayer, D., Kluth, M., Hübner, C., Hinsch, A., Fraune, C., Lebok, P., Bernreuther, C., Sauter, G., Marx, A.H., Simon, R., Krech, T., Clauditz, T.S., Jacobsen, F., Burandt, E., Steurer, S., Minner, S., 2024. PAX8 expression in cancerous and non-neoplastic tissue: a tissue microarray study on more than 17,000 tumors from 149 different tumor entities. *Virchows Arch.* 485, 491–507. <https://doi.org/10.1007/s00428-024-03872-y>

Gown, A.M., 2016. Diagnostic Immunohistochemistry: What Can Go Wrong and How to Prevent It. *Arch. Pathol. Lab. Med.* 140, 893–898. <https://doi.org/10.5858/arpa.2016-0119-RA>

Gown, A.M., 2004. Unmasking the Mysteries of Antigen or Epitope Retrieval and Formalin Fixation. *Am. J. Clin. Pathol.* 121, 172–174. <https://doi.org/10.1309/9G5FY3U3QB4R15DR>

Greenbaum, J.A., Andersen, P.H., Blythe, M., Bui, H., Cachau, R.E., Crowe, J., Davies, M., Kolaskar, A.S., Lund, O., Morrison, S., Mumey, B., Ofran, Y., Pellequer, J., Pinilla, C., Ponomarenko, J.V., Raghava, G.P.S., Van Regenmortel, M.H.V., Roggen, E.L., Sette, A., Schlessinger, A., Sollner, J., Zand, M., Peters, B., 2007. Towards a consensus on datasets and evaluation metrics for developing B-cell epitope prediction tools. *J. Mol. Recognit.* 20, 75–82. <https://doi.org/10.1002/jmr.815>

Großhans, S., Suhm, S., Hubbuch, J., 2019. Precipitation of complex antibody solutions: influence of contaminant composition and cell culture medium on the precipitation behavior. *Bioprocess Biosyst. Eng.* 42, 1039–1051. <https://doi.org/10.1007/s00449-019-02103-y>

Güven, E., Duus, K., Lydolph, M.C., Jørgensen, C.S., Laursen, I., Houen, G., 2014. Non-specific binding in solid phase immunoassays for autoantibodies correlates with inflammation markers. *J. Immunol. Methods* 403, 26–36. <https://doi.org/10.1016/j.jim.2013.11.014>

Hanack, K., Listek, M., Burkhard, M., 2019. Method for selecting hybridoma cells from a plurality of hybridoma cells using a bira expression vector. EP3766897A1.

Hayat, 2002. *Microscopy, Immunohistochemistry, and Antigen Retrieval Methods*. Kluwer Academic Publishers, Boston. <https://doi.org/10.1007/b112626>

Hehle, V.K., Paul, M.J., Roberts, V.A., Dolleweerd, C.J., Ma, J.K. -C., 2016. Site-targeted mutagenesis for stabilization of recombinant monoclonal antibody expressed in tobacco (*Nicotiana tabacum*) plants. *FASEB J.* 30, 1590–1598. <https://doi.org/10.1096/fj.15-283226>

Hernández-Jiménez, J., Martínez-Ortega, A., Salmerón-García, A., Cabeza, J., Prados, J.C., Ortiz, R., Navas, N., 2018. Study of aggregation in therapeutic monoclonal antibodies subjected to stress and long-term stability tests by analyzing size exclusion liquid chromatographic profiles. *Int. J. Biol. Macromol.* 118, 511–524. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.06.105>

Hewitt, S.M., 2011. *Quality assurance for design control and implementation of immunohistochemistry assays: approved guideline, 2nd ed.* ed. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA.

Hiltbold, E.M., Ciborowski, P., Finn, O.J., 1998. Naturally processed class II epitope from the tumor antigen MUC1 primes human CD4+ T cells. *Cancer Res.* 58, 5066–5070.

Hirsch-Kauffmann, M., Schweiger, M., 1992. *Biologie für Mediziner und Naturwissenschaftler: 66 Tabellen, 2., überarb. Aufl.* ed. Thieme, Stuttgart New York.

Irfan Maqsood, M., Matin, M.M., Bahrami, A.R., Ghasroldasht, M.M., 2013. Immortality of cell lines: challenges and advantages of establishment. *Cell Biol. Int.* 37, 1038–1045. <https://doi.org/10.1002/cbin.10137>

Ishii, Y., Imamoto, Y., Yamamoto, R., Tsukahara, M., Wakamatsu, K., 2015. Comparison of Antibody Molecules Produced from Two Cell Lines with Contrasting Productivities and Aggregate Contents. *Biol. Pharm. Bull.* 38, 306–316. <https://doi.org/10.1248/bpb.b14-00729>

Janardhan, K.S., Jensen, H., Clayton, N.P., Herbert, R.A., 2018. Immunohistochemistry in Investigative and Toxicologic Pathology. *Toxicol. Pathol.* 46, 488–510. <https://doi.org/10.1177/0192623318776907>

Kanai, K., Nunoya, T., Shibuya, K., Nakamura, T., Tajima, M., 1998. Variations in effectiveness of antigen retrieval pretreatments for diagnostic immunohistochemistry. *Res. Vet. Sci.* 64, 57–61. [https://doi.org/10.1016/s0034-5288\(98\)90116-3](https://doi.org/10.1016/s0034-5288(98)90116-3)

Karlsson, M., Sjöstedt, E., Oksvold, P., Sivertsson, Å., Huang, J., Álvez, M.B., Arif, M., Li, X., Lin, L., Yu, J., Ma, T., Xu, F., Han, P., Jiang, H., Mardinoglu, A., Zhang, C., von Feilitzen, K., Xu,

X., Wang, J., Yang, H., Bolund, L., Zhong, W., Fagerberg, L., Lindskog, C., Pontén, F., Mulder, J., Luo, Y., Uhlen, M., 2022. Genome-wide annotation of protein-coding genes in pig. *BMC Biol.* 20, 25. <https://doi.org/10.1186/s12915-022-01229-y>

Katzmann, J.A., Clark, R.J., Abraham, R.S., Bryant, S., Lymp, J.F., Bradwell, A.R., Kyle, R.A., 2002. Serum reference intervals and diagnostic ranges for free kappa and free lambda immunoglobulin light chains: relative sensitivity for detection of monoclonal light chains. *Clin. Chem.* 48, 1437–1444.

Kayser, V., Chennamsetty, N., Voynov, V., Helk, B., Forrer, K., Trout, B.L., 2011. Evaluation of a Non-Arrhenius Model for Therapeutic Monoclonal Antibody Aggregation. *J. Pharm. Sci.* 100, 2526–2542. <https://doi.org/10.1002/jps.22493>

Koenigsberg, A.L., Heldwein, E.E., 2018. The dynamic nature of the conserved tegument protein UL37 of herpesviruses. *J. Biol. Chem.* 293, 15827–15839. <https://doi.org/10.1074/jbc.RA118.004481>

Köhler, G., Milstein, C., 1975. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature* 256, 495–497. <https://doi.org/10.1038/256495a0>

Kolaskar, A.S., Tongaonkar, P.C., 1990. A semi-empirical method for prediction of antigenic determinants on protein antigens. *FEBS Lett.* 276, 172–174. [https://doi.org/10.1016/0014-5793\(90\)80535-Q](https://doi.org/10.1016/0014-5793(90)80535-Q)

Kondo, M., Weissman, I.L., Akashi, K., 1997. Identification of Clonogenic Common Lymphoid Progenitors in Mouse Bone Marrow. *Cell* 91, 661–672. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)80453-5](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)80453-5)

Kononen, J., Bubendorf, L., Kallionimeni, A., Bärklund, M., Schraml, P., Leighton, S., Torhorst, J., Mihatsch, M.J., Sauter, G., Kallionimeni, O.-P., 1998. Tissue microarrays for high-throughput molecular profiling of tumor specimens. *Nat. Med.* 4, 844–847. <https://doi.org/10.1038/nm0798-844>

Krenacs, L., Krenacs, T., Stelkovics, E., Raffeld, M., 2010. Heat-induced antigen retrieval for immunohistochemical reactions in routinely processed paraffin sections. *Methods Mol. Biol. Clifton NJ* 588, 103–119. [https://doi.org/10.1007/978-1-59745-324-0\\_14](https://doi.org/10.1007/978-1-59745-324-0_14)

Kromenaker, S.J., Srienc, F., 1994. Stability of Producer Hybridoma Cell Lines after Cell Sorting: A Case Study. *Biotechnol. Prog.* 10, 299–307. <https://doi.org/10.1021/bp00027a010>

Kubiak, R.J., Lee, N., Zhu, Y., Franch, W.R., Levitskaya, S.V., Krishnan, S.R., Abraham, V., Akufongwe, P.F., Larkin, C.J., White, W.I., 2016. Storage Conditions of Conjugated Reagents Can Impact Results of Immunogenicity Assays. *J. Immunol. Res.* 2016, 1–10. <https://doi.org/10.1155/2016/1485615>

Kukis, D.L., DeNardo, S.J., Mills, S.L., Shen, S., O'Donnell, R.T., DeNardo, G.L., 1999. Stability of Monoclonal Antibodies, Lym-1 and ChL6, and 2IT-BAD-Lym-1 Immunoconjugate with Ultra Freezer Storage. *Cancer Biother. Radiopharm.* 14, 363–369. <https://doi.org/10.1089/cbr.1999.14.363>

Kurosaki, T., 2002. Regulation of B-cell signal transduction by adaptor proteins. *Nat. Rev. Immunol.* 2, 354–363. <https://doi.org/10.1038/nri801>

Kuzman, D., Bunc, M., Ravnik, M., Reiter, F., Žagar, L., Bončina, M., 2021. Long-term stability predictions of therapeutic monoclonal antibodies in solution using Arrhenius-based kinetics. *Sci. Rep.* 11, 20534. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-99875-9>

Kyte, J., Doolittle, R.F., 1982. A simple method for displaying the hydropathic character of a protein. *J. Mol. Biol.* 157, 105–132. [https://doi.org/10.1016/0022-2836\(82\)90515-0](https://doi.org/10.1016/0022-2836(82)90515-0)

Lad, L., Clancy, S., Kovalenko, M., Liu, C., Hui, T., Smith, V., Pagratis, N., 2015. High-Throughput Kinetic Screening of Hybridomas to Identify High-Affinity Antibodies Using Bio-

Layer Interferometry. *SLAS Discov.* 20, 498–507.  
<https://doi.org/10.1177/1087057114560123>

Laptoš, T., Omersel, J., 2018. The importance of handling high-value biologicals: Physico-chemical instability and immunogenicity of monoclonal antibodies (Review). *Exp. Ther. Med.*  
<https://doi.org/10.3892/etm.2018.5821>

Lennartz, M., Löhr, N., Höflmayer, D., Dwertmann Rico, S., Von Bargen, C., Kind, S., Reiswich, V., Viehweger, F., Lutz, F., Bertram, V., Fraune, C., Gorbokon, N., Weidemann, S., Blessin, N.C., Hube-Magg, C., Menz, A., Schlichter, R., Krech, T., Hinsch, A., Burandt, E., Sauter, G., Simon, R., Kluth, M., Marx, A.H., Lebok, P., Dum, D., Minner, S., Jacobsen, F., Clauditz, T.S., Bernreuther, C., Steurer, S., 2024. TRPS1 is a Highly Sensitive Marker for Breast Cancer: A Tissue Microarray Study Evaluating More Than 19,000 Tumors From 152 Different Tumor Entities. *Am. J. Surg. Pathol.* 48, 637–651. <https://doi.org/10.1097/pas.0000000000002213>

Li, H., Chien, P.C., Tuen, M., Visciano, M.L., Cohen, S., Blais, S., Xu, C.-F., Zhang, H.-T., Hioe, C.E., 2008. Identification of an N-Linked Glycosylation in the C4 Region of HIV-1 Envelope gp120 That Is Critical for Recognition of Neighboring CD4 T Cell Epitopes. *J. Immunol.* 180, 4011–4021. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.180.6.4011>

Li, X., Bian, H., Yu, S., Xiao, W., Shen, J., Lan, C., Zhou, K., Huang, C., Wang, L., Du, D., Lin, Y., Tang, Y., 2018. A Rapid Method for Antigen-Specific Hybridoma Clone Isolation. *Anal. Chem.* 90, 2224–2229. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.7b04595>

Li, Y., Tian, Z., Xu, D., Wang, X., Wang, T., 2018. Construction strategies for developing expression vectors for recombinant monoclonal antibody production in CHO cells. *Mol. Biol. Rep.* 45, 2907–2912. <https://doi.org/10.1007/s11033-018-4351-0>

Liang, S., Zheng, D., Zhang, C., Zacharias, M., 2009. Prediction of antigenic epitopes on protein surfaces by consensus scoring. *BMC Bioinformatics* 10, 302.  
<https://doi.org/10.1186/1471-2105-10-302>

Lightwood, D.J., Carrington, B., Henry, A.J., McKnight, A.J., Crook, K., Cromie, K., Lawson, A.D.G., 2006. Antibody generation through B cell panning on antigen followed by in situ culture and direct RT-PCR on cells harvested en masse from antigen-positive wells. *J. Immunol. Methods* 316, 133–143. <https://doi.org/10.1016/j.jim.2006.08.010>

Livak, K.J., Schmittgen, T.D., 2001. Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ CT Method. *Methods* 25, 402–408.  
<https://doi.org/10.1006/meth.2001.1262>

Lopes-Ramos, C.M., Paulson, J.N., Chen, C.-Y., Kuijjer, M.L., Fagny, M., Platig, J., Sonawane, A.R., DeMeo, D.L., Quackenbush, J., Glass, K., 2017. Regulatory network changes between cell lines and their tissues of origin. *BMC Genomics* 18, 723. <https://doi.org/10.1186/s12864-017-4111-x>

Ma, H., Bell, K.N., Loker, R.N., 2021. qPCR and qRT-PCR analysis: Regulatory points to consider when conducting biodistribution and vector shedding studies. *Mol. Ther. - Methods Clin. Dev.* 20, 152–168. <https://doi.org/10.1016/j.omtm.2020.11.007>

Mahler, H.-C., Friess, W., Grauschopf, U., Kiese, S., 2009. Protein aggregation: pathways, induction factors and analysis. *J. Pharm. Sci.* 98, 2909–2934.  
<https://doi.org/10.1002/jps.21566>

Makałowski, W., Boguski, M.S., 1998. Evolutionary parameters of the transcribed mammalian genome: An analysis of 2,820 orthologous rodent and human sequences. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 95, 9407–9412. <https://doi.org/10.1073/pnas.95.16.9407>

Mann, C.J., 2007. Rapid isolation of antigen-specific clones from hybridoma fusions. *Nat. Methods* 4, i–ii. <https://doi.org/10.1038/nmeth1028>

Manning, M.C., Chou, D.K., Murphy, B.M., Payne, R.W., Katayama, D.S., 2010. Stability of protein pharmaceuticals: an update. *Pharm. Res.* 27, 544–575. <https://doi.org/10.1007/s11095-009-0045-6>

McCallum, M., De Marco, A., Lempp, F.A., Tortorici, M.A., Pinto, D., Walls, A.C., Beltramello, M., Chen, A., Liu, Z., Zatta, F., Zepeda, S., Di Iulio, J., Bowen, J.E., Montiel-Ruiz, M., Zhou, J., Rosen, L.E., Bianchi, S., Guarino, B., Fregni, C.S., Abdelnabi, R., Foo, S.-Y.C., Rothlauf, P.W., Bloyet, L.-M., Benigni, F., Cameroni, E., Neyts, J., Riva, A., Snell, G., Telenti, A., Whelan, S.P.J., Virgin, H.W., Corti, D., Pizzuto, M.S., Veasler, D., 2021. N-terminal domain antigenic mapping reveals a site of vulnerability for SARS-CoV-2. *Cell* 184, 2332–2347.e16. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2021.03.028>

McClatchy, D.B., Martínez-Bartolomé, S., Gao, Y., Lavallée-Adam, M., Yates, J.R., 2020. Quantitative analysis of global protein stability rates in tissues. *Sci. Rep.* 10, 15983. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-72410-y>

Meffre, E., Casellas, R., Nussenzweig, M.C., 2000. Antibody regulation of B cell development. *Nat. Immunol.* 1, 379–385. <https://doi.org/10.1038/80816>

Menz, A., Gorbokon, N., Viehweger, F., Lennartz, M., Hube-Magg, C., Hornsteiner, L., Kluth, M., Völkel, C., Luebke, A.M., Fraune, C., Uhlig, R., Minner, S., Dum, D., Höflmayer, D., Sauter, G., Simon, R., Burandt, E., Clauditz, T.S., Lebok, P., Jacobsen, F., Steurer, S., Krech, T., Marx, A.H., Bernreuther, C., 2023. Pan-keratin Immunostaining in Human Tumors: A Tissue Microarray Study of 15,940 Tumors. *Int. J. Surg. Pathol.* 31, 927–938. <https://doi.org/10.1177/10668969221117243>

Michaut, L., Laurent, N., Kentsch, K., Spindeldreher, S., Deckert-Salva, F., 2014. Stability of Anti-Immunotherapeutic Antibodies in Frozen Human Serum Samples. *Bioanalysis* 6, 1395–1407. <https://doi.org/10.4155/bio.14.97>

Miettinen, M., 1989. Immunostaining of intermediate filament proteins in paraffin sections. Evaluation of optimal protease treatment to improve the immunoreactivity. *Pathol. Res. Pract.* 184, 431–436. [https://doi.org/10.1016/S0344-0338\(89\)80039-1](https://doi.org/10.1016/S0344-0338(89)80039-1)

Miller, M.A., Ramos-Vara, J.A., Kleiboeker, S.B., Larson, R.L., 2005. Effects of Delayed or Prolonged Fixation on Immunohistochemical Detection of Bovine Viral Diarrhea Virus Type 1 in Skin of Two Persistently Infected Calves. *J. Vet. Diagn. Invest.* 17, 461–463. <https://doi.org/10.1177/104063870501700509>

Mirlacher, M., Simon, R., 2010. Recipient Block TMA Technique, in: Simon, R. (Ed.), *Tissue Microarrays, Methods in Molecular Biology*. Humana Press, Totowa, NJ, pp. 37–44. [https://doi.org/10.1007/978-1-60761-806-5\\_4](https://doi.org/10.1007/978-1-60761-806-5_4)

Mitra, S., Tomar, P.C., 2021. Hybridoma technology; advancements, clinical significance, and future aspects. *J. Genet. Eng. Biotechnol.* 19, 159. <https://doi.org/10.1186/s43141-021-00264-6>

Monroe, J.G., 2004. Ligand-independent tonic signaling in B-cell receptor function. *Curr. Opin. Immunol.* 16, 288–295. <https://doi.org/10.1016/j.coi.2004.03.010>

Morgan, J.M., Navabi, H., Schmid, K.W., Jasani, B., 1994. Possible role of tissue-bound calcium ions in citrate-mediated high-temperature antigen retrieval. *J. Pathol.* 174, 301–307. <https://doi.org/10.1002/path.1711740410>

Mouse Genome Sequencing Consortium, 2002. Initial sequencing and comparative analysis of the mouse genome. *Nature* 420, 520–562. <https://doi.org/10.1038/nature01262>

Murphy, K., Weaver, C., 2018. *Janeway Immunologie*. Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg. <https://doi.org/10.1007/978-3-662-56004-4>

Nakanishi, K., Sakiyama, T., Imamura, K., 2001. On the adsorption of proteins on solid surfaces, a common but very complicated phenomenon. *J. Biosci. Bioeng.* 91, 233–244. <https://doi.org/10.1263/jbb.91.233>

Nelson, P.N., 2000. Demystified ...: Monoclonal antibodies. *Mol. Pathol.* 53, 111–117. <https://doi.org/10.1136/mp.53.3.111>

Neuberger, M.S., Milstein, C., 1995. Somatic hypermutation. *Curr. Opin. Immunol.* 7, 248–254. [https://doi.org/10.1016/0952-7915\(95\)80010-7](https://doi.org/10.1016/0952-7915(95)80010-7)

Nokwe, C.N., Zacharias, M., Yagi, H., Hora, M., Reif, B., Goto, Y., Buchner, J., 2014. A Residue-specific Shift in Stability and Amyloidogenicity of Antibody Variable Domains. *J. Biol. Chem.* 289, 26829–26846. <https://doi.org/10.1074/jbc.M114.582247>

Odorico, M., Pellequer, J., 2003. BEPITOPE: predicting the location of continuous epitopes and patterns in proteins. *J. Mol. Recognit.* 16, 20–22. <https://doi.org/10.1002/jmr.602>

Ó'Fágáin, C., Colliton, K., 2017. Storage and Lyophilization of Pure Proteins, in: Walls, D., Loughran, S.T. (Eds.), *Protein Chromatography, Methods in Molecular Biology*. Springer New York, New York, NY, pp. 159–190. [https://doi.org/10.1007/978-1-4939-6412-3\\_9](https://doi.org/10.1007/978-1-4939-6412-3_9)

Ollila, J., Vihinen, M., 2005. B cells. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 37, 518–523. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2004.09.007>

Ordóñez, N.G., Manning, J.T., Brooks, T.E., 1988. Effect of trypsinization on the immunostaining of formalin-fixed, paraffin-embedded tissues. *Am. J. Surg. Pathol.* 12, 121–129. <https://doi.org/10.1097/00000478-198802000-00005>

Ornstein, D.K., Gillespie, J.W., Paweletz, C.P., Duray, P.H., Herring, J., Vocke, C.D., Topalian, S.L., Bostwick, D.G., Linehan, W.M., Petricoin, E.F., Emmert-Buck, M.R., 2000. Proteomic analysis of laser capture microdissected human prostate cancer and in vitro prostate cell lines. *Electrophoresis* 21, 2235–2242. [https://doi.org/10.1002/1522-2683\(20000601\)21:11<2235::AID-ELPS2235>3.0.CO;2-A](https://doi.org/10.1002/1522-2683(20000601)21:11<2235::AID-ELPS2235>3.0.CO;2-A)

Paborji, M., Pochopin, N.L., Coppola, W.P., Bogardus, J.B., 1994. Chemical and physical stability of chimeric L6, a mouse–human monoclonal antibody. *Pharm. Res.* 11, 764–771. <https://doi.org/10.1023/A:1018948901599>

Pandit, S., Kundu, S., Aswal, V.K., 2022. Interaction among bovine serum albumin (BSA) molecules in the presence of anions: a small-angle neutron scattering study. *J. Biol. Phys.* 48, 237–251. <https://doi.org/10.1007/s10867-022-09608-w>

Park, J., Nagapudi, K., Vergara, C., Ramachander, R., Laurence, J.S., Krishnan, S., 2013. Effect of pH and Excipients on Structure, Dynamics, and Long-Term Stability of a Model IgG1 Monoclonal Antibody upon Freeze-Drying. *Pharm. Res.* 30, 968–984. <https://doi.org/10.1007/s11095-012-0933-z>

Parray, H.A., Shukla, S., Samal, S., Shrivastava, T., Ahmed, S., Sharma, C., Kumar, R., 2020. Hybridoma technology a versatile method for isolation of monoclonal antibodies, its applicability across species, limitations, advancement and future perspectives. *Int. Immunopharmacol.* 85, 106639. <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2020.106639>

Pellequer, J.-L., Westhof, E., Van Regenmortel, M.H.V., 1993. Correlation between the location of antigenic sites and the prediction of turns in proteins. *Immunol. Lett.* 36, 83–99. [https://doi.org/10.1016/0165-2478\(93\)90072-A](https://doi.org/10.1016/0165-2478(93)90072-A)

Peters, Johann Hinrich, Baumgarten, H., Peters, Johann H. (Eds.), 1990. *Monoklonale Antikörper: Herstellung und Charakterisierung*, 2., überarb. und erw. Aufl. ed. Springer, Berlin Heidelberg.

Pileri, S.A., Roncador, G., Ceccarelli, C., Piccioli, M., Briskomatis, A., Sabattini, E., Ascani, S., Santini, D., Piccaluga, P.P., Leone, O., Damiani, S., Ercolessi, C., Sandri, F., Pieri, F., Leoncini, L., Falini, B., 1997. Antigen retrieval techniques in immunohistochemistry: comparison of

different methods. *J. Pathol.* 183, 116–123. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1096-9896\(199709\)183:1<116::AID-PATH1087>3.0.CO;2-2](https://doi.org/10.1002/(SICI)1096-9896(199709)183:1<116::AID-PATH1087>3.0.CO;2-2)

Pinkus, G.S., O'Connor, E.M., Etheridge, C.L., Corson, J.M., 1985. Optimal immunoreactivity of keratin proteins in formalin-fixed, paraffin-embedded tissue requires preliminary trypsinization. An immunoperoxidase study of various tumours using polyclonal and monoclonal antibodies. *J. Histochem. Cytochem. Off. J. Histochem. Soc.* 33, 465–473. <https://doi.org/10.1177/33.5.2580883>

Pogson, M., Parola, C., Kelton, W.J., Heuberger, P., Reddy, S.T., 2016. Immunogenomic engineering of a plug-and-(dis)play hybridoma platform. *Nat. Commun.* 7, 12535. <https://doi.org/10.1038/ncomms12535>

Ponomarenko, J.V., Bourne, P.E., 2007. Antibody-protein interactions: benchmark datasets and prediction tools evaluation. *BMC Struct. Biol.* 7, 64. <https://doi.org/10.1186/1472-6807-7-64>

Pontén, F., Gry, M., Fagerberg, L., Lundberg, E., Asplund, A., Berglund, L., Oksvold, P., Björling, E., Hober, S., Kampf, C., Navani, S., Nilsson, P., Ottosson, J., Persson, A., Wernérus, H., Wester, K., Uhlén, M., 2009. A global view of protein expression in human cells, tissues, and organs. *Mol. Syst. Biol.* 5, 337. <https://doi.org/10.1038/msb.2009.93>

Ramos-Vara, J.A., 2005. Technical Aspects of Immunohistochemistry. *Vet. Pathol.* 42, 405–426. <https://doi.org/10.1354/vp.42-4-405>

Ramos-Vara, J.A., Miller, M.A., 2014. When Tissue Antigens and Antibodies Get Along: Revisiting the Technical Aspects of Immunohistochemistry—The Red, Brown, and Blue Technique. *Vet. Pathol.* 51, 42–87. <https://doi.org/10.1177/0300985813505879>

Rawal, K., Sinha, R., Abbasi, B.A., Chaudhary, A., Nath, S.K., Kumari, P., Preeti, P., Saraf, D., Singh, S., Mishra, K., Gupta, P., Mishra, A., Sharma, T., Gupta, S., Singh, P., Sood, S., Subramani, P., Dubey, A.K., Strych, U., Hotez, P.J., Bottazzi, M.E., 2021. Identification of vaccine targets in pathogens and design of a vaccine using computational approaches. *Sci. Rep.* 11, 17626. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-96863-x>

Riedel, S., 2005. Edward Jenner and the history of smallpox and vaccination. *Proc. Bayl. Univ. Med. Cent.* 18, 21–25. <https://doi.org/10.1080/08998280.2005.11928028>

Rimm, D., Schalper, K., Pusztai, L., 2014. Unvalidated antibodies and misleading results. *Breast Cancer Res. Treat.* 147, 457–458. <https://doi.org/10.1007/s10549-014-3061-0>

Roohi, A., 2006. Differential reactivity of mouse monoclonal anti-HBs antibodies with recombinant mutant HBs antigens. *World J. Gastroenterol.* 12, 5368. <https://doi.org/10.3748/wjg.v12.i33.5368>

Saha, S., Raghava, G.P.S., 2004. BcePred: Prediction of Continuous B-Cell Epitopes in Antigenic Sequences Using Physico-chemical Properties, in: Nicosia, G., Cutello, V., Bentley, P.J., Timmis, J. (Eds.), *Artificial Immune Systems, Lecture Notes in Computer Science*. Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, pp. 197–204. [https://doi.org/10.1007/978-3-540-30220-9\\_16](https://doi.org/10.1007/978-3-540-30220-9_16)

Sakaguchi, A., Nakajima, C., Sawano, A., Tanaka, Y., Kurihara, Y., 2021. Rapid and reliable hybridoma screening method that is suitable for production of functional structure-recognizing monoclonal antibody. *J. Biosci. Bioeng.* 131, 696–702. <https://doi.org/10.1016/j.jbiosc.2021.02.006>

Sanchez-Trincado, J.L., Gomez-Perosanz, M., Reche, P.A., 2017. Fundamentals and Methods for T- and B-Cell Epitope Prediction. *J. Immunol. Res.* 2017, 1–14. <https://doi.org/10.1155/2017/2680160>

Schatz, D.G., Ji, Y., 2011. Recombination centres and the orchestration of V(D)J recombination. *Nat. Rev. Immunol.* 11, 251–263. <https://doi.org/10.1038/nri2941>



Seita, J., Weissman, I.L., 2010. Hematopoietic stem cell: self-renewal versus differentiation. *Wiley Interdiscip. Rev. Syst. Biol. Med.* 2, 640–653. <https://doi.org/10.1002/wsbm.86>

Shi, S.-R., Cote, R.J., Taylor, C.R., 1997. Antigen Retrieval Immunohistochemistry: Past, Present, and Future. *J. Histochem. Cytochem.* 45, 327–343. <https://doi.org/10.1177/002215549704500301>

Shi, S.R., Key, M.E., Kalra, K.L., 1991. Antigen retrieval in formalin-fixed, paraffin-embedded tissues: an enhancement method for immunohistochemical staining based on microwave oven heating of tissue sections. *J. Histochem. Cytochem. Off. J. Histochem. Soc.* 39, 741–748. <https://doi.org/10.1177/39.6.1709656>

Sigma Aldrich, 2009. ProClin Preservatives: Mechanisms and Stability for Diagnostic Reagents [WWW Document]. ProClin Preserv. URL <https://idoc.pub/documents/proclin-preservatives-mechanisms-and-stability-for-diagnostic-reagents-od4p7md7594p> (accessed 7.12.24).

Simm, S., Einloft, J., Mirus, O., Schleiff, E., 2016. 50 years of amino acid hydrophobicity scales: revisiting the capacity for peptide classification. *Biol. Res.* 49, 31. <https://doi.org/10.1186/s40659-016-0092-5>

Smeland, E., Funderud, S., Ruud, E., Blomhoff, H.K., Godal, T., 1985. Characterization of Two Murine Monoclonal Antibodies Reactive with Human B Cells: Their Use in a High-Yield, High-Purity Method for Isolation of B Cells and Utilization of Such Cells in an Assay for B-Cell Stimulating Factor. *Scand. J. Immunol.* 21, 205–214. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3083.1985.tb01422.x>

Smith-Gill, S.J., 1994. Protein epitopes: Functional vs. structural definitions. *Res. Immunol.* 145, 67–70. [https://doi.org/10.1016/S0923-2494\(94\)80047-2](https://doi.org/10.1016/S0923-2494(94)80047-2)

Sompuram, S.R., Vani, K., Bogen, S.A., 2006. A molecular model of antigen retrieval using a peptide array. *Am. J. Clin. Pathol.* 125, 91–98.

Somuncu, B., Keskin, S., Antmen, F.M., Saglican, Y., Ekmekcioglu, A., Ertuzun, T., Tuna, M.B., Obek, C., Wilson, D.M., Ince, U., Kural, A.R., Muftuoglu, M., 2020. Non-muscle invasive bladder cancer tissues have increased base excision repair capacity. *Sci. Rep.* 10, 16371. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-73370-z>

Starr, T.N., Czudnochowski, N., Liu, Z., Zatta, F., Park, Y.-J., Addetia, A., Pinto, D., Beltramello, M., Hernandez, P., Greaney, A.J., Marzi, R., Glass, W.G., Zhang, I., Dingens, A.S., Bowen, J.E., Tortorici, M.A., Walls, A.C., Wojcechowskyj, J.A., De Marco, A., Rosen, L.E., Zhou, J., Montiel-Ruiz, M., Kaiser, H., Dillen, J.R., Tucker, H., Bassi, J., Silacci-Fregni, C., Housley, M.P., Di Iulio, J., Lombardo, G., Agostini, M., Sprugasci, N., Culap, K., Jaconi, S., Meury, M., Dellota Jr, E., Abdelnabi, R., Foo, S.-Y.C., Cameroni, E., Stumpf, S., Croll, T.I., Nix, J.C., Havenar-Daughton, C., Piccoli, L., Benigni, F., Neyts, J., Telenti, A., Lempp, F.A., Pizzuto, M.S., Chodera, J.D., Hebner, C.M., Virgin, H.W., Whelan, S.P.J., Veessler, D., Corti, D., Bloom, J.D., Snell, G., 2021. SARS-CoV-2 RBD antibodies that maximize breadth and resistance to escape. *Nature* 597, 97–102. <https://doi.org/10.1038/s41586-021-03807-6>

Stern, L.J., Wiley, D.C., 1994. Antigenic peptide binding by class I and class II histocompatibility proteins. *Structure* 2, 245–251. [https://doi.org/10.1016/S0969-2126\(00\)00026-5](https://doi.org/10.1016/S0969-2126(00)00026-5)

Sturgeon, C.M., Viljoen, A., 2011. Analytical error and interference in immunoassay: minimizing risk. *Ann. Clin. Biochem. Int. J. Lab. Med.* 48, 418–432. <https://doi.org/10.1258/acb.2011.011073>

Subramanian, N., Chinnappan, S., 2013. Prediction of promiscuous epitopes in the e6 protein of three high risk human papilloma viruses: a computational approach. *Asian Pac. J. Cancer Prev. APJCP* 14, 4167–4175. <https://doi.org/10.7314/apjcp.2013.14.7.4167>

Sule, R., Rivera, G., Gomes, A.V., 2023. Western Blotting (immunoblotting): History, Theory, Uses, Protocol and Problems. *BioTechniques* 75, 99–114. <https://doi.org/10.2144/btn-2022-0034>

Sun, Z., Lu, S., Yang, Z., Li, J., Zhang, M., 2017. Isolation and characterization of an HIV-1 envelope glycoprotein-specific B-cell from an immortalized human naïve B-cell library. *J. Gen. Virol.* 98, 791–798. <https://doi.org/10.1099/jgv.0.000706>

Tadros, D.M., Eggenschwiler, S., Racle, J., Gfeller, D., 2023. The MHC Motif Atlas: a database of MHC binding specificities and ligands. *Nucleic Acids Res.* 51, D428–D437. <https://doi.org/10.1093/nar/gkac965>

Tavakoli-Keshe, R., Phillips, J.J., Turner, R., Bracewell, D.G., 2014. Understanding the relationship between biotherapeutic protein stability and solid-liquid interfacial shear in constant region mutants of IgG1 and IgG4. *J. Pharm. Sci.* 103, 437–444. <https://doi.org/10.1002/jps.23822>

Temming, A.R., Bentlage, A.E.H., De Taeye, S.W., Bosman, G.P., Lissenberg-Thunnissen, S.N., Derksen, N.I.L., Brasser, G., Mok, J.Y., Van Esch, W.J.E., Howie, H.L., Zimring, J.C., Vidarsson, G., 2020. Cross-reactivity of mouse IgG subclasses to human Fc gamma receptors: Antibody deglycosylation only eliminates IgG2b binding. *Mol. Immunol.* 127, 79–86. <https://doi.org/10.1016/j.molimm.2020.08.015>

Thakral, S., Sonje, J., Munjal, B., Suryanarayanan, R., 2021. Stabilizers and their interaction with formulation components in frozen and freeze-dried protein formulations. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 173, 1–19. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2021.03.003>

Thaysen-Andersen, M., Packer, N.H., 2012. Site-specific glycoproteomics confirms that protein structure dictates formation of N-glycan type, core fucosylation and branching. *Glycobiology* 22, 1440–1452. <https://doi.org/10.1093/glycob/cws110>

Thomas, C.R., Geer, D., 2011. Effects of shear on proteins in solution. *Biotechnol. Lett.* 33, 443–456. <https://doi.org/10.1007/s10529-010-0469-4>

Torhorst, J., Bucher, C., Kononen, J., Haas, P., Zuber, M., Köchli, O.R., Mross, F., Dieterich, H., Moch, H., Mihatsch, M., Kallioniemi, O.-P., Sauter, G., 2001. Tissue Microarrays for Rapid Linking of Molecular Changes to Clinical Endpoints. *Am. J. Pathol.* 159, 2249–2256. [https://doi.org/10.1016/S0002-9440\(10\)63075-1](https://doi.org/10.1016/S0002-9440(10)63075-1)

Traggiai, E., Becker, S., Subbarao, K., Kolesnikova, L., Uematsu, Y., Gismondo, M.R., Murphy, B.R., Rappuoli, R., Lanzavecchia, A., 2004. An efficient method to make human monoclonal antibodies from memory B cells: potent neutralization of SARS coronavirus. *Nat. Med.* 10, 871–875. <https://doi.org/10.1038/nm1080>

Traul, K.A., Driedger, A., Ingle, D.L., Nakhasi, D., 2000. Review of the toxicologic properties of medium-chain triglycerides. *Food Chem. Toxicol.* 38, 79–98. [https://doi.org/10.1016/S0278-6915\(99\)00106-4](https://doi.org/10.1016/S0278-6915(99)00106-4)

Trier, N., Hansen, P., Houen, G., 2019. Peptides, Antibodies, Peptide Antibodies and More. *Int. J. Mol. Sci.* 20, 6289. <https://doi.org/10.3390/ijms20246289>

Uhlen, M., Bandrowski, A., Carr, S., Edwards, A., Ellenberg, J., Lundberg, E., Rimm, D.L., Rodriguez, H., Hiltke, T., Snyder, M., Yamamoto, T., 2016. A proposal for validation of antibodies. *Nat. Methods* 13, 823–827. <https://doi.org/10.1038/nmeth.3995>

Uhlen, M., Fagerberg, L., Hallstrom, B., 2025a. RNA-Expression levels of CD56 in Cell lines. *Hum. Protein Atlas*.

Uhlen, M., Fagerberg, L., Hallstrom, B., 2025b. RNA-Expression levels of CD163 in Cell lines. *Hum. Protein Atlas*.

Uhlen, M., Fagerberg, L., Hallstrom, B., 2025c. RNA-Expression levels of CDH16 in Cell lines. *Hum. Protein Atlas*.

Uhlen, M., Fagerberg, L., Hallstrom, B., 2025d. RNA-Expression levels of CEA in Cell lines. Hum. Protein Atlas.

Uhlen, M., Fagerberg, L., Hallstrom, B., 2025e. RNA-Expression levels of DOG-1 in Cell lines. Hum. Protein Atlas.

Uhlen, M., Fagerberg, L., Hallstrom, B., 2025f. RNA-Expression levels of EpCAM in Cell lines. Hum. Protein Atlas.

Uhlen, M., Fagerberg, L., Hallstrom, B., 2025g. RNA-Expression levels of GATA-3 in Cell lines. Hum. Protein Atlas.

Uhlen, M., Fagerberg, L., Hallstrom, B., 2025h. RNA-Expression levels of Her2 in Cell lines. Hum. Protein Atlas.

Uhlen, M., Fagerberg, L., Hallstrom, B., 2025i. RNA-Expression levels of Inhibin A in Cell lines. Hum. Protein Atlas.

Uhlen, M., Fagerberg, L., Hallstrom, B., 2025j. RNA-Expression levels of KLK7 in Cell lines. Hum. Protein Atlas.

Uhlen, M., Fagerberg, L., Hallstrom, B., 2025k. RNA-Expression levels of Napsin A in Cell lines. Hum. Protein Atlas.

Uhlen, M., Fagerberg, L., Hallstrom, B., 2025l. RNA-Expression levels of P16 in Cell lines. Hum. Protein Atlas.

Uhlen, M., Fagerberg, L., Hallstrom, B., 2025m. RNA-Expression levels of pgp9.5 in Cell lines. Hum. Protein Atlas.

Van Alstine, W.G., Popielarczyk, M., Albregts, S.R., 2002. Effect of Formalin Fixation on the Immunohistochemical Detection of PRRS Virus Antigen in Experimentally and Naturally Infected Pigs. *J. Vet. Diagn. Invest.* 14, 504–507.  
<https://doi.org/10.1177/104063870201400611>

Vettermann, C., Schlissel, M.S., 2010. Allelic exclusion of immunoglobulin genes: models and mechanisms. *Immunol. Rev.* 237, 22–42. <https://doi.org/10.1111/j.1600-065X.2010.00935.x>

Walls, D., Loughran, S.T. (Eds.), 2017. *Protein Chromatography: Methods and Protocols*, Methods in Molecular Biology. Springer New York, New York, NY.  
<https://doi.org/10.1007/978-1-4939-6412-3>

Wang, J.-Y. (Ed.), 2020. *B Cells in Immunity and Tolerance*, Advances in Experimental Medicine and Biology. Springer Singapore, Singapore. <https://doi.org/10.1007/978-981-15-3532-1>

Wang, W., Roberts, C.J., 2013. Non-Arrhenius Protein Aggregation. *AAPS J.* 15, 840–851.  
<https://doi.org/10.1208/s12248-013-9485-3>

Waterman, K.C., 2011. The Application of the Accelerated Stability Assessment Program (ASAP) to Quality by Design (QbD) for Drug Product Stability. *AAPS PharmSciTech* 12, 932.  
<https://doi.org/10.1208/s12249-011-9657-3>

Waterman, K.C., Swanson, J.T., Lippold, B.L., 2014. A Scientific and Statistical Analysis of Accelerated Aging for Pharmaceuticals. Part 1: Accuracy of Fitting Methods. *J. Pharm. Sci.* 103, 3000–3006. <https://doi.org/10.1002/jps.24075>

Westhof, E., Altschuh, D., Moras, D., Bloomer, A.C., Mondragon, A., Klug, A., Van Regenmortel, M.H.V., 1984. Correlation between segmental mobility and the location of antigenic determinants in proteins. *Nature* 311, 123–126. <https://doi.org/10.1038/311123a0>

Wiedorn, K.H., Goldmann, T., Henne, C., Kühl, H., Vollmer, E., 2001. EnVision+, a new dextran polymer-based signal enhancement technique for in situ hybridization (ISH). *J. Histochem. Cytochem. Off. J. Histochem. Soc.* 49, 1067–1071.  
<https://doi.org/10.1177/002215540104900901>

- Wysocki, L.J., Sato, V.L., 1978. "Panning" for lymphocytes: a method for cell selection. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 75, 2844–2848. <https://doi.org/10.1073/pnas.75.6.2844>
- Yu, X., McGraw, P.A., House, F.S., Crowe, J.E., 2008. An optimized electrofusion-based protocol for generating virus-specific human monoclonal antibodies. *J. Immunol. Methods* 336, 142–151. <https://doi.org/10.1016/j.jim.2008.04.008>
- Zidar, M., Posnjak, G., Muševič, I., Ravnik, M., Kuzman, D., 2020. Surfaces Affect Screening Reliability in Formulation Development of Biologics. *Pharm. Res.* 37, 27. <https://doi.org/10.1007/s11095-019-2733-1>
- Zimmermann, J., Hajibabaei, M., Blackburn, D.C., Hanken, J., Cantin, E., Posfai, J., Evans, T.C., 2008. DNA damage in preserved specimens and tissue samples: a molecular assessment. *Front. Zool.* 5, 18. <https://doi.org/10.1186/1742-9994-5-18>

## 7. Abbildungsverzeichnis

|                                                                                                                                                                                                                           |    |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Abbildung 1:</b> Schematische Darstellung des Aufbaus eines IgG-Antikörpers (adaptiert nach Ramos-Vara et al., 2005) .....                                                                                             | 11 |
| <b>Abbildung 2:</b> Effekt des HAT-Selektionsmediums auf die verschiedenen vorliegenden Zellen nach der Fusionierung:.....                                                                                                | 15 |
| <b>Abbildung 3:</b> Vergleich der Nachweismethoden in der Immunhistochemie: .....                                                                                                                                         | 19 |
| <b>Abbildung 4:</b> Beispielhafte Skalierung der Färbeintensitäten der IHC-Färbungen .....                                                                                                                                | 54 |
| <b>Abbildung 5:</b> Darstellung der Lage der für die Immunisierung verwendeten Peptide in Relation zur Lage anderer kommerziell verfügbaren Antikörper in der Aminosäuresequenz des PRSS2-Proteins.....                   | 65 |
| <b>Abbildung 6:</b> Darstellung der Lage der einzelnen Peptidsequenzen (untere Zeile) im PRSS2-Protein. ....                                                                                                              | 68 |
| <b>Abbildung 7:</b> Identität der ausgewählten und möglichen Peptidsequenzen mit murinen Proteinen.....                                                                                                                   | 69 |
| <b>Abbildung 8:</b> Darstellung der ermittelten ELISA-Werte für jeden Antikörper-Klon im 1. Und 2. ELISA für jede Peptidsequenz für das Protein PRSS2. ....                                                               | 70 |
| <b>Abbildung 9:</b> Darstellung der Gewinnerpeptide und ELISA-Werte der Hybridoma-Klone für das Zielprotein MDM2.....                                                                                                     | 72 |
| <b>Abbildung 10:</b> Darstellung der Gewinnerpeptide und ELISA-Werte der Hybridoma-Klone für das Zielprotein PRSS1. ....                                                                                                  | 73 |
| <b>Abbildung 11:</b> Darstellung der Gewinnerpeptide und ELISA-Werte der Hybridoma-Klone für das Zielprotein PRSS3. ....                                                                                                  | 74 |
| <b>Abbildung 12:</b> Darstellung aller ELISA-Werte aus 1. ELISA und Peptid-spezifischem ELISA für alle Immunisierungspeptide verwendet für MDM2. ....                                                                     | 75 |
| <b>Abbildung 13:</b> Darstellung aller ELISA-Werte aus 1. Elisa und Peptid-spezifischem ELISA für alle verwendeten Immunisierungspeptide für PRSS3.....                                                                   | 76 |
| <b>Abbildung 14:</b> relative Färbeintensität von GATA3 desselben Spots bei Zugabe unterschiedlicher Konzentrationen BSA in kommerziellem Puffer im Vergleich zu selbst erstelltem PBST- bzw. TBST-basiertem Puffer. .... | 87 |
| <b>Abbildung 15:</b> relative Färbeintensität von SATB2 desselben Spots bei Zugabe unterschiedlicher Konzentrationen BSA in kommerziellem Puffer im Vergleich zu selbst erstelltem PBST- bzw. TBST-basiertem Puffer. .... | 87 |
| <b>Abbildung 16:</b> relative Färbeintensität von SATB2 desselben Spots bei Zugabe unterschiedlicher Konzentrationen BSA zum selbst erstellten PBST- bzw. TBST-basierten Puffern.....                                     | 88 |
| <b>Abbildung 17:</b> relative Färbeintensität von SATB2 desselben Spots bei Zugabe unterschiedlicher Konzentrationen BSA und Ziegen Serum in TBST- basiertem Puffer. ....                                                 | 89 |
| <b>Abbildung 18:</b> relative Färbeintensität von CPA1 desselben Spots bei Zugabe unterschiedlicher Konzentrationen fötalem Kälberserum (FCS) in PBST- und TBST- basiertem Puffer. ....                                   | 90 |
| <b>Abbildung 19:</b> relative Färbeintensität von SATB2 desselben Spots bei Zugabe unterschiedlicher Konzentrationen fötalem Kälberserum (FCS) in PBST- und TBST- basiertem Puffer.....                                   | 91 |
| <b>Abbildung 20:</b> relative Färbeintensität von SATB2 desselben Spots bei Zugabe unterschiedlicher Mengen eines weiteren IgG-Antikörpers zu TBST- basiertem Puffer.....                                                 | 92 |

|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                |     |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| <b>Abbildung 21:</b> relative Färbeintensität von SATB2 desselben Spots bei Zugabe unterschiedlicher Mengen Caprylsäure und BSA bzw. fötales Kälberserum zu PBST- bzw. TBST- basiertem Puffer.....                                                                                                                             | 93  |
| <b>Abbildung 22:</b> relative Färbeintensität von CPA1 desselben Spots bei Zugabe unterschiedlicher Mengen Trehalose zu TBST- basiertem Puffer.....                                                                                                                                                                            | 94  |
| <b>Abbildung 23:</b> relative Färbeintensität von SATB2 desselben Spots bei Zugabe unterschiedlicher Mengen Trehalose zu TBST- basiertem Puffer.....                                                                                                                                                                           | 94  |
| <b>Abbildung 24:</b> relative Färbeintensität von CPA1 (Pankreasgewebe) und SATB2 (Colongewebe) desselben Spots bei Färbungen mit unterschiedlichen Puffern.....                                                                                                                                                               | 95  |
| <b>Abbildung 25:</b> relative Färbeintensität von CPA1 desselben Spots aus dem Pankreasgewebe im zeitlichen Verlauf übe 24 Monate.....                                                                                                                                                                                         | 96  |
| <b>Abbildung 26:</b> exemplarische Darstellung von gefärbtem Pankreasgewebe mit CPA-1 zu verschiedenen Zeitpunkten.....                                                                                                                                                                                                        | 97  |
| <b>Abbildung 27:</b> relative Färbeintensität von SATB2 desselben Spots aus dem Colongewebe im zeitlichen Verlauf übe 24 Monate.....                                                                                                                                                                                           | 98  |
| <b>Abbildung 28:</b> exemplarische Darstellung von gefärbtem Colongewebe mit SATB-2 zu verschiedenen Zeitpunkten.....                                                                                                                                                                                                          | 99  |
| <b>Abbildung 29:</b> Färbungen von Mammagewebe mittels eines Antikörpers gegen GATA3....                                                                                                                                                                                                                                       | 100 |
| <b>Abbildung 30:</b> Färbungen von Pankreasgewebe mittels eines Antikörpers gegen CELA3B..                                                                                                                                                                                                                                     | 101 |
| <b>Abbildung 31:</b> Färbungen von Nierengewebe mittels eines Antikörpers gegen CDH16. ....                                                                                                                                                                                                                                    | 101 |
| <b>Abbildung 32:</b> Färbungen von Tonsillengewebe mittels eines Antikörpers gegen MSH2. ...                                                                                                                                                                                                                                   | 102 |
| <b>Abbildung 33:</b> Färbungen des Gewebes eines Adenokarzinoms des Colons mittels eines Antikörpers gegen PD-L1.....                                                                                                                                                                                                          | 102 |
| <b>Abbildung 34:</b> Anteil der Antikörper, die im humanen Testgewebe eine Bande richtiger Größe zeigten. ....                                                                                                                                                                                                                 | 107 |
| <b>Abbildung 35:</b> Beispiele für Antikörper, die eine einzige Bande von erwarteter Größe zeigten: Antikörper Cytokeratin 19, pgp9.5 und CELA3B. ....                                                                                                                                                                         | 108 |
| <b>Abbildung 36:</b> Beispiele für Antikörper, die neben der Bande von erwarteter Größe noch eine weitere Bande zeigten: Antikörper KLK7 und CD45.....                                                                                                                                                                         | 110 |
| <b>Abbildung 37:</b> Beispiele für Antikörper, die neben der Bande von erwarteter Größe noch zwei bis drei weitere Banden zeigten: Antikörper Nucleolin und MCM-3. ....                                                                                                                                                        | 111 |
| <b>Abbildung 38:</b> Beispiele für Antikörper, die neben der Bande von erwarteter Größe noch mindestens vier weitere Banden zeigten: Antikörper PLAP und CD274. ....                                                                                                                                                           | 112 |
| <b>Abbildung 39:</b> Anteil der Antikörper, die im humanen Testgewebe eine Bande richtiger Größe sowie weitere Banden zeigten. ....                                                                                                                                                                                            | 113 |
| <b>Abbildung 40:</b> Anteil der Antikörper, die in humanen Zelllinien eine Bande richtiger Größe zeigten. ....                                                                                                                                                                                                                 | 114 |
| <b>Abbildung 41:</b> Beispiele für Antikörper, die eine einzige Bande von erwarteter Größe zeigten: .....                                                                                                                                                                                                                      | 115 |
| <b>Abbildung 42:</b> Antikörper CD3e, MSH6 und EpCAM, welche in ausgewählten Zelllinienlysaten eine Bande von erwarteter Größe sowie eine weitere Bande von unerwarteter Größe zeigten, auch in weitem Zelllinienlysaten wurde je eine Banden bei erwarteter und eine Bande von unerwarteter Größe detektiert.....             | 117 |
| <b>Abbildung 43:</b> Antikörper CD31, INI-1 und Villin, welche in ausgewählten Zelllinienlysaten eine Bande von erwarteter Größe sowie zwei oder drei weitere Banden von unerwarteter Größe zeigte, auch in weitem Zelllinienlysaten wurde je eine Banden bei erwarteter und eine Bande von unerwarteter Größe detektiert..... | 117 |

|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                     |     |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| <b>Abbildung 44:</b> Antikörper Calponin-1, CD5 und Napsin A, welche in ausgewählten Zelllinienlysaten eine Bande von erwarteter Größe sowie 4 oder mehr weitere Bande von unerwarteter Größe zeigte, auch in weiteren Zelllinienlysaten wurde je eine Banden bei erwarteter und eine Bande von unerwarteter Größe detektiert. .... | 118 |
| <b>Abbildung 45:</b> Anteil der Antikörper, die in humanen Zelllinien eine Bande richtiger Größe sowie weitere Banden zeigten. ....                                                                                                                                                                                                 | 119 |
| <b>Abbildung 46:</b> Sequenzidentität der Proteine PRSS1 (TYR1), PRSS2 (TYR2) und PRSS2 (TYR3) der kanonischen Sequenzen jedes Proteins. Alignment via Uniprot alignment.....                                                                                                                                                       | 125 |
| <b>Abbildung 47:</b> Alignment der Proteinsequenzen für PRSS1 (TYR1), PRSS2 (TYR2) und PRSS3 (TYR3) sowie die verwendeten Peptidsequenzen zur Immunisierung der Mäuse gegen PRSS1, PRSS2 und PRSS3. ....                                                                                                                            | 126 |
| <b>Abbildung 48:</b> PRSS1_2_9D1_3_1_2_1_2_4 Vergleich der verschiedenen, zur Immunisierung verwendeten Peptidsequenzen sowie die Austestung des ausgewählten Klon auf Reaktivität gegen die verwendeten Peptide (rot markiert, links). ....                                                                                        | 127 |
| <b>Abbildung 49:</b> PRSS1_3_8G12(1) Vergleich der verschiedenen, zur Immunisierung verwendeten Peptidsequenzen sowie die Austestung des ausgewählten Klon auf Reaktivität gegen die verwendeten Peptide (rot markiert, links). ....                                                                                                | 128 |
| <b>Abbildung 50:</b> PRSS2_3_5G1 Vergleich der verschiedenen, zur Immunisierung verwendeten Peptidsequenzen sowie die Austestung des ausgewählten Klon auf Reaktivität gegen die verwendeten Peptide (rot markiert, links). ....                                                                                                    | 129 |
| <b>Abbildung 51:</b> PRSS2_1_9B4 Vergleich der verschiedenen, zur Immunisierung verwendeten Peptidsequenzen sowie die Austestung des ausgewählten Klon auf Reaktivität gegen die verwendeten Peptide (rot markiert, links). ....                                                                                                    | 130 |
| <b>Abbildung 52:</b> PRSS3_7_5E7 Vergleich der verschiedenen, zur Immunisierung verwendeten Peptidsequenzen sowie die Austestung des ausgewählten Klon auf Reaktivität gegen die verwendeten Peptide (rot markiert, links). ....                                                                                                    | 131 |
| <b>Abbildung 53:</b> PRSS3_7_2G4 Vergleich der verschiedenen, zur Immunisierung verwendeten Peptidsequenzen sowie die Austestung des ausgewählten Klon auf Reaktivität gegen die verwendeten Peptide (rot markiert, links). ....                                                                                                    | 132 |
| <b>Abbildung 54:</b> PRSS3_7_5A8 Vergleich der verschiedenen, zur Immunisierung verwendeten Peptidsequenzen sowie die Austestung des ausgewählten Klon auf Reaktivität gegen die verwendeten Peptide (rot markiert, links). ....                                                                                                    | 133 |
| <b>Abbildung 55:</b> Darstellung der Färbung des Antikörpers MSH2 im Colon-Gewebe von Mensch (links), Ratte (mitte) und Schwein (rechts), sowie die prozentuale Ähnlichkeit der Proteinsequenzen der verschiedene Spezies. ....                                                                                                     | 134 |
| <b>Abbildung 56:</b> Darstellung der Färbung des Antikörpers Cytokeratin 19 im Colon-Gewebe von Mensch (links), Ratte (mitte) und Schwein (rechts), sowie die prozentuale Ähnlichkeit der Proteinsequenzen der verschiedene Spezies. ....                                                                                           | 134 |
| <b>Abbildung 57:</b> Darstellung der Färbung des Antikörpers Cystatin A im Epidermis-Gewebe von Mensch (links), sowie der Zunge-Schleimhaut von Ratte (mitte) und Schwein (rechts), sowie die prozentuale Ähnlichkeit der Proteinsequenzen der verschiedene Spezies. ....                                                           | 135 |
| <b>Abbildung 58:</b> Darstellung der Färbung des Antikörpers CD23 im Milz-Gewebe von Mensch (oberer Reihe, links), sowie Ratte (oberer Reihe, mitte) und Schwein (oberer Reihe, rechts), sowie das Leber - Gewebe von Mensch (untere Reihe, links), Ratte (untere Reihe, mitte) und Schwein (untere Reihe, rechts). ....            | 135 |
| <b>Abbildung 59:</b> Färbeintensität verschiedener beispielhafter Zelllinien für den Antikörper EpCAM. ....                                                                                                                                                                                                                         | 137 |

|                                                                                                                                                                                                           |     |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| <b>Abbildung 60:</b> Färbeintensität verschiedener beispielhafter Zelllinien für den Antikörper P16.<br>.....                                                                                             | 139 |
| <b>Abbildung 61:</b> Chromatogramm des Puffers 1, 1:100 verdünnt in der Ionen-<br>Chromatographie. ....                                                                                                   | 190 |
| <b>Abbildung 62:</b> Chromatogramm des Puffers 2, 1:100 verdünnt in der Ionen-<br>Chromatographie. ....                                                                                                   | 191 |
| <b>Abbildung 63:</b> Darstellung des Layouts des verwendeten Zelllinien-Mikroarrays. ....                                                                                                                 | 192 |
| <b>Abbildung 64:</b> Beispielhaftes Layout eines Gewebemikroarrays, hier am Beispiel eines AB-<br>Test verwendet in der Studie zur Antikörper-Alterung (Kapitel 3.4 Haltbarkeit von<br>Antikörpern). .... | 196 |



## 8. Tabellenverzeichnis

|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                |     |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| <b>Tabelle 1:</b> publizierte Inhaltsstoffe kommerzieller Antikörper Verdünnungspuffer für die Immunhistochemie .....                                                                                                                                                                                                          | 17  |
| <b>Tabelle 2:</b> Tabellarische Darstellung des Versuchsablaufs zur Testung der Antikörper-Stabilität .....                                                                                                                                                                                                                    | 54  |
| <b>Tabelle 3:</b> Erstellung der Verdünnungsreihe aus BSA für den BCA-Protein Assay.....                                                                                                                                                                                                                                       | 57  |
| <b>Tabelle 4:</b> Erstellung der Verdünnungsreihe der Lysate für den BCA-Protein Assay.....                                                                                                                                                                                                                                    | 58  |
| <b>Tabelle 5:</b> Zusammensetzung des Mastermix für die Erstellung von cDNA sowie die Zusammensetzung des Mastermix der Negativkontrolle ohne reverse Transkriptase .....                                                                                                                                                      | 61  |
| <b>Tabelle 6:</b> Ablauf des Protokolls für den Thermocyclers zur Erstellung der cDNA aus RNA mittels reverser Transkriptase .....                                                                                                                                                                                             | 61  |
| <b>Tabelle 7:</b> Zusammensetzung der Mastermix für RT-PCR, dargestellt als benötigte Volumina für eine Reaktion.....                                                                                                                                                                                                          | 62  |
| <b>Tabelle 8:</b> zeitlicher Ablauf der RT-PCR im 7900HT Fast RealTime PCR System Cyclor .....                                                                                                                                                                                                                                 | 62  |
| <b>Tabelle 9:</b> Effizienz der verwendeten Peptide für PRSS2 in der Fähigkeit der Generierung von Antikörpern, sowie deren gute (TOP) bzw. sehr gute (TOPTOP) Färbereigenschaften in der Immunhistochemie .....                                                                                                               | 67  |
| <b>Tabelle 10 :</b> Darstellung der Eigenschaften der ausgewählten Peptidsequenzen PRSS2_A, PRSS1_D, PRSS2_E, PRSS2_F, PRSS2_I sortiert nach ihrem Erfolg in der Generierung von Antikörpern. ....                                                                                                                             | 67  |
| <b>Tabelle 11:</b> Vergleich Anzahl an ELISA-positiven Wells (ELISA >0,1) in Fusionsversuchen mit Panning in Relation zu ohne Panning, sowie Relation der Mittelwerte der ELISAs. ....                                                                                                                                         | 77  |
| <b>Tabelle 12:</b> Durchschnittliche Anzahl CD3- bzw. CD20-positiver Zellen. ....                                                                                                                                                                                                                                              | 78  |
| <b>Tabelle 13:</b> prozentualer Anteil an CD3 bzw. CD20-positiven Zellen aus der Gesamtzellzahl. ....                                                                                                                                                                                                                          | 79  |
| <b>Tabelle 14:</b> prozentualer Anteil an CD3 bzw. CD20-positiven Zellen aus der Gesamtzellzahl nach einem Panning mittels Biotin-gekoppelten Zielpeptid über Avidin an der Platte. ....                                                                                                                                       | 81  |
| <b>Tabelle 15:</b> prozentualer Anteil an CD3 bzw. CD20-positiven Zellen aus der Gesamtzellzahl nach einem Panning mittels OVA-gekoppeltem Zielpeptid an die Platte.....                                                                                                                                                       | 82  |
| <b>Tabelle 16:</b> prozentualer Anteil an CD3 bzw. CD20-positiven Zellen aus der Gesamtzellzahl nach einem Panning über ein Biotin-gekoppeltem Peptid mit welchem nicht immunisiert wurde über Avidin an die Platte.....                                                                                                       | 82  |
| <b>Tabelle 17:</b> prozentualer Anteil an CD3 bzw. CD20-positiven Zellen aus der Gesamtzellzahl nach einem Panning mit einer Platte, welche nur mit Avidin beschichtet wurde, jedoch nicht mit dem Ziepeptid.....                                                                                                              | 83  |
| <b>Tabelle 18:</b> prozentualer Anteil an CD3 bzw. CD20-positiven Zellen aus der Gesamtzellzahl nach einem Panning mit einer Platte, welche nicht beschichtet wurde (kein Bindeprotein und Zielpeptid). ....                                                                                                                   | 83  |
| <b>Tabelle 19:</b> Analyse der Effizienz des Erstellungsverfahrens von Hybridomaklonen mittels Standardprotokoll, dem Inkubieren der Hybridoma-Klone erstellt nach Standardprotokoll in semi-solid Medium und solchen Hybridoma-Klonen, welche vor Fusion nach Standardprotokoll mittels B-Zell Panning selektiert wurden..... | 85  |
| <b>Tabelle 20:</b> Anteil der analysierten Antikörper unter verschiedenen Lagerungsbedingungen mit gleichbleibenden bzw. verschlechterter Färbequalität im Vergleich zur Ausgangsfärbung zum Startzeitpunkt der Lagerung.....                                                                                                  | 104 |
| <b>Tabelle 21:</b> Färbeverhalten der analysierten Antikörper unter verschiedenen Lagerungsbedingungen. ....                                                                                                                                                                                                                   | 105 |
| <b>Tabelle 22:</b> Liste der Antikörper die nur eine Bande von erwarteter Größe zeigten. ....                                                                                                                                                                                                                                  | 109 |
| <b>Tabelle 23:</b> Liste der Antikörper die neben der Bande von erwarteter Größe weitere Banden zeigten. ....                                                                                                                                                                                                                  | 113 |
| <b>Tabelle 24:</b> Liste der Antikörper die nur eine Bande von erwarteter Größe zeigten. ....                                                                                                                                                                                                                                  | 116 |
| <b>Tabelle 25:</b> Liste der Antikörper die neben der Bande von erwarteter Größe weitere Banden zeigten. ....                                                                                                                                                                                                                  | 119 |
| <b>Tabelle 26:</b> Anzahl Antikörper, deren Nebenbanden teilweise durch Isoformen erklärt werden konnten .....                                                                                                                                                                                                                 | 121 |

|                                                                                                                                                                                                                                                                                   |     |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| <b>Tabelle 27:</b> Anzahl Antikörper, deren Nebenbanden komplett durch Isoformen erklärt werden konnten .....                                                                                                                                                                     | 121 |
| <b>Tabelle 28:</b> Vier-Felder-Tafel der Kategorisierung der Antikörper für Gewebelysate und Zelllinien-Lysate.....                                                                                                                                                               | 122 |
| <b>Tabelle 29:</b> Liste der Klassifizierung „guter“ Antikörper für Lysate aus Gewebe und Zelllinien.....                                                                                                                                                                         | 124 |
| <b>Tabelle 30:</b> Darstellung der Verteilung an Zelllinien welche als Zelllinien-Block von getesteten Antikörpern angefärbt werden kann.....                                                                                                                                     | 136 |
| <b>Tabelle 31:</b> Auswertung der Übereinstimmung der Expressionsstärke anhand von Daten erhalten aus RT-PCR , RNA-Expressionsdaten aus der Literatur und Immunhistochemie der analysierten Targets in verschiedenen Zelllinien.....                                              | 137 |
| <b>Tabelle 32:</b> Darstellung der delta cT-Werte und der relativen RNA-Expression der in der RT-PCR analysierten Zelllinien für das Zielprotein EpCAM, Vergleichswerte aus der Literatur sowie die Färbeintensität der Zelllinien für den Antikörper gegen EpCAM.....            | 138 |
| <b>Tabelle 33:</b> Darstellung der delta cT-Werte und der relativen RNA-Expression der in der RT-PCR analysierten Zelllinien für das Zielprotein p16 (Gen CDKN2A), Vergleichswerte aus der Literatur sowie die Färbeintensität der Zelllinien für den Antikörper gegen EpCAM..... | 139 |
| <b>Tabelle 34:</b> tabellarische Darstellung der verwendeten Zelllinien des Zelllinien-Mikroarrays und deren Koordinaten.....                                                                                                                                                     | 193 |
| <b>Tabelle 35:</b> Beispielhafte tabellarische Darstellung der verwendeten Gewebe und deren Koordinaten auf einem Gewebemikroarrays, hier am Beispiel eines AB-Test verwendet in der Studie zur Antikörper-Alterung (Kapitel 3.4 Haltbarkeit von Antikörpern). .....              | 197 |

## 9. Abkürzungsverzeichnis

|          |                                                                                                                             |
|----------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| %        | Prozent                                                                                                                     |
| ° C      | Grad Celcius                                                                                                                |
| BSA      | Bovines Serum Albumin                                                                                                       |
| cDNA     | Komplementäre DNA                                                                                                           |
| cT       | <i>Engl:</i> cycle threshold                                                                                                |
| DAB      | 3,3'-Diaminobenzidin                                                                                                        |
| DMEM     | Dulbecco's Modified Eagle's Medium                                                                                          |
| DMSO     | Dimethylsulfoxid                                                                                                            |
| DNA      | Desoxyribonukleinsäure                                                                                                      |
| ELISA    | <i>Engl:</i> Enzym-linked-Immunsorbent-Assay                                                                                |
| FBS      | Fötales bovines Serum                                                                                                       |
| FFPE     | Formalin-fixiert Paraffin-eingebettet                                                                                       |
| g        | Gramm                                                                                                                       |
| HAT      | Hypoxanthin, Aminopterin und Thymidin                                                                                       |
| HRP      | <i>Engl:</i> Horseradish peroxidase, Meerrettichperoxidase                                                                  |
| IHC      | Immunhistochemie                                                                                                            |
| IVDR     | Verordnung über in-vitro Diagnostika                                                                                        |
| kDa      | Kilodalton                                                                                                                  |
| l        | Liter                                                                                                                       |
| MHC      | <i>Engl:</i> major histocompatibility complex, Haupthistokompatibilitätskomplex                                             |
| Min      | Minuten                                                                                                                     |
| mL       | Milliliter                                                                                                                  |
| mm       | Millimeter                                                                                                                  |
| PBS      | <i>Engl:</i> Phosphate buffered saline, Phosphatgepufferte Salzlösung                                                       |
| PEG      | Polyethylenglycol                                                                                                           |
| PVDF     | <i>Engl:</i> Polyvinylidene fluoride, Polyvinylidenfluorid                                                                  |
| RNA      | Ribonukleinsäure                                                                                                            |
| rpm      | <i>Engl:</i> rounds per minute, Runden pro Minute                                                                           |
| RT-PCR   | <i>Engl:</i> reverse transcription polymerase chain reaction, Reverse-Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion               |
| SDS-PAGE | <i>Engl:</i> sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis, Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese |
| TBS      | <i>Engl:</i> Tris-buffered saline, Tris-gepufferte Salzlösung                                                               |
| TBST     | TBS mit Tween-20                                                                                                            |
| TMA      | <i>Engl:</i> tissue microarray, Gewebe-Mikroarray                                                                           |
| V        | Volt                                                                                                                        |
| WHO      | <i>Engl:</i> World Health Organisation, Weltgesundheitsorganisation                                                         |
| µg       | Mikrogramm                                                                                                                  |
| µL       | Mikroliter                                                                                                                  |
| µm       | Mikrometer                                                                                                                  |

## 10. Eidesstattliche Versicherung:

*Hiermit versichere ich an Eides statt, die vorliegende Dissertationsschrift selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel und Quellen benutzt zu haben.*

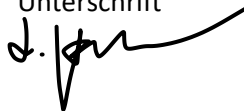
*Sofern im Zuge der Erstellung der vorliegenden Dissertationsschrift generative Künstliche Intelligenz (gKI) basierte elektronische Hilfsmittel verwendet wurden, versichere ich, dass meine eigene Leistung im Vordergrund stand und dass eine vollständige Dokumentation aller verwendeten Hilfsmittel gemäß der Guten wissenschaftlichen Praxis vorliegt. Ich trage die Verantwortung für eventuell durch die gKI generierte fehlerhafte oder verzerrte Inhalte, fehlerhafte Referenzen, Verstöße gegen das Datenschutz- und Urheberrecht oder Plagiate.*

### **Affidavit:**

*I hereby declare and affirm that this doctoral dissertation is my own work and that I have not used any aids and sources other than those indicated.*

*If electronic resources based on generative artificial intelligence (gAI) were used in the course of writing this dissertation, I confirm that my own work was the main and value-adding contribution and that complete documentation of all resources used is available in accordance with good scientific practice. I am responsible for any erroneous or distorted content, incorrect references, violations of data protection and copyright law or plagiarism that may have been generated by the gAI.*

Hamburg, den  
15.07.2025

Unterschrift  


## 11. Danksagung

Hiermit möchte ich allen Menschen danken, die mich während meiner Dissertation begleitet, betreut und unterstützt haben.

Besonders danken möchte ich Ronald, danke für jede Erklärung, für jedes Troubleshooting, dafür immer ein offenes Ohr zu haben und mich in meinem Tun zu unterstützen und an mich zu glauben.

Auch Prof. Dr. Markus Glatzel möchte ich für die Möglichkeit danken, am Institut für Neuropathologie in den Progress Seminaren wissenschaftliches Input und Feedback zu meinem Thema bekommen zu können.

Prof. Dr. Guido Sauter danke ich für die Ermöglichung, meine Dissertation am Institut für Pathologie durchführen zu können, auf Kongressen wissenschaftlichen Daten zu präsentieren und auch über mein Dissertationsthema hinaus Themen zu erforschen und besser zu verstehen.

Auch Elena möchte ich besonders danken, ohne dich hätte ich meine Dissertation so in dieser Form nicht geschafft! Ich danke dir, dass du mir Einblick in die multicolour Immunfluoreszenz und den ewigen Kampf mit Akoya, Visiopharm und JMP gegeben hast, dafür das wir auf der Arbeit und auch sonst immer das Beste aus allem gemacht haben und uns durch so manche spätnächtliche Arbeitsstunde oder Marathon gequält haben.

Und auch einen ganz großen Dank den Damen aus dem Nachbarraum. Danke Claudia und Uli für die gemeinsame, schöne Zeit auf der Arbeit und außerhalb, für all die Diskussionen, Unternehmungen und gemeinsamen Mittagessen!

Ich möchte auch all den anderen Menschen am UKE danken: Danke Marion und Monika für eure Unterstützung im Labor und der Zellkultur, ohne euch wäre meine Dissertation nicht möglich gewesen. Danke an alle Mitarbeiter aus den verschiedensten Bereichen des UKEs; dem Zellkultur-Labor, dem TMA-Labor, dem PCR-Labor, dem Tierstall und allen anderen Menschen die mich in meiner Zeit am UKE unterstützt haben!

Und natürlich danke ich auch allen hinter den Kulissen; ich danke meinen Eltern, meiner Schwester und meinem Freund für die emotionale und kulinarische Unterstützung und für das Verständnis für meiner Doktorarbeit; dafür dass ihr immer für mich da wart , mir zugehört habt und mich ertragen habt. Ich danke allen Menschen, die mir in meiner Zeit Hamburg begegnet sind und mir gezeigt haben wie schön Hamburg ist.

Und jetzt – „weitermachen“!!

## 12. Anhang

### 12.1 Chemische Analyse zweier kommerzieller Verdünnungspuffer

#### 12.1.1 Puffer 1 (IHC Select Antibody Diluent Solution, prediluted, Sigma Aldrich)

Ergebnisse der Umkehrphasen-Hochleistungsflüssig-Chromatographie (RP-HPLC) in Kopplung mit hochauflösender Flugzeit-Massenspektrometrie (TOF):

- Salzcluster
- TRIS (Tris(hydroxymethyl)aminomethan)
- Organischen Säuren: Octansäure (oder Isomer – z. B. 2-Ethylhexansäure);  
Linolsäure, Ölsäure und Stearinsäure

Ergebnisse der Ionenchromatographie mit optische Emissionsspektrometrie mit induktiv gekoppeltem Plasma (ICP-OES):

- Ionenchromatographie
  - o 0.68 w/v % Cl<sup>-</sup> und 269 ppm Br<sup>-</sup>
  - o Undefinierte Peaks bei RT 3.9 and 13.19 (eventuell Fettsäuren)
- Quantitative ICP-OES :
  - o 0.36 w/v % Na
- Semi Quantitative ICP-OES:
  - o 15 ppm (µg/ml) S
  - o ≤ 1 ppm Ag, Al, As, Au, B, Ba, Be, Bi, Ca, Cd, Ce, Cr, Cu, Dy, Er, Eu, Fe, Ga, Gd, Ge, Hg, Ho, In, K, La, Li, Lu, Mg, Mn, Mo, Ni, P, Pb, Pd, Pr, Pt, Sb, Sc, Se, Si, Sn, Sr, Ta, Tb, Te, Th, Ti, Tl, V, W, Y, Zn, Zr

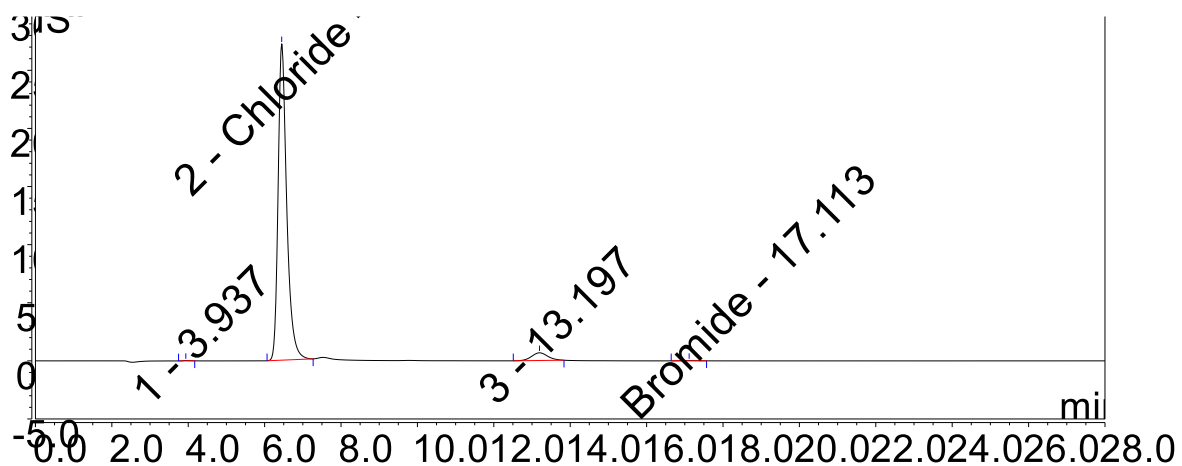


Abbildung 61: Chromatogramm des Puffers 1, 1:100 verdünnt in der Ionen-Chromatographie.

### 12.1.2 Puffer 2 (Antikörper-Diluent grün, Carl Roth)

Ergebnisse der Umkehrphasen-Hochleistungsflüssig-Chromatographie (RP-HPLC) in Kopplung mit hochauflösender Flugzeit-Massenspektrometrie (TOF):

- Salzcluster
- TRIS (Tris(hydroxymethyl)aminomethan)
- Octansäure (oder Isomer – z. B. 2-Ethylhexansäure)
- Verbindung mit der wahrscheinlichsten Summenformel  $C_{27}H_{32}N_2O_7S_2$ , mit Aktivität im UV-Bereich. Wahrscheinlich ein Farbstoff vom Xanthen-Typ.
- Linolsäure, Ölsäure und Stearinsäure

Ergebnisse der Ionenchromatographie mit optische Emissionsspektrometrie mit induktiv gekoppeltem Plasma (ICP-OES):

- Ionenchromatographie:
  - o 0.52 w/v % Cl<sup>-</sup> and 335 ppm Br
  - o Undefinierte Peaks bei RT 3.9 und 13.19 (eventuell Fettsäuren)
- Quantitative ICP-OES :
  - o 0.25 w/v % Na
- Semi Quantitative ICP-OES:
  - o 135 ppm (µg/ml) S
  - o ≤ 1 ppm Ag, Al, As, Au, B, Ba, Be, Bi, Ca, Cd, Ce, Cr, Cu, Dy, Er, Eu, Fe, Ga, Gd, Ge, Hg, Ho, In, K, La, Li, Lu, Mg, Mn, Mo, Ni, P, Pb, Pd, Pr, Pt, Sb, Sc, Se, Si, Sn, Sr, Ta, Tb, Te, Th, Ti, Tl, V, W, Y, Zn, Zr

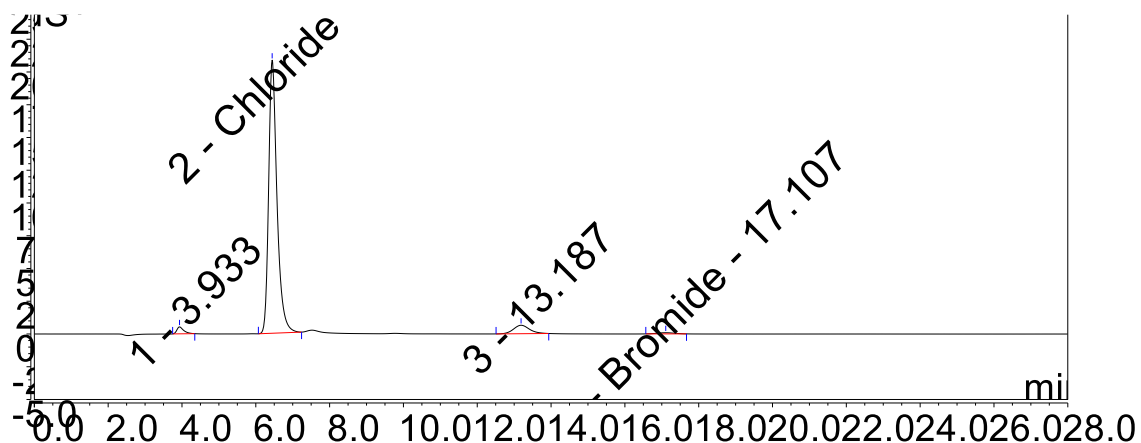


Abbildung 62: Chromatogramm des Puffers 2, 1:100 verdünnt in der Ionen-Chromatographie.

## 12.2 Beispielhaftes Layout von Zelllinien- und Gewebe-Mikroarrays

### 12.2.1 Beispielhaftes Layout eines Zelllinien-Mikroarrays

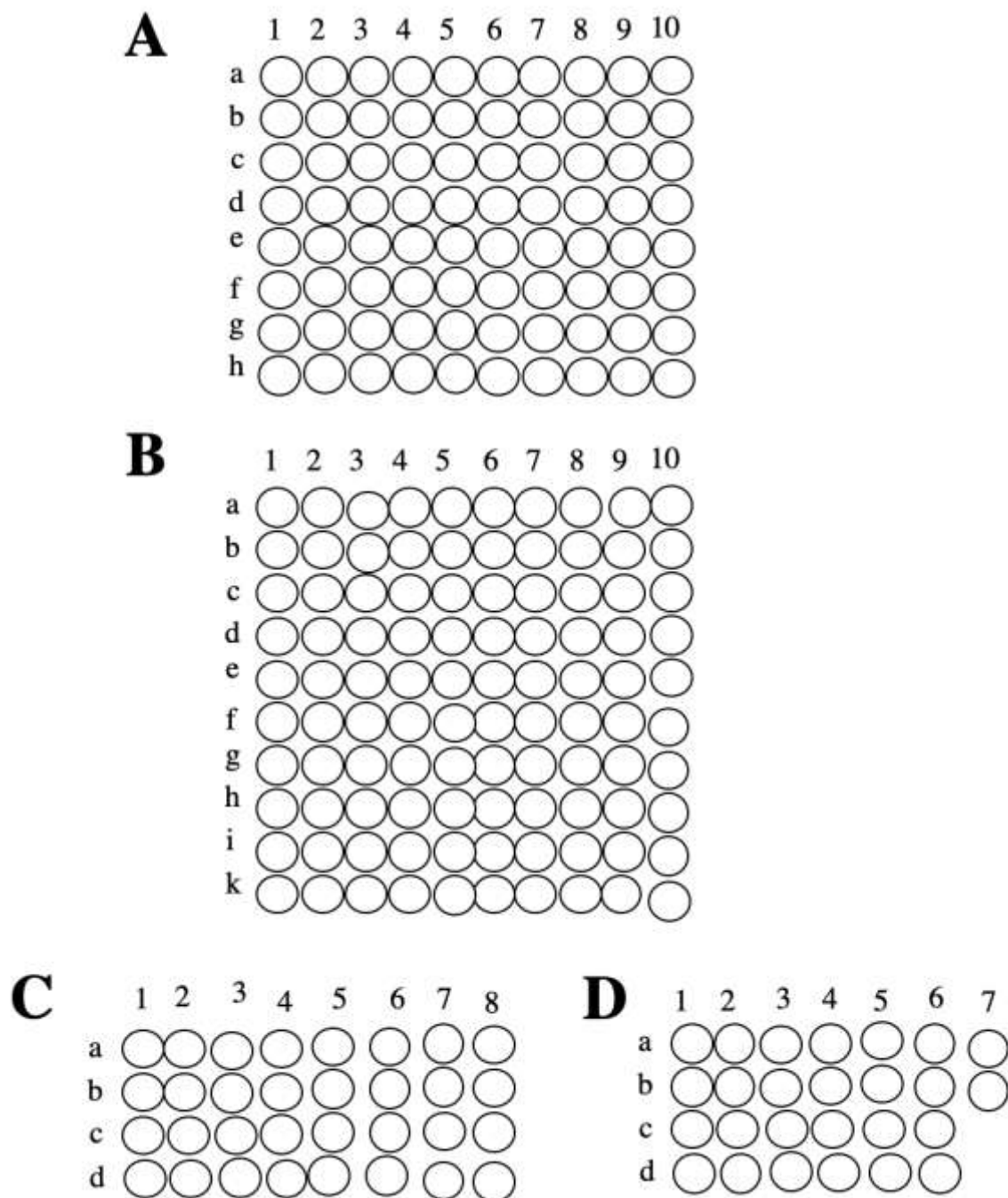


Abbildung 63: Darstellung des Layouts des verwendeten Zelllinien-Mikroarrays.



**Tabelle 34:** tabellarische Darstellung der verwendeten Zelllinien des Zelllinien-Mikroarrays und deren Koordinaten.

| Lokalisation | Zelllinie   |
|--------------|-------------|
| A 1a         | SNB-19      |
| A 1b         | SNB-19      |
| A 1c         | RPMI 8226   |
| A1d          | RPMI 8226   |
| A 1e         | PC-3        |
| A1f          | PC-3        |
| A 1g         | DU-145      |
| A1h          | DU-145      |
| A 2a         | COLO-206F   |
| A 2b         | COLO-206F   |
| A 2c         | SK-OV-3     |
| A 2d         | SK-OV-3     |
| A 2e         | CCRF-CEM    |
| A 2f         | CCRF-CEM    |
| A 2g         | T47-D       |
| A 2h         | T47-D       |
| A 3a         | NCL-H23     |
| A 3b         | NCL-H23     |
| A 3c         | MOLT-4      |
| A 3d         | MOLT-4      |
| A 3e         | A549        |
| A 3f         | A549        |
| A 3g         | K-562       |
| A 3h         | K-562       |
| A 4a         | SW-620      |
| A 4b         | SW-620      |
| A 4c         | MDA-MR-231  |
| A 4d         | MDA-MR-231  |
| A 4e         | NCL/ADR-RES |
| A 4f         | NCL/ADR-RES |
| A 4g         | U251        |
| A 4h         | U251        |
| A 5a         | MCF-7       |
| A 5b         | MCF-7       |
| A 5c         | HS-578T     |
| A 5d         | HS-578T     |
| A 5e         | A498        |
| A 5f         | A498        |
| A 5g         | ACHN        |
| A 5h         | ACHN        |
| A 6a         | SF-295      |
| A 6b         | SF-295      |

|      |            |
|------|------------|
| B 5a | UACC-257   |
| B 5b | UACC-257   |
| B 5c | MDA-MB-468 |
| B 5d | MDA-MB-468 |
| B 5e | HCT 116    |
| B 5f | HCT 116    |
| B 5g | HSPC-1     |
| B 5h | HSPC-1     |
| B 5i | Rh-30      |
| B 5k | Rh-30      |
| B 6a | SR         |
| B 6b | SR         |
| B 6c | SCCL-MT1   |
| B 6d | SCCL-MT1   |
| B 6e | HDML-3     |
| B 6f | HDML-3     |
| B 6g | Raji       |
| B 6h | Raji       |
| B 6i | RD-ES      |
| B 6k | RD-ES      |
| B 7a | SEM-1      |
| B 7b | SEM-1      |
| B 7c | ZR-75      |
| B 7d | ZR-75      |
| B 7e | SW-872     |
| B 7f | SW-872     |
| B 7g | RPMI-6410  |
| B 7h | RPMI-6410  |
| B 7i | SW80       |
| B 7k | SW80       |
| B 8a | SW13       |
| B 8b | SW13       |
| B 8c | SW732      |
| B 8d | SW732      |
| B 8e | SW1949     |
| B 8f | SW1949     |
| B 8g | MDA-MB-453 |
| B 8h | MDA-MB-453 |
| B 8i | SW1353     |
| B 8k | SW1353     |
| B 9a | SW756      |
| B 9b | SW756      |

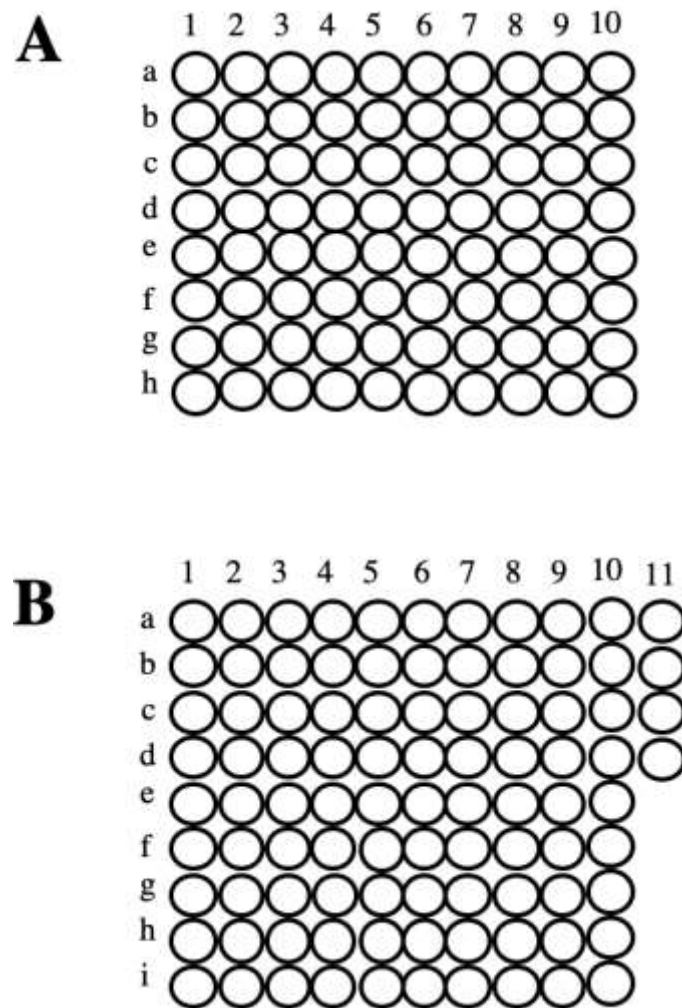
|       |           |
|-------|-----------|
| A 6c  | SK-MEL-2  |
| A 6d  | SK-MEL-2  |
| A 6e  | SK-MEL-28 |
| A 6f  | SK-MEL-28 |
| A 6g  | SK-MEL-5  |
| A 6h  | SK-MEL-5  |
| A 7a  | SF-539    |
| A 7b  | SF-539    |
| A 7c  | HOP92     |
| A 7d  | HOP92     |
| A 7e  | SF-268    |
| A 7f  | SF-268    |
| A 7g  | HOP62     |
| A 7h  | HOP62     |
| A 8a  | CAKI-1    |
| A 8b  | CAKI-1    |
| A 8c  | OVCAR-4   |
| A 8d  | OVCAR-4   |
| A 8e  | H460      |
| A 8f  | H460      |
| A 8g  | SN12C     |
| A 8h  | SN12C     |
| A 9a  | H322M     |
| A 9b  | H322M     |
| A 9c  | H522      |
| A 9d  | H522      |
| A 9e  | TK10      |
| A 9f  | TK10      |
| A 9g  | RXF 393   |
| A 9h  | RXF 393   |
| A 10a | HCT-15    |
| A 10b | HCT-15    |
| A 10c | H226      |
| A 10d | H226      |
| A 10e | OVCAR-8   |
| A 10f | OVCAR-8   |
| A 10g | OVCAR-3   |
| A 10h | OVCAR-3   |
| B 1a  | OVCAR-5   |
| B 1b  | OVCAR-5   |
| B 1c  | UACC-62   |
| B 1d  | UACC-62   |
| B 1e  | 786-0     |
| B 1f  | 786-0     |

|       |            |
|-------|------------|
| B 9c  | SW608      |
| B 9d  | SW608      |
| B 9e  | SW780      |
| B 9f  | SW780      |
| B 9g  | SW707      |
| B 9h  | SW707      |
| B 9i  | THP1       |
| B 9k  | THP1       |
| B 10a | SW579      |
| B 10b | SW579      |
| B 10c | SW 2224    |
| B 10d | SW 2224    |
| B 10e | SW 1961    |
| B 10f | SW 1961    |
| B 10g | SW1503     |
| B 10h | SW1503     |
| B 10i | LS174T     |
| B 10k | LS174T     |
| C 1a  | MIA PaCa-2 |
| C 1b  | MIA PaCa-2 |
| C 1c  | SIHA       |
| C 1d  | SIHA       |
| C 2a  | A431       |
| C 2b  | A431       |
| C 2c  | SW 1045    |
| C 2d  | SW 1045    |
| C 3a  | SK-BR-3    |
| C 3b  | SK-BR-3    |
| C3c   | JEG3       |
| C3d   | JEG3       |
| C4a   | Jurkat     |
| C4b   | Jurkat     |
| C4c   | RAW        |
| C4d   | RAW        |
| C5a   | HEK293     |
| C5b   | HEK293     |
| C5c   | 3T3        |
| C5d   | 3T3        |
| C6a   | EL-4       |
| C6b   | EL-4       |
| C6c   | HELA       |
| C6d   | HELA       |
| C7a   | SW451      |
| C7b   | SW451      |

|      |            |
|------|------------|
| B 1g | COLO 205   |
| B 1h | COLO 205   |
| B 1i | IGR OV1    |
| B 1k | IGR OV1    |
| B 2a | UO 31      |
| B 2b | UO 31      |
| B 2c | 60IHCC2998 |
| B 2d | 60IHCC2998 |
| B 2e | 60IEKVX    |
| B 2f | 60IEKVX    |
| B 2g | MALME 3M   |
| B 2h | MALME 3M   |
| B 2i | SNB 75     |
| B 2k | SNB 75     |
| B 3a | HEP-G2     |
| B 3b | HEP-G2     |
| B 3c | T98 G      |
| B 3d | T98 G      |
| B 3e | HT29       |
| B 3f | HT29       |
| B 3g | MDA-MB-435 |
| B 3h | MDA-MB-435 |
| B 3i | HL-60(TB)  |
| B 3k | HL-60(TB)  |
| B 4a | DAUDI      |
| B 4b | DAUDI      |
| B 4c | LNCap      |
| B 4d | LNCap      |
| B 4e | LOX IMVI   |
| B 4f | LOX IMVI   |
| B 4g | M14        |
| B 4h | M14        |
| B 4i | BT-549     |
| B 4k | BT-549     |

|     |                  |
|-----|------------------|
| C7c | HCC78            |
| C7d | HCC78            |
| C8a | U188-MG          |
| C8b | U188-MG          |
| C8c | H2228            |
| C8d | H2228            |
| D1a | H3122            |
| D1b | H3122            |
| D1c | EML4-ALK         |
| D1d | EML4-ALK         |
| D2a | SU-DHL-1         |
| D2b | SU-DHL-1         |
| D2c | Karpas 299       |
| D2d | Karpas 299       |
| D3a | SUP-M2           |
| D3b | SUP-M2           |
| D3c | DEL              |
| D3d | DEL              |
| D4a | Ki-JK            |
| D4b | Ki-JK            |
| D4c | TPC-1            |
| D4d | TPC-1            |
| D5a | LC-2/ad          |
| D5b | LC-2/ad          |
| D5c | HAP1             |
| D5d | HAP1             |
| D6a | H3F3A            |
| D6b | H3F3A            |
| D6c | H3F3B            |
| D6d | H3F3B            |
| D7a | 2023/Human H3F3B |
| D7b | 2023/Human H3F3B |

### 12.2.2 Beispielhaftes Layout eines Gewebe-Mikroarrays



**Abbildung 64:** Beispielhaftes Layout eines Gewebemikroarrays, hier am Beispiel eines AB-Test verwendet in der Studie zur Antikörper-Alterung (Kapitel 3.4 Haltbarkeit von Antikörpern).

**Tabelle 35:** Beispielhafte tabellarische Darstellung der verwendeten Gewebe und deren Koordinaten auf einem Gewebemikroarrays, hier am Beispiel eines AB-Test verwendet in der Studie zur Antikörper-Alterung (Kapitel 3.4 Haltbarkeit von Antikörpern).

| Name    | Lokalisation | Gewebe            |
|---------|--------------|-------------------|
| AB-Test | A 1a         | Colon -mucosa     |
| AB-Test | A 1b         | Colon -mucosa     |
| AB-Test | A 1c         | Colon -mucosa     |
| AB-Test | A 1d         | Colon -mucosa     |
| AB-Test | A 1e         | Ösophagus -mucosa |
| AB-Test | A 1f         | Ösophagus -mucosa |
| AB-Test | A 1g         | Ösophagus -mucosa |
| AB-Test | A 1h         | Ösophagus -mucosa |
| AB-Test | A 2a         | Magen -mucosa     |
| AB-Test | A 2b         | Magen -mucosa     |
| AB-Test | A 2c         | Magen -mucosa     |
| AB-Test | A 2d         | Magen -mucosa     |
| AB-Test | A 2e         | Magen -muscularis |
| AB-Test | A 2f         | Magen -muscularis |
| AB-Test | A 2g         | Magen -muscularis |
| AB-Test | A 2h         | Magen -muscularis |
| AB-Test | A 3a         | Mamma             |
| AB-Test | A 3b         | Mamma             |
| AB-Test | A 3c         | Mamma             |
| AB-Test | A 3d         | Mamma             |
| AB-Test | A 3e         | Endometrium       |
| AB-Test | A 3f         | Endometrium       |
| AB-Test | A 3g         | Endometrium       |
| AB-Test | A 3h         | Endometrium       |
| AB-Test | A 4a         | Lunge             |
| AB-Test | A 4b         | Lunge             |
| AB-Test | A 4c         | Lunge             |
| AB-Test | A 4d         | Lunge             |
| AB-Test | A 4e         | Pankreas          |
| AB-Test | A 4f         | Pankreas          |
| AB-Test | A 4g         | Pankreas          |
| AB-Test | A 4h         | Pankreas          |
| AB-Test | A 5a         | Lymphknoten       |
| AB-Test | A 5b         | Lymphknoten       |
| AB-Test | A 5c         | Lymphknoten       |
| AB-Test | A 5d         | Lymphknoten       |

|         |      |                                  |
|---------|------|----------------------------------|
| AB-Test | B 1i | Colon Adenokarzinom              |
| AB-Test | B 1k | Colon Adenokarzinom              |
| AB-Test | B 2a | Ösophagus Adenokarzinom          |
| AB-Test | B 2b | Ösophagus Adenokarzinom          |
| AB-Test | B 2c | Ösophagus Adenokarzinom          |
| AB-Test | B 2d | Ösophagus Adenokarzinom          |
| AB-Test | B 2e | Ösophagus Adenokarzinom          |
| AB-Test | B 2f | Ösophagus Plattenepithelkarzinom |
| AB-Test | B 2g | Ösophagus Plattenepithelkarzinom |
| AB-Test | B 2h | Ösophagus Plattenepithelkarzinom |
| AB-Test | B 2i | Ösophagus Plattenepithelkarzinom |
| AB-Test | B 3a | Ösophagus Plattenepithelkarzinom |
| AB-Test | B 3b | Mammakarzinom lobulär            |
| AB-Test | B 3c | Mammakarzinom lobulär            |
| AB-Test | B 3d | Mammakarzinom lobulär            |
| AB-Test | B 3e | Mammakarzinom lobulär            |
| AB-Test | B 3f | Mammakarzinom lobulär            |
| AB-Test | B 3g | Mammakarzinom ductal             |
| AB-Test | B 3h | Mammakarzinom ductal             |
| AB-Test | B 3i | Mammakarzinom ductal             |
| AB-Test | B 4a | Mammakarzinom ductal             |
| AB-Test | B 4b | Mammakarzinom ductal             |
| AB-Test | B 4c | Ovarialkarzinom serös            |
| AB-Test | B 4d | Ovarialkarzinom serös            |
| AB-Test | B 4e | Ovarialkarzinom serös            |
| AB-Test | B 4f | Ovarialkarzinom serös            |
| AB-Test | B 4g | Ovarialkarzinom endometri.       |
| AB-Test | B 4h | Ovarialkarzinom endometri.       |
| AB-Test | B 4i | Ovarialkarzinom endometri.       |
| AB-Test | B 5a | Ovarialkarzinom endometri.       |
| AB-Test | B 5b | Ovarialkarzinom klarzellig       |
| AB-Test | B 5c | Ovarialkarzinom klarzellig       |
| AB-Test | B 5d | Schilddrüsenkarzinom papillär    |
| AB-Test | B 5e | Schilddrüsenkarzinom papillär    |
| AB-Test | B 5f | Schilddrüsenkarzinom papillär    |
| AB-Test | B 5g | Schilddrüsenkarzinom papillär    |

|         |       |                      |
|---------|-------|----------------------|
| AB-Test | A 5e  | Tonsille             |
| AB-Test | A 5f  | Tonsille             |
| AB-Test | A 5g  | Milz                 |
| AB-Test | A 5h  | Milz                 |
| AB-Test | A 6a  | Schilddrüse          |
| AB-Test | A 6b  | Schilddrüse          |
| AB-Test | A 6c  | Schilddrüse          |
| AB-Test | A 6d  | Schilddrüse          |
| AB-Test | A 6e  | Haut                 |
| AB-Test | A 6f  | Haut                 |
| AB-Test | A 6g  | Haut                 |
| AB-Test | A 6h  | Haut                 |
| AB-Test | A 7a  | Hirn                 |
| AB-Test | A 7b  | Hirn                 |
| AB-Test | A 7c  | Hirn                 |
| AB-Test | A 7d  | Hirn                 |
| AB-Test | A 7e  | Herz                 |
| AB-Test | A 7f  | Herz                 |
| AB-Test | A 7g  | Herz                 |
| AB-Test | A 7h  | Herz                 |
| AB-Test | A 8a  | Muskel quergestreift |
| AB-Test | A 8b  | Muskel quergestreift |
| AB-Test | A 8c  | Muskel quergestreift |
| AB-Test | A 8d  | Muskel quergestreift |
| AB-Test | A 8e  | Prostata             |
| AB-Test | A 8f  | Prostata             |
| AB-Test | A 8g  | Prostata             |
| AB-Test | A 8h  | Prostata             |
| AB-Test | A 9a  | Blase - Urothel      |
| AB-Test | A 9b  | Blase - Urothel      |
| AB-Test | A 9c  | Blase - Urothel      |
| AB-Test | A 9d  | Blase - Urothel      |
| AB-Test | A 9e  | Niere -cortex        |
| AB-Test | A 9f  | Niere -cortex        |
| AB-Test | A 9g  | Niere -cortex        |
| AB-Test | A 9h  | Niere -cortex        |
| AB-Test | A 10a | Hoden                |
| AB-Test | A 10b | Hoden                |
| AB-Test | A 10c | Hoden                |

|         |       |                                 |
|---------|-------|---------------------------------|
| AB-Test | B 5h  | Schilddrüsenkarzinom papillär   |
| AB-Test | B 5i  | Schilddrüsenkarzinom follikulär |
| AB-Test | B 6a  | Schilddrüsenkarzinom follikulär |
| AB-Test | B 6b  | Schilddrüsenkarzinom follikulär |
| AB-Test | B 6c  | Schilddrüsenkarzinom follikulär |
| AB-Test | B 6d  | Schilddrüsenkarzinom follikulär |
| AB-Test | B 6e  | Pharynxkarzinom                 |
| AB-Test | B 6f  | Pharynxkarzinom                 |
| AB-Test | B 6g  | Pharynxkarzinom                 |
| AB-Test | B 6h  | Pharynxkarzinom                 |
| AB-Test | B 6i  | Pharynxkarzinom                 |
| AB-Test | B 7a  | Mundbodenkarzinom               |
| AB-Test | B 7b  | Mundbodenkarzinom               |
| AB-Test | B 7c  | Mundbodenkarzinom               |
| AB-Test | B 7d  | Mundbodenkarzinom               |
| AB-Test | B 7e  | Mundbodenkarzinom               |
| AB-Test | B 7f  | Prostatakarzinom                |
| AB-Test | B 7g  | Prostatakarzinom                |
| AB-Test | B 7h  | Prostatakarzinom                |
| AB-Test | B 7i  | Prostatakarzinom                |
| AB-Test | B 8a  | Prostatakarzinom                |
| AB-Test | B 8b  | Prostatakarzinom                |
| AB-Test | B 8c  | Prostatakarzinom                |
| AB-Test | B 8d  | Prostatakarzinom                |
| AB-Test | B 8e  | Prostatakarzinom                |
| AB-Test | B 8f  | Prostatakarzinom                |
| AB-Test | B 8g  | Blasenkarzinom pTa              |
| AB-Test | B 8h  | Blasenkarzinom pTa              |
| AB-Test | B 8i  | Blasenkarzinom pTa              |
| AB-Test | B 9a  | Blasenkarzinom pTa              |
| AB-Test | B 9b  | Blasenkarzinom pTa              |
| AB-Test | B 9c  | Blasenkarzinom pT2              |
| AB-Test | B 9d  | Blasenkarzinom pT2              |
| AB-Test | B 9e  | Blasenkarzinom pT2              |
| AB-Test | B 9f  | Blasenkarzinom pT2              |
| AB-Test | B 9g  | Blasenkarzinom pT2              |
| AB-Test | B 9h  | Nierenzellkarzinom klarzellig   |
| AB-Test | B 9i  | Nierenzellkarzinom klarzellig   |
| AB-Test | B 10a | Nierenzellkarzinom klarzellig   |

|         |       |                     |
|---------|-------|---------------------|
| AB-Test | A 10d | Hoden               |
| AB-Test | A 10e | Plazenta            |
| AB-Test | A 10f | Plazenta            |
| AB-Test | A 10g | Plazenta            |
| AB-Test | A 10h | Plazenta            |
| AB-Test | B 1a  | Colon Adenokarzinom |
| AB-Test | B 1b  | Colon Adenokarzinom |
| AB-Test | B 1c  | Colon Adenokarzinom |
| AB-Test | B 1d  | Colon Adenokarzinom |
| AB-Test | B 1e  | Colon Adenokarzinom |
| AB-Test | B 1f  | Colon Adenokarzinom |
| AB-Test | B 1g  | Colon Adenokarzinom |
| AB-Test | B 1h  | Colon Adenokarzinom |

|         |       |                               |
|---------|-------|-------------------------------|
| AB-Test | B 10b | Nierenzellkarzinom klarzellig |
| AB-Test | B 10c | Nierenzellkarzinom klarzellig |
| AB-Test | B 10d | Nierenzellkarzinom papillär   |
| AB-Test | B 10e | Nierenzellkarzinom papillär   |
| AB-Test | B 10f | Nierenzellkarzinom papillär   |
| AB-Test | B 10g | Nierenzellkarzinom papillär   |
| AB-Test | B 10h | Nierenzellkarzinom papillär   |
| AB-Test | B 10i | Niere Onkozytom               |
| AB-Test | B 11a | Niere Onkozytom               |
| AB-Test | B 11b | Niere Onkozytom               |
| AB-Test | B 11c | Niere Onkozytom               |
| AB-Test | B 11d | Niere Onkozytom               |

## 12.3 Unterlagen zum Tierversuch zur Erstellung monoklonaler Antikörper in Mäusen

### 12.3.1 Tierversuchsantrag

☐ **Antrag auf Genehmigung eines Tierversuchsvorhabens nach § 8 Abs. 1 des Tierschutzgesetzes<sup>1</sup>**

☒ **Anzeige von Tierversuchen an Wirbeltieren, Kopffüßern oder Zahnfußkrebse**

Von der Genehmigungsbehörde auszufüllen!

Geschäftszeichen

Antragsteller:

PD Dr. rer. nat. Ronald Simon

Telefon:

01522-2816559

Telefax:

040-7410-55997

E-Mail:

r.simon@uke.de

Verantwortliche Leiterin/verantwortlicher Leiter des Vorhabens:

PD Dr. rer. nat. Ronald Simon

Dienstliche Anschrift (Einrichtung, Institut, Straße, Haus-Nr., Postleitzahl, Ort)

Institut für Pathologie, Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf, Martinistr. 52, 20246 Hamburg

Telefon:

01522-2816559

Telefax:

040-7410-55997

E-Mail:

r.simon@uke.de

Stellvertretende Leiterin/stellvertretender Leiter des Vorhabens:

Elena Bady

Dienstliche Anschrift (Einrichtung, Institut, Straße, Haus-Nr., Postleitzahl, Ort)

Institut für Pathologie, Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf, Martinistr. 52, 20246 Hamburg

Telefon:

040-7410-59241

Telefax:

040-7410-55997

E-Mail:

e.bady@uke.de

#### Anlagen:

1. Projektzusammenfassung (§ 31 Abs. 2 i. V. m. § 41 Abs. 1 TierSchVersV; nicht erforderlich bei Anzeigen)
2. Glossar der im Text verwendeten Abkürzungen und ggf. spezifischen Fachausdrücke
3. Liste der Literaturzitate (falls nicht im Text eingearbeitet) (s. Punkt 1.1.2)
4. ggf. Formblatt „Abschlussbeurteilung genetisch veränderter Zuchtlinien“ (s. Punkt 1.1.5.1)
5. ggf. Formblatt „Wiederholte Verwendung von Primaten“
6. a) Score Sheet (s. Punkt 1.2.10) b) Belastungstabelle (s. Punkt 1.2.9)
7. Aufzeichnungsmuster nach § 9 Abs. 5 TierSchG (s. Punkt 1.2.11)
8. ggf. Personenbögen
9. ggf. Formblätter „Angaben zur Biometrischen Planung“
10. Statistisches Gutachten ☐ vorhanden ☐ nicht vorhanden
11. Aktueller Hygienestatus der Versuchstiere / der Tierhaltung (s. Punkt 1.2.3)
12. Sonstige:

<sup>1</sup> Alle Paragraphenangaben beziehen sich auf das Tierschutzgesetz (TierSchG) bzw. die Tierschutz-Versuchstierverordnung (TierSchVersV) in der jeweils geltenden Fassung



### 12.3.2 Genehmigung des Tierversuchsantrags

Eingang  
Datum: 21.09.2020  
Kürzel: PK



COPY

## Freie und Hansestadt Hamburg Behörde für Justiz und Verbraucherschutz

BüV, Billstraße 80, D - 20539 Hamburg

Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf  
Institut für Pathologie  
Herr PD Dr. Ronald Simon  
Martinistr. 52  
20246 Hamburg

Amt für Verbraucherschutz  
Lebensmittelsicherheit und Veterinärwesen

Billstraße 80  
D - 20539 Hamburg  
Telefon 040-429-37-3627  
Telefax 040-4279-48184

Ansprechpartnerin: Frau Stefanie Günther  
Zimmer: 8.05  
E-Mail: [Stefanie.Guenther@justiz.hamburg.de](mailto:Stefanie.Guenther@justiz.hamburg.de)  
Gz: V 1305 / 591-00.33  
Hamburg, den 17.09.2020 DE

Nachrichtlich: Dres. Tiemann, Budack, Peters, Aulmann, Reitmeier, Kersch

A 017/2020

A 8a/859 Nachfolge

#### **Tierversuche gemäß § 8a Abs. 1 Nr. 3a Tierschutzgesetz; Eingriffe und Behandlungen zur Gewinnung/Vermehrung von Stoffen, Produkten oder Organismen**

Ihre Anzeige vom 09.09.2020, hier vollständig eingegangen am 11.09.2020 mit der Bezeichnung „Herstellung monoklonaler Antikörper (II)“

Sehr geehrter Herr PD Dr. Simon,

die Behörde für Justiz und Verbraucherschutz **bestätigt Ihre o.a. Anzeige** nach § 36 Abs. 2 Tierschutz-Versuchstierverordnung vom 1. August 2013 (BGBl. I S. 3125, 3126), in der derzeit gültigen Fassung.

Für o.g. Projekt werden 1500 Mäuse benötigt, um die o.g. Methode durchzuführen (davon 103 Mäuse aus der Tierversuchsanzeige A8a/859)

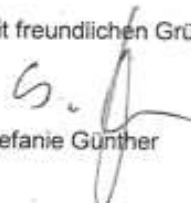
#### **Hinweis:**

Die Tötung der Tiere ist nur bei Vorliegen eines vernünftigen Grundes im Sinne des § 1 Satz 2 Tierschutzgesetz zulässig. Andere Rechtsbereiche, insbesondere das Arzneimittelrecht, wurden bei der Prüfung der Anzeige nicht berücksichtigt.

#### **Gebühren:**

Diese Bestätigung ist nach der Gebührenordnung für das öffentliche Gesundheitswesen i.d.j.g.F. gebührenpflichtig. Ein Gebührenbescheid wird mit gesonderter Post übersandt.

Mit freundlichen Grüßen

  
Stefanie Günther

### 12.3.3 Score Sheet des Tierversuchs

Abbruchkriterien zu Antrag<sup>1</sup>:

| Belastungsscore/Abbruchkriterien                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                |                    | Untersuchungsbefunde |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------|----------------------|--|--|--|--|--|--|--|--|--|
| Beobachtung                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                     | Handlungsanweisung |                      |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| <b>I Körpergewicht</b> (bsp. Zutreffendes ankreuzen)<br>bezogen auf Ausgangsgewicht [ ]<br>bezogen auf Kontrollgruppe (x) andere Mäuse desselben Alters im selben Käfig<br>ggf. Reduktion > 5 %<br>mgf. Reduktion > 10 %<br>hgr. Reduktion > 20 %                                                                                                               |                    | 0                    |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 |                    | A                    |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 |                    | B                    |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 |                    | C                    |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| <b>II Allgemeinzustand</b><br>Fell glatt, glänzend, anliegend; Körperöffnungen sauber<br>geringgradige Störung z.B. Fell ggf. ungeschliffen, verringerte Bewegung, ggf. gestörte Motorik<br>mittelschwere Störung z.B. Fell mgf. verschleudert, struppig, Isolation, mgf. gestörte Motorik<br>verschleuderte Augen                                              |                    | 0                    |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 |                    | A                    |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 |                    | B                    |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| <b>hochgradige Störung</b><br>normales Verhalten (Schlafen, Reaktion auf Anlassen und Beseitigung, Nahrung, Sozialkontakte)<br>ungewöhnliches Verhalten, eingeschränkte Motorik, oder Hyperaktivität<br>Isolation, Schreieräußerungen, Apathie, ausgeprägte Hyperkinetik bzw. Stereotypen, Koordinationsstörungen<br>Autismus, hoher Muskeltonus, Dehydratation |                    | 0                    |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 |                    | C                    |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| <b>IV Versuchsspezifische Kriterien<sup>1</sup></b>                                                                                                                                                                                                                                                                                                             | ergänzen           |                      |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| keine Belastung                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 | 0                  |                      |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| Schwellung der Injektionsstelle, abklingsad innerhalb 24h                                                                                                                                                                                                                                                                                                       | A                  |                      |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| anhaltende Schwellung und Rötung der Injektionsstelle                                                                                                                                                                                                                                                                                                           | B                  |                      |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| Schmerzsymptome, Abzessbildung, Bauchfellentzündung, Verletzung Organe                                                                                                                                                                                                                                                                                          | C                  |                      |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| <b>Bewertung, Maßnahmen</b>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                     |                    |                      |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| keine Belastung                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 | 0                  |                      |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| geringe Belastung: sorgfältig weiter beobachten (1x täg), evtl unterstützende Maßnahmen<br>(z.B. Wärmezufuhr, Spezialfutter)                                                                                                                                                                                                                                    | A                  |                      |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| mäßige Belastung: ggf. medizinische Versorgung einleiten (Analgesie, Antibiotikum)<br>Überwachungsfrequenz alle 8 Stunden                                                                                                                                                                                                                                       | B                  |                      |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| hochgradige Belastung: Tierschutzbeauftragten konsultieren; tierärztliche Versorgung einleiten;<br>ggf. Tier einschläfern                                                                                                                                                                                                                                       | C                  |                      |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| 1) Diese Punkte müssen vom Antragsteller ergänzt werden 2) Buchstabe (A/B/C) wird pro Zeile 1 x vergeben sobald ein Kriterium erfüllt ist.                                                                                                                                                                                                                      |                    | Handzeichen          |  |  |  |  |  |  |  |  |  |