UNIVERSITÄTSKLINIKUM HAMBURG-EPPENDORF

Institut für Immunologie

Prof. Dr. Friedrich Koch-Nolte

Humanisierte Schwerekettenantikörper für die Markierung und Tötung CD38-exprimierender Tumorzellen

Dissertation

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

vorgelegt von:

Kerstin Schütze aus Hamburg

Hamburg 2020

Angenommen von der Medizinischen Fakultät am: 08.03.2021
Veröffentlicht mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg
Prüfungsausschuss, der/die Vorsitzende: PD Dr. Peter Bannas
Prüfungsausschuss, 2. Gutachter/in: Prof. Dr. Friedrich Koch-Nolte

Diese Arbeit beinhaltet Teile der folgenden Publikationen:

- Hambach J, Riecken K, Cichutek S, Schütze K, Albrecht B, Petry K, Röckendorf J, Baum N, Kröger N, Hansen T, Schuch G, Haag F, Adam G, Fehse B, Bannas P, Koch-Nolte F Targeting CD38-Expressing Multiple Myeloma and Burkitt Lymphoma Cells In Vitro with Nanobody-Based Chimeric Antigen Receptors (Nb-CARs). Cells. 2020 Jan 29;9(2). pii: E321. doi: 10.3390/cells9020321.
- Schriewer L, Schütze K, Petry K, Hambach J, Fumey W, Koenigsdorf J, Baum N, Menzel S, Rissiek B, Riecken K, Fehse B, Röckendorf J, Schmid J, Albrecht B, Pinnschmidt H, Ayuk F, Kröger N, Binder M, Schuch G, Hansen T, Haag F, Adam G, Koch-Nolte F, Bannas P Nanobody-based CD38-specific heavy chain antibodies induce killing of multiple myeloma and other hematological malignancies. Theranostics 2020; doi:10.7150/thno.38533
- Tintelnot J, Baum N, Schultheiss C, Braig F, Trentmann M, Finter J, Fumey W, Bannas P, Fehse B,Riecken K, Schütze K, Bokemeyer C, Rösner T, Valerius T, Peipp M, Koch-Nolte F, Binder M Nanobody-targeting of epidermal growth factor receptor (EGFR) ectodomain variants overcomes resistance to therapeutic EGFR antibodies. Mol Cancer Ther. 2019;18(4):823-833.
- Schütze K, Petry K, Hambach J, Schuster N, Fumey W, Schriewer L, Rockendorf J, Menzel S, Albrecht B, Haag F, Stortelers C, Bannas P, Koch-Nolte F CD38-Specific Biparatopic Heavy Chain Antibodies Display Potent Complement-Dependent Cytotoxicity Against Multiple Myeloma Cells. Front Immunol.. 2018;9:2553.
- Fumey W, Koenigsdorf J, Kunick V, Menzel S, Schütze K, Unger M, Schriewer L, Haag F, Adam G, Oberle A, Binder M, Fliegert R, Guse A, Zhao Y, Cheung Lee H, Malavasi F, Goldbaum F, van Hegelsom R, Stortelers C, Bannas P, Koch-Nolte F Nanobodies effectively modulate the enzymatic activity of CD38 and allow specific imaging of CD38+ tumors in mouse models in vivo. SCI REP-UK. 2017;7(1):14289.
- Oberle A, Brandt A, Alawi M, Langebrake C, Janjetovic S, Wolschke C, **Schütze K**, Bannas P, Kröger N, Koch-Nolte F, Bokemeyer C, Binder M *Long-term CD38 saturation by daratumumab interferes with diagnostic myeloma cell detection*. Haematologica. 2017;102(9):e368-e370.

Die in dieser Arbeit vorgestellten Konstrukte sind Teil folgendem Patentverfahren:

Nolte F, Bannas P, **Schütze K**, Fumey W, Schriewer L, Menzel S, Stortelers C. 2017. *Antigen-binding polypeptides directed against CD38*. Pub. No. WO/2017/021211

Inhaltsverzeichnis	
1. Einleitung	S.01
1.1. Multiples Myelom und Burkitt Lymphom	S.01
1.2. CD38	S.02
1.3. Immuntherapie des Multiplen Myeloms mit dem Antikörpern	S.02
Daratumumab	
1.4. Fc-abhängige Tötungsmechanismen	S.04
1.4.1. Komplement vermittelte Zvtotoxizität (CDC)	S.04
1 4 2 Antikörper abhängige zelluläre Zytotoxizität (ADCC)	S.06
1.5 Nanobodies	S 06
1.6. Aktueller Stand der Forschung auf dem Gebiet der CD38	S 08
snezifischen Nanohodies	0.00
2. Material und Methoden	S.10
2.1. Material	S.10
2.1.1. Antikörper	S.10
2.1.2. Primer	S.11
2.1.3. Enzyme	S.13
2.1.4. Chemikalien	S.13
2.1.5. Lösungen	S.15
2.1.6. Zellen	S.15
2.2. Methoden	S.16
2.2.1. Molekularbiologische Methoden	S.16
2.2.1.1. Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	S.16
2.2.1.2. Agarose-Gelelektrophorese	S.17
2213 Transformation von E coli	S.18
2 2 1 4 DNA Sequenzierung nach Sanger	S 18
2.2.1.5. Klonierung von binaratonischen hcAb	S 19
2.2.2.1.0. Richerung von Siparatopischen north	S 20
2.2.2.1 Produktion von Schwereketten-Antikörnern in HEK293.6E	S 20
	0.20
2222 Aufreinigung von $bcAb$	S 21
2.2.2.2. SDS DAGE und Coomassie Eärbung	C 21
2.2.2.4. Kopplung von Nanohodios und Antikörnorn an	0.21 0.21
2.2.2.4. Ropping von Nanoboules und Antikorpent an AloxaEluor647	3.21
2.2.2. Zellbiologiache Methoden	ຣາາ
	S.22
2.2.3.1. Zelikultui 2.2.2.2. Tranaduktian van Tumarzallan mit Luaifaraaa	0.22
2.2.3.2. Transduktion von Tumorzellen mit Lucherase	5.22
2.2.3.3. Erzeugung von CD38-denzienten zeimnen	5.23
2.2.3.4. Transduktion von NK-92-Zeilen mit Expressionskassetten	5.24
und murines CD16)	0 00
	5.26
2.2.4.1. Durchflusszytometrie	S.26
2.2.4.2. Komplement vermittelte Zytotoxizität (CDC)	S.27
2.2.4.3. Antikörper abhängige zelluläre Zelltötung (ADCC)	S.27
2.2.4.4. Messung der Bindungsavidität mittels Dissoziationsassay	S.28
2.2.4.5. Anfärbung peripherer Blutlymphozyten (PBMCs)	S.29
3 Franhnisse	C 3U
3. Liyesiilisse 3.1. Herstellung von Target- und Effektorzelllinien	C 21
3.1.1 Transduktion von Tumorzellen mit Luzifersse und Grün	0.01 C 21
fluoreszierendem Protein	0.01

3.1.2. Inaktivierung des CD38 Gens in Lymphomzelllinien 3.1.3. Expression von Membranproteinen auf der Zelloberfläche der Zielzellen	S.32 S.34
3.1.4. Stabile Transduktion von humanen NK-Lymphom Zellen mit	S.37
3.1.5. CD16-transduzierte NK-92 Zellen zeigen eine spezifische Antikörper-abhängige Zytotoxizität (ADCC)	S.38
 3.2. Herstellung und Charakterisierung von Schwerekettenantikörpern 3.2.1. Klonierung von Expressionsvektoren für biparatopische hcAb 	S.40 S.40
3.2.2. Produktion und Aufreinigung von hcAb	S.43
3.2.3. Kopplung der verschiedenen Konstrukte an Alexa Fluor 647 3.2.4. Epitopkartierung der Bindungsstellen der Nanobodies an CD38	S.44 S.45
3.2.5. Bindungsavidität von hcAb im Vergleich zu einzelnen Nanobodies	S.46
3.2.6. Anfärbung von peripheren Blutlymphozyten mit Nanobodies 3.3. Komplement vermittelte und Antikörper vermittelte zelluläre	S.48 S.50
3.3.1. Einzelne hcAb induzieren keine CDC, wohingegen Kombinationen unabhängig bindender hcAb starke Zelltötung	S.51
3.3.2. Kombinationen unabhängig bindender hcAb vermittelten auch im Falle des EGFR eine effektive Komplement abhängige Zvtotoxizität	S.54
3.3.3. Kombinationen aus Daratumumab mit einem unabhängig bindenden hcAb zeigen eine verstärkte CDC Aktivität	S.55
3.3.4. CD38-spezifische biparatopische hcAb vermittelten eine	S.57
effektive Komplement abhängige Zytotoxizität 3.3.5. Die Länge des Linkers zwischen den beiden Nanobodies im biparatopischen hcAb kann die Effizienz des CDC	S.59
beeinflussen 3.3.6. Kombinationen von zwei unabhängig bindenden hcAb und biparatopische hcAb induzieren potenten CDC an primären Myolomzollon	S.61
3.3.7. hcAb sind gute Ergänzungen zur Daratumumabtherapie 3.3.8. hcAb induzieren Antikörper abhängige zelluläre Zytotoxizität (ADCC)	S.62 S.64
4. Diskussion	S.66
4.1. Modifikation und Charakterisierung humaner Zelllinien 4.2. Schwerekettenantikörper-vermittelte Tötung von CD38 exprimierenden Tumorzellen	S.66 S.68
4.3. Ausblick auf weiterführende Arbeiten	S.74
5. Zusammenfassung	S.76
6. Abkürzungsverzeichnis	S.78
7. Literaturverzeichnis	S.79
8. Danksagung	S.91
9. Lebenslauf	S.92
10. Eidesstattliche Erklärung	S.94

1. Einleitung

Diese Arbeit beschäftigt sich mit der antikörperbasierten Krebstherapie von hämatologischen Tumoren wie dem Multiplen Myelom und dem Burkitt Lymphom. Die Einleitung gibt einen Überblick über diese Erkrankungen, der Rolle des Zelloberflächenenzyms CD38, der antikörperbasierten Krebstherapie, und der aktuellen Forschung auf dem Gebiet der Nanobodies und der Schwereketten-Antikörper.

1.1. Multiples Myelom und Burkitt Lymphom

Das Multiple Myelom (MM) ist eine bösartige Krebserkrankung der weißen Blutkörperchen. Es zählt zu den Non-Hodgkin-Lymphomen der B-Zellreihe. Das Lebenszeitrisiko an einem Multiplen Myelom zu erkranken liegt bei 0,4-0,7% und ist damit der häufigste Tumor des Knochenmarks und macht ca. 10% der Tumoren des blutbildenden Systems aus (Robert-Koch-Institut, Zentrum für Krebsdaten 2017). Beim Multiplen Myelom kommt es zu einer abnormalen Vermehrung von Antikörperproduzierenden Plasmazellen im Knochenmark. Die starke Vermehrung dieser Zellen im Knochenmark führt zu einer Verdrängung der gesunden Zellen und damit zu einer Einschränkung der Blutbildung mit resultierender Blutarmut, Schwächung des Immunsystems und der Gerinnung (Myelom Deutschland e.V., o.J.). Myelomzellen sind im Gegensatz zu gesunden Plasmazellen monoklonal. Das bedeutet, dass alle Tumorzellen Nachkommen einer einzigen Zelle darstellen. Sie produzieren alle den gleichen Antikörper oder Antikörperfragmente, welche in der Regel funktionslos sind. Die Überproduktion schädigt die Knochen und Organe. Vor allem die Nieren sind durch die Ausscheidung kleinerer Antikörperfragmente gefährdet (Kumar et al. 2017). Durch diese Umstände führt eine Myelomerkrankung immer zum Tod. Obwohl die Therapie des Multiplen Myeloms in den letzten Jahrzehnten große Fortschritte gemacht hat, ist eine kurative Therapie nach wie vor nicht möglich (Kumar et al. 2017, Deutsche Krebsgesellschaft, o.J.).

Auch das Burkitt Lymphom (BL) ist eine Krebserkrankung des blutbildenden Systems und lässt sich ebenfalls den Non-Hodgkin-Lymphomen zuordnen. Es ist gekennzeichnet durch abnorme B-Zellen, die das gesamte lymphatische System befallen und sich bevorzugt in Lymphknoten absiedeln. Auch eine Infiltration des Knochenmarks sowie anderer Organe ist möglich (Deutsche Krebsgesellschaft, o.J). Das Burkitt Lymphom ist ein sich sehr rasch teilender Tumor. Durch diesen Umstand spricht er gut auf herkömmliche Chemo- sowie Strahlentherapien an. Bis zur 80% der betroffenen Kinder und Jugendlichen können geheilt werden. Wird der Tumor jedoch erst in einem späten Stadium entdeckt oder betrifft er Erwachsene, so überleben nur etwa die Hälfte aller Betroffenen die Erkrankung (Casulo et al. 2015, Deutsche Krebsgesellschaft, o.J.). Aus diesem Grund ist es notwendig, für das Burkitt Lymphom und insbesondere für das Multiple Myelom neue Therapiemöglichkeiten zu finden.

1.2. CD38

Sowohl das Multiple Myelom wie auch das Burkitt Lymphom überexprimieren häufig das Oberflächenmolekül CD38. CD38 ist ein Ektoenzym, das für die Zellädhäsion, den Kalziumhaushalt und die Signaltransduktion wichtig ist. Es katalysiert die Synthese sowie Hydrolyse von zyklischer Adenosindiphosphat-Ribose (cADPR). Dabei wird Nicotinamidadenindinukleotid (NAD+) zu ADP-Ribose umgewandelt. Zusätzlich katalysiert CD38 die Synthese von Nicotinsäureadenindinukleotidphosphat (NAADP) aus Nicotinamidadenindinukleotidphosphat (NADP+) (Chini et al. 2002; Horenstein et al. 2015). CD38 ist in geringem Maße auf vielen Zellen des Körpers exprimiert, insbesondere jedoch auf Zellen des Immunsystems. Dabei weisen reife T- und B-Zellen nur eine geringe Dichte von CD38 auf der Zellobefläche auf, wohingegen Plasmazellen und Natürliche Killerzellen (NK-Zellen) viele Kopien von CD38 auf der Zelloberfläche ausprägen (Niels et al 2018). Hämatologische Erkrankungen wie das Multiple Myelom oder das Burkitt Lymphom überexprimieren CD38. Das bedeutet, dass sie viel größere Mengen an CD38 auf der Zelloberfläche ausprägen als herkömmliche Zellen. Dieser Umstand macht CD38 zu einem guten diagnostischen Tumormarker, sowie zu einem potentiellen Ziel für eine gezielte Immuntherapie mittels Antikörpern (van de Donk et al. 2018).

1.3. Immuntherapie des Multiplen Myeloms mit dem Antikörper Daratumumab

Das Multiple Myelom hatte lange Zeit eine sehr schlechte Prognose mit einer 5-Jahresüberlebensrate von unter 50% und einer absoluten Sterberate von 100% (Robert-Koch-Institut, Zentrum für Krebsdaten 2017). Dieses konnte in den letzten Jahrzehnten durch neuartige Therapien entschieden verbessert werden, wenngleich noch keine kurative Therapie zur Verfügung steht. Seit den 50er Jahren waren klassische Chemotherapeutika (Antrazykline, Alkylanzien, Kortikosteroide) sowie eine Hochdosis-Chemotherapie mit anschließender Knochenmarkstransplantation die Therapie der Wahl (Myeloma Trialists' Collaborative Group 1998, Attal et al. 1996). Seit Anfang der 2000er Jahre konnte die Therapie durch immunmodulatorische Substanzen wie Thalidomid und Lenalidomid, sowie durch den Proteasominhibitor Bortezomib entschieden verbessert werden (Rajan und Kuma

2016). All diese Therapieansätze sind dabei unspezifisch und weisen daher eine Reihe von teils schweren Nebenwirkungen auf. Im letzten Jahrzehnt hat daher die gezielte Immuntherapie mittels Antikörpern immer mehr an Bedeutung gewonnen. Antikörper binden spezifisch an ein bestimmtes Ziel, wie zum Beispiel an ein Oberflächenmolekül auf einer Tumorzelle. Dies ermöglicht eine zielgerichtete Markierung für die spezifische Abtötung einzelner Zellen durch Antikörper-vermittelte Effektormechanismen. Zur spezifischen Therapie des Multiplen Myeloms wurden im Jahr 2008 der CD38 spezifische Antiköper Daratumumab entwickelt. Daratumumab (Darzalex) wurde durch Immunisierung von transgenen Mäusen, die die Genloki für menschliche schwere und leichte Antikörperketten tragen, generiert (de Weers et al. 2011). Auf diese Weise konnte ein vollständig humaner Antikörper erzeugt werden. Daratumumab's anti-Tumoreffekt beruht auf unterschiedlichen Mechanismen. Zum einen zeigt er ein hohes Maß an Fc-abhängigen Tötungsmechanismen wie der Komplement vermittelte Zytotoxizität (CDC), der Antikörper abhängigen zellulären Zytotoxizität (ADCC) und der Antikörper abhängigen zellulären Phagozytose (ADCP) (de Weers et al 2011). Weiterhin konnte gezeigt werden, dass eine Kreuzvernetzung von zellgebundenem Daratumumab zum programmierten Zelltod führt (Overdijk et al 2016). Ein weiterer indirekter anti-Tumoreffekt ist die Modulation des Immunsystems durch Depletion von CD38 exprimierenden regulatorischen T- und B-Zellen. Dieses verhindert eine Immunsuppression, fördert die Produktion von aktivierten CD4 und CD8 positiven T-Zellen und verstärkt dadurch die körpereigene Bekämpfung des Tumors (Krejcik et al. 2016). Aufgrund seines guten Ansprechens in den beiden klinischen Studien GEN501 und SIRIUS wurde Daratumumab frühzeitig im Jahre 2015 für die USA und 2016 in Europa für die Therapie von therapierefraktären Multiplen Myelomen oder Rezidiven zugelassen (Lokhorst et al. 2015, Lonial et al. 2016). Seit 2018 wird Daratumumab auch in der Erstlinientherapie in Kombination mit immunmodulatorischen Substanzen eingesetzt, da sich in der klinischen Studie ALCYONE ein Vorteil für Patienten zeigte, die keiner Stammzelltransplantation zugeführt werden konnten (Mateos et al. 2019). Trotz der insgesamt guten Studienergebnisse mit deutlicher Verlängerung des Überlebens, sprechen bis zu 60% der behandelten Patienten nicht adäquat auf die Therapie an und nahezu alle erleiden irgendwann ein Fortschreiten der Erkrankung (Nooka et al. 2019). Als Grund hierfür werden verschiedene Resistenzmechanismen vermutet. Es wurde berichtet, dass Non-Responder bereits vor Therapiebeginn weniger CD38 exprimieren und nahezu alle Patienten CD38 während der Daratumumabtherapie von der Zelloberfläche herunterregeln (Nijhof et al. 2015). Zudem könnte durch Depletion von CD38 tragenden Immunzellen die Möglichkeit der Bekämpfung mittels ADCC und ADCP eingeschränkt werden (Casneuf et al. 2017). Eine weitere Beobachtung ist die Hochregulierung von Komplementinhibitoren wie CD55 und CD59, die Komplementfaktoren binden und so die CDC blockieren könnten. Obwohl die initialen Expressionslevel dieser Faktoren nicht relevant schienen, zeigte sich eine Hochregulation vor allem bei refraktären Patienten (Nijhof et al. 2015). Diese Daten machen deutlich, dass trotz der Verbesserung der Therapie durch Daratumumab weiterhin nach neuen Therapieoptionen gesucht werden muss.

1.4. Fc-abhängige Tötungsmechanismen

1.4.1. Komplement vermittelte Zytotoxizität (CDC)

Bei der Komplement vermittelten Zytotoxizität (CDC) erfolgt die Tötung der Zielzelle über die Aktivierung der körpereigenen Komplementkaskade. Das Komplementsystem besteht aus einer Reihe von löslichen oder Membran gebundenen Proteinen (C1-C9), die überwiegend als Proenzyme vorliegen. Nach der Spaltung des Proenzyms entfalten die entstehenden Untereinheiten ihre enzymatischen Aktivitäten und ihre Effektorfunktionen (Mathern und Heeger 2015). Die Aktivierung der Kaskade kann über drei Wege erfolgen. Der klassische Weg beginnt mit der Bindung von Antikörpern auf der Zielzelle. An die Fc-Teile der membrangebundenen Antikörper kann der erste Komplementfaktor C1q binden und die Kaskade in Gang setzen. C1q ist ein Hexamer und hat damit sechs kreisförmig angeordnete Bindungsstellen. Je mehr Bindungsstellen gleichzeitig an Fc-Teile von Antikörpern binden, desto stärker ist die Aktivierung der Kaskade. Dieser Umstand erklärt, warum keine wahllose Aktivierung erfolgt, obwohl Antikörper und C1q stets gleichzeitig im Blut gelöst sind. Erst die Bindung mehrerer Antikörper an eine Zielzelle und die Ausrichtung der Fc-Teile in Form eines Hexamers führt zur Bindung und Aktivierung des C1q (Diebolder et al. 2014).

Neben dem klassischen Weg gibt es den so genannten Lektin-Weg. Das Mannose bindende Lektin (MBL) ist ebenfalls ein Hexamer und bindet Mannose, ein Zucker, der sich auf pathogenen Oberflächen wie bakteriellem Peptidoglykan befindet. Durch diese Bindung kommt es zur Aktivierung von Serin-Proteasen (MASP-1 bis 3), die analog zu C1q den ersten Schritt der Komplementkaskade katalysieren (Mathern und Heeger 2015). Zudem gibt es noch den alternativen Weg, welcher mit dem spontanen Zerfall von Komplementfaktor C3 in C3a und C3b beginnt. C3b bindet auf Strukturen der Zielzelle und setzt so die Komplementkaskade fort (Mathern und Heeger 2015). Nach Aktivierung der Kaskade auf einem der drei Wege, erfolgen mehrere Spaltungsschritte, an dessen Ende der Membranangreifende Komplex (MAC) steht (Abb. 1). Der MAC bildet eine Pore in der Zellmembran, durch die Wasser eindringt und die Zielzelle lysiert (Mathern und Heeger 2015). Damit durch

spontane Komplementaktivierung keine gesunden körpereigenen Zellen getötet werden, hat der Körper Abwehrmechanismen entwickelt. Die löslichen Faktoren H und I inaktivieren C3b (Makou et al 2013). Zudem exprimieren Zellen auf ihrer Oberfläche Regulatorproteine wie CD55, die durch Hemmung der C3-Konvertase ebenfalls C3b inaktivieren können. Pathogene Oberflächen haben diese Abwehrmechanismen in der Regel nicht (Fujita et al. 1987). Ein Problem stellen unter anderem Tumorzellen dar, welche aus körpereigenen Zellen entstehen und daher ebenfalls Abwehrmechanismen besitzen können. Neben CD55 spielt hierbei vor allem CD59 eine Rolle, welches C8 bindet und damit die Formierung des MAC verhindert (Ricklin et al 2010). In mehreren in vivo Experimenten konnte bereits gezeigt werden, dass Tumorzellen, welche geringere Mengen an CD55 und CD59 exprimieren ein besseres Ansprechen in Zytotoxizitätsassays aufweisen (Nijhof et al 2016).



Abb. 1: Schematische Darstellung der Komplement vermittelten Zytotoxizität (CDC). Nach Bindung von Antikörpern (mAb) an Zielantigene auf der Zelloberfläche, bindet der Faktor C1q an die Fc-Teile und setzt damit die Komplementkaskade in Gang. Nach Spaltung mehrerer Komplementfaktoren, entsteht der Membran angreifende Komplex, der eine Pore bildet und durch Einstrom von Wasser zur Lyse der Zelle führt. CD55 und CD59 hemmen die Kaskade (Abbildung angelehnt an Königsdorf 2016).

1.4.2. Antikörper abhängige zelluläre Zytotoxizität (ADCC)

Bei der Antikörper abhängigen zellulären Zytotoxizität (ADCC) führt die Bindung der Antikörper an die Zielzelle zu einer Aktivierung von Natürlichen Killerzellen, die Fcg-Rezeptoren wie CD16 (FcgRIIIa) besitzen (Wang et al. 2015). Diese Rezeptoren binden die Fc-Teile der Antikörper auf der Zielzelle, wodurch eine intrazelluläre Kaskade in Gang gesetzt wird, die dann zur Ausschüttung von Vesikeln mit Perforinen und Granzymen führt. Perforine bilden Poren in der Zielzelle wodurch die ebenfalls ausgeschütteten Granzyme in die Zielzelle eindringen können. In der Zielzelle üben die Granzyme, vornehmlich Ganzym B, ihre Proteaseaktivität aus und spalten unter anderem Caspase 7 und 3. Dieses führt zur Aktivierung der Caspasen und zum Tod der Zelle (**Abb. 2**) (Bryceson et al. 2006, Afonina et al. 2010).



Abb. 2: Schematische Darstellung der Antikörper abhängigen zelluläre Zytotoxizität (ADCC).

Nach Bindung von Antikörpern an Membranstrukturen auf der Zielzelle binden Fcg-Rezeptoren auf NK-Zellen an die Fc-Teile. Durch Aktivierung einer intrazellulären Kaskade kommt es zur Freisetzung von Perforinen und Granzymen, die die Zielzelle töten (Abbildung angelehnt an Königsdorf 2016).

1.5. Nanobodies

Alle Wirbeltiere produzieren zur Immunabwehr Antikörper. Die meisten Antikörper der Säugetiere bestehen aus zwei leichten (LC) und zwei schweren Ketten (HC), die sich Y- förmig zusammenlagern (**Abb. 3**). Die leichte Kette besteht dabei aus einer variablen Domäne (VL) gefolgt von einer konstanten Domäne (CL). Die schwere Kette besitzt ebenfalls eine variable Domäne (VH) und einem konstanten Teil bestehend aus 3 konstanten Domänen (CH1, CH2 und CH3). Die CH1 Domäne wird über eine hinge Region mit CH2 und CH3 verbunden, die zusammen den Fc-Teils des Antikörpers bilden (Chiu und Gilliland 2015). Der Fc-Teil ist für die Bindung von Effektozellen und C1q verantwortlich. Die beiden variablen Domänen (VL und VH) bilden zusammen die Antigenbindungsstelle. Jede der zwei Domänen besitzt dabei drei complementarity determining regions (CDR), die zusammen das Paratop, d.h. die Bindungsstelle des Antigens bilden. Die sechs CDRs bilden dabei eine relativ planare Bindungsfläche (Muyldermans et al 2013, Bannas et al 2017).

Neben konventionellen Antikörpern produzieren Tiere aus der Familie der Kamele so genannte Schwerekettenantikörper (Abb. 3). Schwerekettenantikörper haben im Laufe der Evolution ihre leichten Ketten und die CH1 Domäne verloren und bestehen daher nur aus zwei schweren Ketten, die jeweils eine einzige variable Domäne (VHH) besitzen, die direkt über eine hinge Region mit den konstanten Domänen (CH2 und CH3) verbunden ist (Wesolowski et al 2009, Muyldermans et al 2013). Die variable Domäne besitzt dabei ebenfalls drei CDRs, die für die Bindung des Antigens verantwortlich sind. Im Gegensatz zu konventionellen Antikörpern bildet die CDR3 der VHH jedoch häufig eine flexible, herausragende Schlaufe, die es ermöglicht auch in Vertiefungen des Zielantigens zu binden (Wesolowski et al 2009). Löst man die variable Domäne von seiner Konstanten, so erhält man einen Einzeldomänen-Antikörper, auch Nanobody genannt. Nanobodies bilden die kleinste antigenbindende Einheit mit einer Größe von ca. 16 kDa. Konventionelle Antikörper sind mit einer Größe von ca. 150 kDa in etwa 10x so groß. Auch die variablen Domänen von konventionellen Antikörpern lassen sich von ihren Konstanten lösen. Die VL und VH müssen dann über einen Linker verbunden werden und bilden ein so genanntes single chain variable fragment (scFv) mit ca. 35 kDa (Skerra et al 1988). Schwerekettenantikörper und Nanobodies haben einige Vorteile gegenüber konventionellen Antikörpern und ihren scFv. Aufgrund ihrer geringeren Größe zeigen Nanobodies eine bessere Gewebepenetration in vivo. Sie liegen zudem unterhalb der Filtrationsgrenze der Niere (80 kDa) und können damit renal ausgeschieden werden. Dieses führt zu einer schnelleren Eliminierung aus der Blutbahn, was insbesondere für diagnostische Zwecke von Vorteil sein kann (Bannas et al. 2015). Im Gegensatz zu konventionellen Antikörpern, die relativ planar auf ihrem Antigen binden, sind Nanobodies zudem in der Lage, mit ihrer CDR3 Schleife in Vertiefungen zu binden. Dieses ermöglicht die Bindung in aktiven Zentren von Enzymen oder anderen schwer zugänglichen Regionen des Antigens (Fumey et al. 2017, Muyldermans et al. 2013).

Des Weiteren sind Nanobodies sehr gut löslich und stabil. Sie lassen sich relativ einfach produzieren und auch modifizieren. Aufgrund der guten Löslichkeit der einzelnen Domänen ist es viel einfacher, mehrere Nanobodies aneinander zu reihen und bi- oder multivalente Konstrukte zu erzeugen, als mit den scFv konventioneller Antikörper (Fumey et al. 2017).



Abb. 3: Schematische Darstellung eines konventionellen Antikörpers gegenüber eines Schwerekettenantikörpers.

Der konventionelle Antikörper besteht aus zwei leichten (hellblau) sowie zwei schweren Ketten (dunkelblau). Die leichte Kette besteht dabei aus einer variablen Domäne (VL) und einer konstanten Domäne (CL), die mit der schweren Kette verbunden ist. Die schwere Kette besitzt eine variable Domäne (VH) und drei konstante Domänen (CH1,CH2,CH3), die über eine hinge Region verbunden sind. CH2 und CH3 bilden zusammen das Fc-Teil, welches für die Bindung von Effektorzellen oder Enzymen benötigt wird. Beide variablen Domänen zusammen bilden die Antigen-bindende Einheit (VL +VH). Diese Einheit kann künstlich als so genanntes single chain variable fragment (scFv) erzeugt werden. Ein Schwerekettenantikörper besteht hingegen nur aus zwei schweren Ketten (grün), die zudem ihre erste konstante Domäne (CH1) verloren haben. Die Antigen-bindende Einheit wird nur von einer einzelnen Domäne gebildet (VHH), die auch Nanobody genannt wird.

1.6. Aktueller Stand der Forschung auf dem Gebiet der CD38 spezifischen Nanobodies Unsere Arbeitsgruppe hat CD38 spezifische Nanobodies aus immunisierten Lamas gewonnen (Fumey et al 2017). Aus den Blutlymphozyten der Tiere wurden mittels PCR-Amplifikation der VHH Regionen Phagen-Displaybibliotheken erstellt (Wesolowski et al. 2009). Aus diesen Bibliotheken wurden spezifische Binder an hCD38-exprimierenden Lymphozyten selektiert und sequenziert. Klone, die mehrfach vorkamen oder sich lediglich in wenigen Aminosäuren unterschieden, wurden als Familie definiert. Auf diese Weise konnten 22 Familien von CD38-spezifischen Nanobodies mit unterschiedlicher Länge der CDR3 Region selektiert werden (Fumey et al. 2017). Aus jeder Familie wurde der bestbindende Nanobody ausgewählt und seine kodierende Region in einen eukrayotischen Expressionsvektor kloniert (pCSE2.5). Dieser Vektor ermöglicht die effektive Produktion der Nanobodies in transient transfizierten HEK-6E Zellen (Schirrmann et al. 2010). Nach Produktion und Aufreinigung dieser Nanobodies wurden ihre Eigenschaften analysiert. Neben der spezifischen Bindung an CD38 zeigten einige Nanobodies eine aktivierende oder inhibierende Wirkung auf die enzymatische Aktivität von CD38 (Fumey et al. 2017). Durch Kreuzblockadeassays wurde gezeigt, dass die Nanobodies an drei unterschiedliche Epitope auf CD38 binden. Vier der 22 Familien binden zudem unabhängig von Daratumumab (Fumey et al. 2017). Kürzlich konnte unserer Arbeitsgruppe CD38-spezifische, Nanobody basierte chimären Antigen Rezeptoren (CAR) konstruieren und in die Effektor-Zelllinie NK92 einbringen, die danach spezifisch CD38 positive Tumorzellen abtöten konnte (Hambach et al. 2020).

Auch die Arbeitsgruppe um Yong Juan Zhao erforscht die von unserer Arbeitsgruppe sowie selbst entwickelte CD38-spezifische Nanobodies. Durch Kokristallisation einiger Nanobodies mit CD38, konnten teils sehr nah beieinander liegende Epitope ausgemacht werden (Li et al. 2016). Die Kopplung einzelner Nanobodies an die Effektordomänen des Pseudomonas Toxins ETA ermöglichte die selektive Tötung CD38 positiver Zellen (Li et al. 2016). Ein von dieser AG konstruierter CD38 spezifischer Nanobody-CAR, der in T-Zellen eingebracht wurde, konnte spezifisch CD38 exprimierende Tumoren in vitro und in vivo abtöten (An et al. 2018).

In der vorliegenden Arbeit werden CD38 spezifische Nanobodies zur Herstellung und Charakterisierung von mono-und biparatopischen Schwerekettenantikörpern eingesetzt.

2. Material und Methode

2.1. Materialien

2.1.1. Antikörper

In den verschiedenen Versuchen wurden teils selber hergestellte, teils kommerziell erworbene Antikörper zur Anfärbung verwendet.

Name	Zielantigen	Herkunft	Fluorochro	Klon	Herstellung
			m		
Anti CD38	hCD38	Maus	FITC	HIT2	eBioscience
Anti CD45	hCD45RA	Maus	PE	HI100	BioLegend
Anti CD56	hCD56	Maus	PE cy7	B159	Thermo Fisher
Anti CD55	hCD55	Maus	PE	IA10	BD
Anti CD59	hCD59	Maus	PE	P282(H19)	BD
AntiCD16	hCD16	Maus	APC Cy7	3G8	BioLegend
Anti mCD16	mCD16/32	Ratte	unkonj	2.4G2	BioXCell
Anti rtIgG	rt IgG H+L	Affe	PE	-	Dianova
Anti CD19	hCD19	Maus	FITC	HIB19	Stemmcell
36 his	hCD38	Lama 6hismyc	AF647	1-8.2a	AG Nolte
36 hcAb	hCD38	Lama hIgG1	AF647	1-8.2a	AG Nolte
211 his	hCD38	Lama 6hismyc	AF647	s-16a	AG Nolte
211 hcAb	hCD38	Lama hIgG1	AF647	s-16a	AG Nolte
1067 his	hCD38	Lama 6hismyc	AF647	1-19.2a	AG Nolte
1067 hcAb	hCD38	Lama hIgG1	AF647	1-19.2a	AG Nolte

211-121 his	hCD38	Lama	AF647	s-16a und 1-	AG Nolte
		6hismyc		17a	
211-121 hcAb	hCD38	Lama hIgG1	AF647	s-16a und 1-	AG Nolte
				17a	
1-15 his	CDTA	Lama	AF647	1-15	AG Nolte
		6hismyc			
1-15 hcAc	CDTA	Lama hIgG1	AF647	1-15	AG Nolte
scFv Dara his	hCD38	Synthetisch	AF647	Daratumuma	AG Nolte
		6hismyc		b	
scFv Dara	hCD38	Synthetisch	AF647	Daratumuma	AG Nolte
hcAb		hIgG1		b	
Daratumumab	hCD38	Synthetisch	Unkonj.	Daratumuma	AG Nolte
		hIgG1		b	
Darzalex	hCD38	Transgene	Unkonj	Daratumuma	Janssen-
		Maus hIgG1		b	Cilag AG

2.1.2. Primer

Alle verwendeten Primer wurden eigenständig anhand der Targetsequencen designt und bei Sigma-Aldrich produziert.

Bezeichnung	Sequenz	Schnittstellen
f.211_KS	CACTCCATGGCAGAGGTGCAATTGG	NcoI
r.211_18GS_B	GCGAGGATCCGCCGCCGCCGCCGCCGCCGCC	BamHI
amHI_KS	ACCTGAGCCCCCACCCCACTACCTCCCCGC	
	CCTTGGGTTCTGAGGAGACGGTGACC	
r.121_KS	GCGAGCGGCCGCTGAGGAGACGGTGACCTGG	NotI
	GTC	
FC_CH2_rev	TCCACCACGCATGTGACC	-

1067_f_15GS	TCGCGGATCCGGCGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGG	BamHI
1067_f_0GS_ BAM	TCGCGGATCCATGGCCGATGTGCAGCTGCAGC AG	BamHI
1067_f_10GS	TCGCGGA TCC GGC GGG GGA GGT AGT GGG GGT GGG GGC TCA ATG GCC GAT GTG CAG CTG CAGCAG	BamHI
36 PCI I for	TCGGACATGTCCCAGGTGCAACTG	PciI
36_r_18GS	GCGAGGATCCGCCGCCACCGCTGCCGCCGCC ACCTGAGCCCCCACCCCCACTACCTCCCCCGC CTGAGGAGACGGTGACCTGGGTCCC	BamHI
36_r_3GS	GCGAGGATCCTCCCCCGCCTGAGGAGACGGT GACCTGGGTCCC	BamHI
36_r_8GS	GCGAGGATCCCCCACCCCACTACCTCCCCCG CCTGAGGAGACGGTGACCTGGGTCCC	BamHI
121_f_15GS	TCGCGGATCCGGCGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGG	BamHI
121_f_0GS_B AM	TCGCGGATCCATGTCCGATGTGCAGCTGCAGG	BamHI
121_f_10GS	TCGCGGATCCGGCGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGG	BamHI
sgRNA_Rv Primer	AAAAAGCACCGACTCGGTG	-
CMV_for	CGCAAATGGGCGGTAGGCGTG	-
BGH_rev	TAGAAGGCACAGTCGAGG	-

2.1.3. Enzyme

Bam H1 (20.000 U/ml)	New England Biolabs,
NcoI	New England Biolabs
NotI	New England Biolabs
PciI	New England Biolabs
Polymerase	New England Biolabs
T4-Ligase	New England Biolabs
Antarktische Phosphatase	New England Biolabs

2.1.4. Chemikalien

2xYT	BD/Gibco
Alpha MEM	Gibco
Agarose	Invitrogen
Aqua ad iniectabilia	Braun
BSA	New England Biolabs, Schwalbach
Carbenicillin	Serva
Coomassie Färbelösung	Invitrogen
DMSO	Sigma
DNA-Ladepuffer, 6x	Fermentas
DTT	Invitrogen
eFluor450	eBioscience
F17	Gibco
Ficoll.Paque PLUS	GE Healthcare
Fötales Kälberserum (FCS)	Biochrom
Freestyle 293 Medium	Gibco
Gel-Dry Drying Solution	Invitrogen

Geneticin (G418)	Gibco
Humanes Serum (gepoolt)	AG Nolte
Imidazol	Novex
Interleukin 2 (IL2)	Novartis
JetPEI	Polyplus
KOD-Buffer	Novagen
L-Glutamin	Gibco
Ladepuffer 6x	Fermentas
LB Agar	BD/Difco
Luciferin	Biosynth
Methanol	J.T. Baker
MgSO4	Novagen
Natriumchlorid	Sigma
Natriumpyruvat	Gibco
Ni-NTA	Sigma-Aldrich
NuPAGE antioxidant	Invitrogen
NuPAGE sample reducing agent, 10x	Invitrogen
NuPAGE SDS-PAGE sample buffer, 4x	Invitrogen
PBS	Gibco
Pluronic	BASF
Propidiumiodid	Sigmar
Protein A	GE Healthcare
Protein G	GE Healthcare
Puromycin	InvitroGen
Roti-safe	Roth

RPMI 1640	Gibco
50x TAE-Puffer	AppliChem
Trypsin, 10x	Invitrogen
Tryptone	Organo Technie

2.1.5. Lösungen

alpha MEM Komplettmedium	500ml alpha MEM, 10% FCS, 10% Pferdeserum, 1% L-Glutamin, 5ng/ml IL2		
Einfriermedium	50% FCS, 40% Medium komplett, 10% DMSO		
F17 Komplettmedium	500mL F17, 2% L-Glutamin, 0,1% Pluronic, 1% FCS, 0,005% G418		
F17 Transfektionsmedium	500ml F17, 2% L-Glutamin, 0,1% Pluronic		
Feeding Medium	250mL Transfektionsmedium, 20% Tryptone		
RPMI Komplettmedium	500ml RPMI 1640, 5% FCS, 1% L-Glutamin, 1% Natriumpyruvat		
SOC Medium	0,5 % Hefeextrakt, 2 % Trypton, 10mM NaCl, 2,5 mM KCl, 10 mM MgCl2, 10mM MgSO4, 20mM Glukose		
Luciferin-Arbeitslösung	10μl Luciferin (Stock 30μg/μl) auf 2ml PBS (working solution 150μg/ml)		

2.1.6. Zellen

Name	Zelltyp	Herkunft	Marker
Amo1	Plasmozytom	DSMZ Nr.: ACC-538	CD38+, CD56+, CD45-, CD55+, CD59(+)
EJM	Multiples Myelom	DSMZ Nr.: ACC-560	CD38+, CD56-, CD45 (+), CD55+, CD59+

CA-46	Burkitt Lymphom	DSMZ Nr.: ACC-73	CD38+, CD56-, CD45+, CD55-, CD59-
Daudi	Burkitt Lympkom	DSMZ Nr.: ACC-78	CD38+, CD56-, CD45+, CD55(+), CD59-
LP-1	Multiples Myelom	DSMZ Nr.: ACC-41	CD38+, CD56-, CD45-, CD55(+), CD59-
KMS-12-BM	Multiples Myelom	DSMZ Nr.: ACC-551	CD38+, CD56-, CD45-, CD55+, CD59+
RPMI-8226	Multiples Myelom	DSMZ Nr.: ACC-402	CD38+, CD56+, CD45-, CD55+, CD59+
U-266	Multiples Myelom	DSMZ Nr.: ACC-9	CD38(+), CD56-, CD45+, CD55(+), CD59+
SAT	Kopf-Hals-Tumor	Bereitgestellt von AG Binder	CD38- , EGFR+
NK-92	Natürliche Killerzellen	DSMZ Nr.: ACC-488	CD38+, CD56+, CD45+, CD55-, CD59-
НЕК293-6Е	Embyonale Nierenzellen	Bereitgestellt von AG Schirrmann	
YAC-1	Murine Lymphomzellen	DSMZ Nr. ACC96	

2.2. Methoden

2.2.1. Molekularbiologische Methoden

2.2.1.1. Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Bei der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) werden DNA-Fragmente vervielfältigt. Dieses wird durch spezifische Primer erreicht, die sich an den 3' Enden der komplementären DNA Stränge, am "vorderen" (FW) und "hinteren" (RV) Ende anlagern (Annealing). Die DNA-Polymerase fügt anschließend die komplementären Nukleotide (dNTPs) der DNA-Matritzen

an. Dadurch wird das DNA-Fragment als Komplementärstrang verdoppelt. Das so gebildete Fragment dient im nächsten Zyklus als erneute Vorlage für weitere Replikationen. Auf diese Weise entsteht eine exponentielle Vervielfältigung des gewünschten DNA Abschnitts (Mullis KB 1990). In dieser Arbeit wurde die PCR für die Klonierung verschiedener Nanobody-Konstrukte verwendet. Die spezifischen Primer sind in Abschnitt 4.1.2. aufgezeigt. Für die Reaktion wurden 20 μ l Ansätze mit folgender Zusammensetzung angesetzt:

- 2 µl KOD HOT Puffer
- 2 μl dNTP
- 1,2 μl MgSo4
- 1 µl FW Primer
- 1 µl RV Primer
- 0,5 µl Polymerase
- 10 ng DNA in 1µl
- 11,5 μl H2O

Die Ansätze wurden anschließend im Thermocycler bei folgendem Programm vervielfältigt:

1.Initiale Denaturierung der dsDNA	95°C für 2 min	
2.Denaturierung	95°C für 20 sec	
3. Annealing	*°C für 30 sec	35 Zyklen Abschnitt 2 - 4
4.Elongation	70°C für 40 sec	
5.Finale Elongation	70°C für 7 min	
6.Pause	4°C	

*Die Annealingtemperaturen variieren je nach eingesetztem Primerpaar. Herkömmliche Primerpaare wurden bei 50-55°C angelagert, Primerpaare mit angehängten GS-Linker benötigten eine Annealingtemperatur von 56,5°C oder 70°C.

2.2.1.2. Agarose-Gelelektrophorese

Bei der Gelelektrophorese werden DNA und RNA Fragmente der Größe nach aufgetrennt und können so isoliert werden. Die negativ geladenen DNA Fragmente wandern im elektrischen Feld vom Minus- zum Pluspol. Das Agarose-Gel bildet dabei durch seine Poren eine Art Sieb, durch das größere Fragmente schwerer hindurch kommen als kleinere. Die kleineren Fragmente wandern dadurch schneller, was eine Größenauftrennung ermöglicht (Milan Bier 1959). Durch einen Marker mit bekannten Bestandteilen, können dann die Fragmentgrößen abgeschätzt werden. In dieser Arbeit wurde die Gelelektrophorese zur Aufreinigung von PCR-Produkten und Plasmiden nach Restiktionsverdau genutzt. Hierfür wurde ein 1 %iges Agarose-Gel durch Aufkochen von 1 g Agarose-Pulver in 100 ml TRIS-Acetat-Methoden EDTA (TAE)-Puffer gegossen. Dem Gel wurde außerdem 4 μ l Roti-Safe (Roth) hinzugefügt, welches sich später an die DNA anlagert und diese dadurch im UV-Transilluminator sichtbar macht. 20 μ l Proben versetzt mit 4 μ l 6x Loading Dye (NEB) wurden in die Kammern geladen und für 30-60 min bei 80-120 V laufen gelassen. Die DNA Banden wurden anschließend unter UV-Licht sichtbar gemacht und fotodokumentiert. Für die weitere Verwendung wurden die DNA Fragmente aus dem Gel ausgeschnitten und mittels Gelextraktions Kit (Macherey-Nagel) aufgereinigt.

2.2.1.3. Transformation von E. coli

Bei der Transformation von E. coli wird freie DNA (Plasmide) in kompetente Bakterien übertragen, um diese zu vermehren. Hierfür wurden 10 ng DNA zu 50 µl kompetenten E. coli Bakterien (Stamm XL1-blue, Agilent) gegeben und für 30 Minuten bei 4°C inkubiert. Anschließend erfolgte ein 30-sekündiger Hitze-Schock der Bakterien bei 42°C mit anschließender Inkubation für 2 Minuten auf Eis um die Aufnahme der DNA in die Bakterien zu erhöhen. Den Bakterien wurde dann vorgewärmtes SOC-Nährmedium hinzugegeben und für eine Stunde bei 37°C geschüttelt. Anschließend wurden sie auf Ampicillin beinhaltende LB-Agar-Platten ausgestrichen und bei 37°C über Nacht inkubiert. Die inokulierten Plasmide beinhalten eine Ampicillin-Resistenz, sodass nur diejenigen Bakterien wachsen, die das Plasmid aufgenommen haben. Am nächsten Tag wurden Kolonien gepickt und in Ampicillin beinhaltendes LB-Medium übertragen und über Nacht herangezogen. Anschließend wurde mittels DNA Mini Kit (Qiagen) die Plasmide aus den Bakterien isoliert.

2.2.1.4. DNA Sequenzierung nach Sanger

Bei der DNA Sequenzierung wird die Nukleotidabfolge eines DNA Abschnittes ermittelt. Die Kettenabbruch-Methode entwickelte Frederick Sanger um 1975. Hierbei wird mittels eines Primers eine lineare Kopie des gewünschten DNA-Abschnitts erstellt. Abweichend zu einer herkömmlichen PCR, erfolgen jeweils vier gleiche Ansätzen parallel, in der neben den normalen Nukleotiden jeweils eine der vier Basen so verändert wurde, dass nach ihrem Einbau ein Kettenabbruch erfolgt. Auf diese Weise entstehen viele unterschiedlich lange Fragmente, die am Ende in jedem Ansatz immer mit der gleichen, bekannten Base enden (Sanger et al. 1977). In neueren Methoden werden die vier Nukleotide mit unterschiedlichen fluoreszierenden Farbstoffen markiert, sodass am Ende eine Farbfolge entsteht, die in die entsprechenden Basen übersetzt werden kann. Die DNA-Sequenzierung der Plasmide in dieser Arbeit erfolgte durch eurofins Genomics nach Einsendung von 500 ng Plasmid mit einem passenden Primer.

2.2.1.5. Klonierung von biparatopischen hcAb

Die Klonierung der biparatopischen hcAb erfolgte in drei Schritten. Zunächst wurden die kodierenden Regionen für die Nanobodies mit Primern in einer PCR Reaktion vervielfältigt und um einen GS-Linker ergänzt. Die "vordere" (5') Nanobody-Sequenz wurde dabei mit einem einfachen forward Primer, der eine NcoI oder PciI Schnittstelle enthält und einem reverse Primer, der ein Teil des GS-Linkers und eine BamHI Schnittstelle enthält vervielfältigt. Die "hintere" (3') Nanobody-Sequenz wurde mit einem forward Primer, der eine BamH1 Schnittstelle, gefolgt von einem Teil des GS-Linkers und einem einfachen reverse Primer mit NotI Schnittstelle (2.1.2.) vervielfältigt. Die PCR wurde unter Verwendung von 10 ng DNA in einem Gesamtvolumen von 20 µl und einer Annealingtemperatur von 56,5°C durchgeführt. Die erzeugten Nanobody-kodierenden DNA Fragmente wurden mittels Gelelektrophorese aufgetrennt, aufgereinigt und ihre Konzentration mittels Spektrophotometer Nanodrop 2000c (PEQLAB Biotechnologie GmbH) bestimmt.

Als zweiter Schritt der Klonierung erfolgte ein Restriktionsverdau der PCR Produkte und des pCSE2.5 Vektors, welcher bereits die kodierenden Regionen für die hinge, CH2 sowie CH3 Domäne von humanem IgG1 beinhaltet. Der Vektor wurde mittels NcoI/NotI, das PCR Fragment für den "vorderen" Nanobody mittels NcoI bzw. PciI/BamHI und das Fragment für den "hinteren" Nanobody mittels BamHI/NotI für 5h bei 37°C verdaut. Anschließend erfolgte eine Dephosphorylierung des Vektors mittels antarktischer Phosphatase bei 1h 37°C und 20min 65°C. Die geschnittenen Konstrukte wurden abermals mittels Gelelektrophorese aufgetrennt und aufgereinigt.

Im dritten Schritt der Klonierung wurde eine 3-fach Ligation durchgeführt. Dafür wurden je 30 ng der PCR-Produkte (vorderer und hinterer Nanobody) mit 100 ng Vektor vermischt und mit Hilfe der T4-Ligase für 14h bei 16°C zusammengefügt. Die Ligationsansätze wurden anschließend wie in **2.2.1.3.** beschrieben in Bakterien überführt und je 10 Klone zur weiteren

Aufreinigung gepickt. Die Klone wurden anschließend mittels CH2-rev Primer (TCCACCACCACGCATGTGACC) sequenziert und Klone mit richtiger Sequenz ermittelt. Diese Plasmide der biparatopischen hcAb wurden vervielfältigt und zur Produktion rekombinanter Antikörper wie in **2.2.2.1**. beschrieben eingesetzt.

2.2.2. Proteinbiochemische Methoden

2.2.2.1. Produktion von Schwereketten-Antikörpern in HEK293 6E Zellen

Zur Produktion von Schwereketten Antikörpern (hcAb) wurden HEK293 6E Zellen transient mit dem für das Konstrukt kodierendem Plasmid transfiziert. HEK293 6E Zellen sind humane eymbryonale Nierenzellen (DSMZ Nr. ACC-305), die als genetische Variante das Ebstein-Barr-Virus Kernantigen 1 (EBNA1) tragen und dadurch eine gesteigerte Proteinproduktion aufweisen (Durocher et al. 2002, Jäger et al. 2013). Alle Nanobodykodierenden Sequenzen wurden in pCSE2.5 Vektoren (AG Schirrmann, Braunschweig) kloniert. Die Vektoren sind für die Produktion in HEK-6E Zellen optimiert (Schirrmann et al. 2010). Einen Tag vor der Transfektion wurden die Zellen 1:10 geteilt um eine Überwucherung zu vermeiden. HcAb wurden dabei in F17 Medium wachsenden Kulturen, und 6his-myc tragende Konstrukte in Freestyle293 wachsenden Kulturen produziert. Zur Transfektion wurde das Kulturmedium durch das Transfektionsmedium (2.1.5.) ersetzt. Für eine T75 Flasche (~2 x 10^7 HEK-6E Zellen) wurden je 10 µg der hcAb-Plasmide mit 250 µg Medium und 25 µl JetPEI (Polyplus) mit 250 µl Medium gemischt. Das JetPEI wurde vorsichtig auf die DNA gegeben, gemischt und für 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde das Gemisch vorsichtig zu den Zellen gegeben. Polyethylenimin (PEI) ist ein positivgeladenes Polymer, dass die DNA bindet und sich dann an der negativgeladenen Zelloberfläche anlagert. Dieses begünstigt das Einbringen der DNA in die Zelle (Boussif et al. 1995). Die so transient transfizierten Zellen fangen an die DNA abzulesen und die Proteine zu produzieren, die schließlich in den Überstand abgegeben werden. Einen Tag nach der Transfektion wurde den Zellen ein Feeding-Medium (2.1.5) zugegeben und die Zellen anschließend für weitere 5-6 Tage kultiviert. Anschließend wurde die Zellen abzentrifugiert, der Überstand abgenommen und sterilfiltriert. Der Produktionserfolg wurde mittels SDS-PAGE überprüft. Zur Produktion von konventionellen Antikörpern ist eine Ko-Transfektion der Plasmide für die leichte und schwere Kette notwendig. Dieses erfolgte in einem Verhältnis von 1:2 (1/3 LC, 2/3 HC) mit einer Gesamt-DNA-Menge von 10 µg. Das übrige Protokoll ist identisch.

2.2.2.2. Aufreinigung von hcAb

Die in HEK Zellen produzierten hcAb (2.2.2.1.) befinden sich nach der Produktion im Überstand, der noch weitere Proteine und Peptide beinhaltet. Für die Konjugation an Fluorochrome ist deshalb eine Aufreinigung nötig. Über den Fc-Teil von IgG1 ist eine gezielte Affinitätsreinigung an Protein A möglich. Hierzu werden 30 ml hcAb-Überstand über eine 1 ml Protein-A Agarose-Säulen gegeben (GE Healthcare). Nicht gebundene Bestandteile werden anschließend mit PBS weggewaschen. Nun werden die hcAb über eine pH-Änderung durch Zugabe von saurem Puffer (0,1 M Glycin-HCl, pH 2,7) wieder abgelöst und in Neutralisationspuffer (1 M Tris HCl, pH 9) aufgefangen (Kronvall et al. 1969, Hucholi et al. 1988,Spriestersbach et al. 2015). Abschließend werden die aufgereinigten Konstrukte mittels Gelfiltration über eine PD-10 Säule (Sigma-Aldrich) in PBS umgepuffert. Die Integrität und Reinheit der aufgereingten hcAb wird mittels SDS-PAGE überprüft, die gereinigten Proteine bei -80°C gelagert.

2.2.2.3. SDS-PAGE und Coomassie-Färbung

Zur Überprüfung von Produktionserfolgen und Aufreinigungen wurden Proteine mittels SDS-PAGE (sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis) größenfraktioniert und mit Coomassie gefärbt. Hierfür wurden 10 µl Zellüberstände oder 1 µg aufgereinigtes Protein in 10 µl H2O mit 10 µl 2x NuPAGE Lade Puffer (Invitrogen) gemischt und für 15 Minuten bei 70°C inkubiert. Die Proben wurden dann in die Taschen des 12 %igem NuPAGE Bis-Tris Gels (Invitrogen) aufgetragen, mit MES-Laufpuffer umhüllt und eine elektrische Spannung von 200V erzeugt. Die Proteine wandern entsprechend ihrer Größe unterschiedlich schnell durch das Gel (Laemmli et al. 1970). Als Vergleich wird ein Marker mit bekannten Bestandteilen (Albumin 1 µg 65 kDA, IgH 0.5 µg 50 kDA, IgL 0.25 µg 25 kDA, Lysozyme 0.1 µg 14 kDA) beigefügt. Nach ca. 30 Minuten wird das Gel aus der Kammer genommen und gefärbt. Die Färbung erfolgt mittels Novex colloidal blue staining Kit (Invitrogen) über Nacht bei Raumtemperatur. Die Lösung färbt dabei die Proteinbanden an. Um den Hintergrund zu minimieren, wurde für 6-8 h in deionisiertem Wasser entfärbt.

2.2.2.4. Kopplung von Nanobodies und Antikörpern an AlexaFluor647

Um die produzierten Proteine für die Durchflusszytometrie verwenden zu können, wurden sie ungerichtet über Amino-Gruppen an AlexFluor647 gekoppelt (Feller et al. 2008, Szabó et al. 2018). Zur Konjugation wurde 1 ml (2 µg/ml) aufgereinigter Antikörper mit AlexaFluor647 NHS-Ester (Thermo Fisher) gemischt und für eine Stunde bei

Raumtemperatur inkubiert. Anschließend erfolgte die Abtrennung der konjugierten Proteine von freiem Fluorophor über eine Gelfiltrationssäule. Zur Qualitätskontrolle der erzeugten Jugate wurden Verdünnungsreihen erstellt und je 5x10^5 positive und 5x10^5 CD38 negative Zellen für 30 min bei 4°C angefärbt. Nach zweifachem Waschen mit PBS erfolgte die Messung der Fluoreszen in der Durchflusszytometrie. Die konjugierten Proteine wurden anschließend bei 4°C in lichtdichten Röhrchen gelagert.

2.2.3. Zellbiologische Methoden

2.2.3.1. Zellkultur

Die Kultivierung und Teilung der Zellen erfolgte stets unter sterilen Bedingungen. Vor jeder Teilung wurden die Zellen mikroskopisch auf Kontamination durch Bakterien oder Hefen überprüft. Die Kultivierung erfolgte dabei in 10 ml Medium in Petrischalen oder T75 Kulturflaschen bei einer konstanten Temperatur von 37°C und 5% CO2 Gehalt. LP-1 Myelom-Zellen sowie CA-46 und Daudi Burkitt Lymphomzellen wurden in RPMI Komplettmedium, NK-Zellen in alpa-MEM Komplettmedium und HEK293 6E Zellen in F17 Komplettmedium oder Freestyle293 Medium kultiviert (**2.1.5.**). Alle zwei bis drei Tage erfolgte eine Teilung von 1:5 oder 1:10 durch Umsetzen der Zellen in neues Medium. Den Luziferase transduzierten Zellen wurde zur Selektion Puromycin (0,1 mg/10 ml) zugegeben.

2.2.3.2. Transduktion von Tumorzellen mit Luciferase

Um die Zelllinien für spätere Bioluminescenzversuche nutzbar zu machen, wurden Expressionskassetten für die Reporterproteine Luciferase und GFP lentiviral in die Zellen eingebracht. Dieses erfolgte durch Dr. Kristoffer Rieken unter der Verwendung des Packagingplasmides LeGo-iG2-Puro+Luc (AG Fehse, UKE, Hamburg) wie in der Literatur beschrieben (Weber et al. 2008). Die Produktion der Lentiviren erfolgte durch Ko-Transfektion von HEK Zellen mit 4 Plasmiden, auf denen die für die Virusreproduktion benötigten Proteine kodiert sind. Durch die Aufteilung der Proteine auf mehrere Plasmide, ist das Virus reproduktionsinkompetent und lässt sich nur durch Zusammenbringen aller Plasmide vervielfältigen. Das Hüllplasmid (Envelope: phCMS-VSV-G, Winfried Beyer) kodiert dabei die Hülle. Das Gag/Pol-Plasmid (pMDLg/pRRE , Addgene) kodiert die Matrix-, Kapsid- und Nukleokapsidproteine, sowie die viralen Enzyme Reverse Transkiptase, Protease und Integrase. Das REV-Plasmid (pRSV_Rev, Addgene) enthält Teile des HIV-1 rev und dient der Regulation der Proteinexpression. LeGo-iG2-Puro+Luc (AG Fehse) kodiert die Luciferase und das GFP innerhalb zweier LTR-Regionen. Die Long

terminal Repeads (LTRs) flankieren dabei die Region, die später in die genomische DNA integriert wird (Weber et al. 2013). Da nur das LeGo-iG2 Plasmid LTRs besitzt, werden später auch nur die Luciferase und GFP kodierenden DNAs in die transduzierten Zellen integriert. Nach Transfektion der HEK Zellen mit den Plasmiden, produzieren diese Viruspartikel und geben sie in den Überstand ab. Dieser wird nach 48 h geerntet und über Ultrazentrifugation bei 20.000 g über 4 h aufkonzentriert. Anschließend wurden unter sterilen Bedingungen 4x10^5 LP-1, CA-46 oder Daudi in 500 µl RPMI Komplettmedium in 16-Well Platten ausgesät. Nun wurden pro Well entweder kein, 1 µl, 10 µl oder 100 µl Virusüberstand sowie 8 µl Polybren hinzugegeben und für 1 Stunde bei 1000 g und Raumtemperatur zentrifugiert, um die Transduktionswahrscheinlichkeit zu erhöhen. Anschließend wurden die Zellen bei 37°C und 5% CO2 im Brutschrank kultiviert. Ab Tag 5 erfolgte ein Selektionsdruck unter Zugabe von Puromycin (0,1 mg/ml) und regelmäßiger Teilung. Der Transduktionserfolg wurde über die Bestimmung der GFP Expression mikroskopisch und mittels Durchflusszytometrie kontrolliert.

2.2.3.3. Erzeugung von CD38-defizienten Zelllinien

Um geeignete Negativkontrollen zu erstellen, wurde das CD38 kodierende Gen mittels der CRISPR/Cas9 Technologie inaktiviert. Hierbei erkennt eine 20 nt lange RNA Sequenz einen Abschnitt im CD38 Genlocus. Die Erkennungssequenz ist mit einer guide RNA gekoppelt, die die Cas9 Nuklease an diese Stelle leitet, welche dann einen Doppelstrangbruch induziert. Dieses führt bei fehlerhafter Reperatur zum knock out des Enzym-kodierenden Gens (Cong et al. 2013, Mali et al. 2013, Sander and Joung 2014). Für die Inaktivierung des CD38 Gens in LP-1, CA-46 und Daudi Zellen wurde ein kommerzielles Reagenz mit drei unterschiedlichen Plasmiden verwendet (Santa Cruz Biotechnology, Art.-Nr.: sc-401117-NIC). Diese Plasmide unterscheiden sich jeweils in ihrer 20 nt RNA-Erkennungs-Sequenz für den CD38 Locus. Durch Retransformation von E.coli (siehe 2.2.1.3.) wurde das Plasmid-Gemisch zunächst vervielfältigt und in seine drei Einzelplasmide getrennt. Hierfür wurden 1 µl des Plasmides (0,1 µg/µl) in 50 µl XL1-Blue Bakterien (Agilent) inokuliert. Die gewonnenen Klone wurden anschließend mit einem sgRNA reverse Primer (AAAAAAGCACCGACTCGGTG) sequenziert und anhand der Sequenzen den drei Plasmiden zugeteilt. Anschließend wurde eines der Plasmide mittels Transfektion unter Verwendung von 10 µg DNA (LP-1 luc, 2.2.3.2.) oder mittels Elektroporation unter Verwendung von 4 µg DNA (CA-46 luc, Daudi luc) in die Zellen gebracht. Die Elektroporation erfolgte bei 250 V und 950 µF. Nach drei-tägigem Wachstum wurden die Zellen schließlich auf CD38-Expression gefärbt. CD38-negative Zellen wurden mittels Durchflusszytometrie sortiert und in die laufende Kultur aufgenommen.

2.2.3.4. Transduktion von NK-92-Zellen mit Expressionskassetten für signaltransduktions-kompetente Fc-gRezeptoren (humanes und murines CD16)

Um Effektorzelllinien für die Durchführung des ADCCs zu generieren, wurden NK92-Zellen mit Expressionskassetten für humane oder murine FcgRIII/FceRI Fusionsproteine (hCD16, mCD16) transduziert. Die Konstruktion der Rezeptoren erfolgte dabei nach dem Vorbild von Clémenceau et al. 2006 und 2013. Für hCD16 wurden die kodierenden Regionen für die extrazelluläre Domäne von humanem FcgRIIIA (Nukleotide 1-219) und für die Transmembran- sowie intrazelluläre Domäne vom humanem FceRIγ (Nukleotide 83-283) aneinander fusioniert. Für mCD16 erfolgte die Verwendung der kodierenden Regionen für die extrazelluläre Domäne von murinem FcgRIII (Nukleotide 1-215) und der Transmembran- sowie intrazellulären Domäne des humanem FceRIγ. Beide Konstrukte kodierten zudem ein humanes Leader-Peptid (Clémenceau et al. 2006,2013). Den Konstrukten wurde zur späteren Klonierung in einen Vektor zudem die 5' Schnittstellen NotI und BamHI, sowie 3' EcoRI und NotI hinzugefügt. Die generierte Sequenz wurde von der Firma IDT synthetisch erzeugt und geliefert.

hCD16:

MWQLLLPTALLLLVSAGMRTEDLPKAVVFLEPQWYRVLEKDSVTLKCQGAYSPED NSTQWFHNESLISSQASSYFIDAATVDDSGEYRCQTNLSTLSDPVQLEVHIGWLLL QAPRWVFKEEDPIHLRCHSWKNTALHKVTYLQNGKGRKYFHHNSDFYIPKATLKD SGSYFCRGLFGSKNVSSETVNITITQGLAVSTISSFFPPGYPQLCYILDAILFLYGIVLT LLYCRLKVIQVRKAAITSYEKSDGVYTGLSTRNQETYETLKHEKPPQ

mCD16:

MWQLLLPTALLLLVSAGRQSAALPKAVVKLDPPWIQVLKEDMVTLMCEGTHNPG NSSTQWFHNWSSIRSQVQSSYTFKATVNDSGEYRCQMEQTRLSDPVDLGVISDWL LLQTPQRVFLEGETITLRCHSWRNKLLNRISFFHNEKSVRYHHYKSNFSIPKANHSH SGDYYCKGSLGSTQHQSKPVTITVQDPATTSSISLVWPQLCYILDAILFLYGIVLTLL YCRLKVIQVRKAAITSYEKSDGVYTGLSTRNQETYETLKHEKPPQ

Die Konstrukte wurden mittels Notl Verdau in den Gamma-Retroviralen Packagingvektor SF91-iGFP (**Abb. 4**, Retroviral Vector R780, Carol Stocking, Heinrich-Pette-Institute, Hamburg, Germany) kloniert und vervielfältigt. Der Vektor enthält neben dem synthetischen CD16 zusätzlich eine Sequenz für GFP zur späteren Selektion der transduzierten Zellen. Die anschließende Produktion der Retroviren sowie die Transduktion der NK-92 Zellen wurde freundlicher Weise durch Dr. Kristoffer Riecken unter der Verwendung der Plasmide (Envelope: phCMV-GALV-C_{4070A} (Mock et al. 2012), Gag/Pol: pcDNA3.MLV.gp (Addgene), Packaging: SF91.iGFP.pre-hCD16 oder mCD16) durchgeführt (siehe auch **2.2.3.2.**). Sieben Tage nach Transduktion wurden die Zellen mit einem für human CD16 oder maus CD16 spezifischen Antikörper angefärbt und in der Durchflusszytometrie gemessen. Die Zellen wurden auf GFP/CD16 positive Populationen sortiert und in die laufende Kultur aufgenommen.



Abb. 4: Schematische Darstellung des verwendeten Packaging-Plasmides SF91-iGFPpre.

Das etwas 7000 bp große Plasmid kodiert innerhalb zweier LTR-Regionen (pink) für das Reporterprotein GFP (grün). Die IRES und WPRE Regionen (grau) ermöglichen dabei eine hohe und unabhängige Expression. Über die NotI Schnittstelle (orange) kann der Vektor aufgeschnitten und gewünschte Inserts integriert werden. Die Ampicillinresistenz (gelb) dient als Selektionsmarker für die Vervielfältigung des Plasmides in Bakterien.

2.2.4. Immunologische Methoden

2.2.4.1. Durchflusszytometrie

Die Durchflusszytometrie (FACS) ist ein Messverfahren, das die Analyse von Einzelzellen erlaubt. Hierbei werden Fluoreszenz-markierte Zellen einzeln an Laserstrahlen vorbeigeführt, die den Farbstoff anregen und die dann entstehenden Lichtsignale detektieren. Die Lichtstreuung ist abhängig von Größe und Granularität der Zelle, so dass unterschiedliche Zellpopulationen im FACS auseinandergehalten werden können. Durch Fluoreszenz-gekoppelte Antikörper oder in die DNA interkalierende Substanzen (Propidiumiodid), können gezielt Proteine auf der Zelle bzw. DNA im Zellkern angefärbt und nachgewiesen werden. Das Verfahren erlaubt eine Analyse von großen Zellzahlen (>1000/sec) in kürzester Zeit (Picot et al. 2012).

2.2.4.2. Komplement vermittelte Zytotoxizität (CDC)

Zur Durchführung von CDC Assays wurde zunächst humanes Poolserum als Quelle des Komplementsystems erzeugt. Hierfür wurde zehn gesunden Spendern Blut entnommen und dieses bei Raumtemperatur gerinnen gelassen. Das Serum wurde vorsichtig abpipettiert und gepoolt. Ein Teil des Serums wurde für 30 Minuten bei 56°C inkubiert um die Enzyme des Komplementsystems zu inaktivieren. Das gewonnene Poolserum wurde aliquotiert und bei -20°C gelagert.

Für den CDC wurden 1x10⁵ bis 1x10⁶ Tumorzellen in 100 µl PBS + 0,2 % BSA gelöst und in 96 Well-Platten auf Eis pipettiert. Anschließend erfolgte die Zugabe von Antikörpern (i.d.R. 1 µg hcAb oder konventioneller Antikörper) und eine Inkubation für 10 min bei 4°C. Dann wurden 20 µl des Poolserums (nativ oder Hitze inaktiviert) hinzugegeben und die Ansätze für 30-120 min bei 37°C weiter inkubiert. Die Zellen wurden anschließend abzentrifugiert und in 100 µl PBS + Propidiumiodid gelöst und mittels Durchflusszytometrie am FACSCanto II (Becton Dickinson) analysiert. Tote Zellen wurden als PI positiv definiert (als % der Gesamtzellzahl). CDC Assays an primären Knochenmarksproben erfolgten nach Anreicherung von Lymphozyten mittels Dichtezentrifugation. Die Probenentnahme erfolgte im Rahmen einer Routinediagnostik nach Einverständnis des Patienten. Die primären Zellen wurden mit den jeweiligen Antikörpern und gepooltem humanem Serum für 4 Stunden bei 37°C inkubiert. Anschließend erfolgte eine Färbung mit Probidiumiodid sowie mit fluorochrom-konjugierten Antikörpern gegen CD45, CD56, CD38 für 30 min bei 4°C. Nach dem Waschen wurden die Zellen mittels Durchflusszytometrie analysiert. Tumorzellen wurden als CD45 negativ, CD56 positiv definiert, und der Anteil PI positiver Tumorzellen bestimmt.

2.2.4.3. Antikörper abhängige zelluläre Zelltötung (ADCC)

Für den ADCC wurden zwei unterschiedliche Messverfahren verwendet, die Durchflusszytometrie oder die Bioluminescenzmessung (Nijhof et al.2015). Für die Durchflusszytometrie wurden die Tumorzellen vor dem Versuch mit eFluor450 (eBioscience) markiert, um sie später von den Effektorzellen unterscheiden zu können. Für den Versuch wurden $5x10^{4}$ Luciferase transduzierte Tumorzellen in 100 µl Medium gelöst. Anschließend erfolgte die Zugabe von hcAb/Ak für 10 min bei 4°C. Die Zellen wurden anschließend mit PBS gewaschen um überschüssige Antikörper zu entfernen und dann erneut in 100 µl Medium aufgenommen. Nun wurden Effektorzellen (NK-92 hCD16 oder NK-92 mCD16) in einer Ratio von 3:1[E:T] in einem Gesamtvolumen von 100 µl hinzugegeben und die Ansätze für 4 Stunden bei 37° C inkubiert. Danach wurden die Zellen abzentrifugiert und in 100 µl PBS + Propidiumiodid aufgenommen. Tote Tumorzellen wurden als eFluor450 positiv, PI positiv definiert.

Für die Biolumineszenzmessung wurden die Zellen wie oben beschrieben mit Antikörpern und NK-92 Zellen inkubiert, abzentrifugiert und anschließend in 100 μl Luzuferin-Arbeitslösung (**2.1.5.**) gelöst. Die Bioluminescenzmessung erfolgte nach 20-minütiger Inkubation mit einem VIKTOR3 Multilabel Reader (PerkinElmar). Als Negativkontrolle diente der CDTA spezifische hcAb l-15, der aufgrund fehlener Bindung keinen ADCC auslöst. Da nur lebende Zellen in der Lage sind ATP-abhängig ein Biolumineszenzsignal zu erzeugen, erreicht die Negativkontrolle das höchstmögliche BLI Signal (alle Zellen leben). Die Berechnung toter Zellen erfolgte im Vergleich zur Negativkontrolle anhand folgender Formel:

$$\% toteZellen = \left(1 - \frac{MeanBLISignalProbe}{MeanBLISignalNegativkontrolle}\right) x100$$

2.2.4.4. Messung der Bindungsavidität mittels Dissoziationsassay

Zur Bestimmung der Bindungsavidität von bivalenten hcAb und monovalenten Nanobodies wurden 0,5x10⁶ stabil mit hCD38 transfizierte murine YAC-1 Zellen (DSMZ Nr. ACC-96) in 100 µl PBS + BSA gelöst. Je 600 µl der Zellsuspension wurde mit 4 µl eines AF647konjugierten hcAb oder Nanobody ür 1 h bei 4°C inkubiert. Anschließend wurden die Zellen 4 mal mit PBS gewaschen und nicht gebundenen hcAb/Nb zu entfernen. Inzwischen wurde ein zweites Aliquot hCD38 mit dem Farbstoff eFluor450 für 5 min bei RT gefärbt (4 µl auf 1 ml) und anschließend 4 mal gewaschen. eFluor450 (eBioscience) bindet an zelluläre Proteine. Die mit AF647-konjugierten Nb/hcAb beladenen YAC Zellen wurden in 6 Aliquots a 100 µl aufgeteilt. Dann wurden 100 µl der eFluor450 markierten Zellen hinzugegeben und das Zellgemisch in halbstündigen Abständen mittels Durchflusszytometrie gemessen. Zum Zeitpunkt Null zeigen sich zwei klar getrennte

Populationen, eFluor450 positiv/AF647 negativ und eFluor450 negativ/AF647 positiv. Im Laufe der Zeit dissoziieren Nb/hcAb und können dann an die zuvor mit eFluor450 gefärbten YAC Zellen binden. Es bildet sich somit eine eFluor450 positive, AF647 positive Population. Je stärker die Bindung des Nb/hcAb an CD38, desto langsamer ist die Dissoziation von der ursprünglichen Zelle und folglich die Bindung an die eFluor450 markierte Population.

2.2.4.5. Anfärbung peripherer Blutlymphozyten (PBMCs)

Zur Anfärbung peripherer Blutlymphozyten wurde einem gesunden Spender 7,5 ml Blut in einem EDTA Röhrchen abgenommen. Das Blut wurde 1:2 mit 0,9 % NaCl verdünnt, vorsichtig auf 15 ml Ficoll Paque PLUS (GE Healthcare) geschichtet und 40 Minuten bei 4000 rpm ohne Bremse zentrifugiert. Anschließend wurde die entstandene mittlere Phase (PBMCs) vorsichtig entnommen und gewaschen. Die Zellen wurden gezählt und auf 1x10⁶ Zellen in 100 µl PBS + BSA eingestellt. Anschließend erfolgte die Färbung entweder mit einem Fluorochrom- gekoppelten kommerziellen anti CD38 Ak (HIT2) oder einem AF647konjugierten hcAb für eine Stunde bei 4°C. Zusätzlich wurden die Zellen mit kommerziellen Ak gegen CD45, CD19 und CD16 angefärbt. Nach zweimaligen Waschen erfolgte die Messung in der Durchflusszytometrie.

3. Ergebnisse

CD38 wird auf hämatologischen Neoplasien wie dem Multiplen Myelom und dem Burkitt Lymphom überexprimiert. Es eignet sich daher als Ziel für eine Antikörper-basierte spezifische Therapie. Ziel dieser Arbeit war die Generierung CD38-spezifischer humanisierter Schwerekettenantikörper (hcAb) zur Therapie dieser hämatologischen Neoplasien.

Im Folgenden werden die Ergebnisse des Forschungsvorhabens dargestellt. Im ersten Abschnitt des Ergebnisteils (3.1.) wurden zunächst die Ziel- und Effektorzellen modifiziert und charakterisiert. Hierfür wurden zunächst die humanen B-Lymphomzelllinien LP-1, Daudi und CA-46 stabil mit Luziferase transduziert (luc) (3.1.1.) und anschließend mittels CRISPR/Cas9 Technologie ein CD38 knock out (KO) (3.1.2.) erzeugt. Dieses ermöglicht im Verlauf einen Biolu mineszenz-basierten Zytotoxizitätsassay mit einer geeigneten Negativkontrolle. Die erzeugten Zelllinien wurden anschließend hinsichtlich ihrer Expression verschiedene Oberflächenmarker verglichen (3.1.3.). Zudem wurde die humane NK-Lymphomzelllinie NK-92 mit modifiziertem humanem oder murinem CD16 (FcyRIII-Rezeptor) transduziert, um sie im späteren Verlauf als Effektorzelllinie im ADCC nutzen zu können (3.1.4.). Im zweiten Abschnitt wurden humanisierte Schwerekettenantikörper generiert. Zu diesem Zweck wurden die von Fumey et al. bereits selektionierten CD38 spezifischen Nanobodies an die hinge, CH2 und CH3 Domäne von humanem IgG1 kloniert, anschließend produziert, aufgereinigt und zum Teil an das fluoreszierenden Farbstoff AlexaFluor647 gekoppelt (3.2.1.-3.2.3.). Die hcAb wurden dann hinsichtlich ihrer Bindungsaviditätt und Färbekapazität mit Nanobodies und konventionellen Antikörpern verglichen (3.2.4.-6.). Als weitere Modifikation wurden biparatopische hcAb generiert, indem zwei Nanobodies über einen GS-Linker verbunden und anschließend an die hinge und Fc-Region von humanem IgGl fusioniert wurden (3.2.1.). Im dritten Abschnitt der Forschungsarbeit (3.3.) wurden die zuvor generierten hcAb hinsichtlich ihrer Kapazität, CDC oder ADCC auszulösen, untersucht. Es erfolgte dabei stets ein Vergleich zum bereits in der Klinik verwendeten konventionellen Antikörper Daratumumab.

3.1. Herstellung von Target- und Effektorzelllinien

Für die Durchführung der Versuche wurden die Myelom-Zelllinie (LP-1) und zwei Burkitt Lymphomzelllinien (Daudi, CA-46) ausgewählt. Diese Zelllinien entstammen der B-Zellreihe und exprimieren CD38 in hohem Maße. Für die nachfolgenden Zytotoxizitätsassays wurden diese Zelllien stabil mit dem Enzym Luziferase transduziert (luc) und mittels CRISPR/Cas9 Technologie Zellvarianten generiert, die kein CD38 exprimieren und als Negativkontrollen dienen können (KO).

3.1.1. Transduktion von Tumorzellen mit Luziferase und Grün-fluoreszierendem Protein

Zur Etablierung von Biolu mineszenz basierten ADCC-Assays sowie zur möglichen Detektion von Tumorzellen in vivo im Mausmodell erfolgte eine lentivirale Transduktion mit einem für eine Luciferase kodierendem Plasmid (LeGo-IG2-Puro+Luc, AG Fehse, Hamburg). Nach erfolgreicher Transduktion produziert die Zelle Luciferase (luc), ein Enzym, das sein Substrat Luciferin unter Erzeugung eines Biolu minescenzsignal (BLI) umsetzt (Wilson et al 1998). Für diese Reaktion ist ATP notwendig, das nur in vitalen Zellen produziert wird. Die Höhe des gemessenen Biolu mineszenzsignals korreliert somit mit der Anzahl an lebenden Zellen im Ansatz und kann dadurch als Marker für die Vitalität der Zellen benutzt werden. Die Produktion der Lentiviren sowie die Transduktion der Zelllinien wurde freundlicher Weise durch Dr. Kristoffer Riecken (AG Fehse, UKE) durchgeführt und ist im Abschnitt 2.2.3.3. beschrieben. Neben der Luciferase bringen die Viren zusätzlich das grün fluoreszierende Protein (GFP) einer Qualle, sowie eine Puromycin-Resistenz in die Zellen ein. Letztere ermöglicht die gezielte Selektion transduzierter Zellen. Die Zellen wurden nach Transduktion unter Selektionsdruck durch Zugabe von Puromycin in Zellkultur gehalten. Der Transduktionserfolg und die Reinheit der Kultur wurde mikroskopisch (Abb. 5 A) sowie mittels Durchflusszytometrie überprüft. Transduzierte Zellen leuchten dabei grün. Die Luciferaseaktivität wurde mittels Biolu minescenzmessung im VIKTOR3 Multilabel Reader (PerkinElmer) ermittelt. Hierfür wurden eine Millionen transduzierter Zellen in 100 µl Luciferin-Arbeitslösung (2.1.5.) gelöst und in zwei- minütigen Abständen die Höhe des produzierten BLI Signals gemessen. Die daraus resultierende Zeitkurve (Abb. 5 B) verdeutlicht einen initial raschen Anstieg mit dann relativ konstantem nur langsam abfallendem Signal. Weitere Versuche wurden daher nach einer Inkubationszeit von 20 min gemessen, um größere Schwankungen zu vermeiden.


Abb. 5: Generierung von Luciferase transduzierte Tumorzellen.

LP-1 Mylom-Zellen wurde durch lentivirale Transduktion modifiziert, um die Reporterproteine Luciferase und GFP zu produzieren. A) Mikroskopische Aufnahme der transduzierten Zellen. Das kotransfizierte GFP leuchtet grün. B) Messung des Biolu mineszenz-signals (BLI) von $1x10^{6}$ LP-1 luc Zellen nach Zugabe von $100 \ \mu$ l Luciferin-Arbeitslösung. Der Graph zeigt den zeitlichen Verlauf des Signals nach Beginn der Reaktion.

3.1.2. Inaktivierung des CD38 Gens in Lymphomzelllinien

Zur Generierung geeigneter Negativkontrollen wurde in den zuvor mit der Luciferase transduzierten Zelllinien das CD38 Gen inaktiviert. Dieses gelang mittels CRISPR/Cas9 Technologie. Diese Technologie stammt ursprünglich aus Bakterien und dient der Virenabwehr. Dabei erkennen und binden spezifische RNA-Sequenzen (CRISPR) eine vorher bestimmte Region auf der DNA und stimulieren dadurch die Cas9 Nuklease, an dieser Stelle einen Doppelstrangbruch zu induzieren. Dieses führt bei fehlerhafter Reparatur zur Inaktivierung des Gens und zum 'knock out' des Enzymes (Cong et al. 2013, Mali et al. 2013, Sander and Joung 2014). Um CD38 auszuschalten wurde ein kommerziell erhältliches CD38-spezifisches CRISPR/Cas9 Reagens verwendet (Santa Cruz Biotechnology, Art.-Nr.: sc-401117-NIC). Dieses besteht aus drei Plasmiden, die für Cas9 und unterschiedliche 20nt RNA-Erkennungs-Sequenzen im CD38 Locus kodieren (Abb.6 A). Durch Retransformation in kompetenten E.coli wurde das Plasmid-Gemisch zunächst vervielfältigt und in seine drei Einzelplasmide getrennt (2.2.3.4.). Mittels Oligonukleotid-Primern, die an das Ende der bekannten guide RNA binden, wurden die Plasmide sequenziert und die drei unterschiedlichen CD38 erkennenden Sequenzen ermittelt (Abb. 6 B). Anschließend wurde eines der Plasmide mittels Transfektion (LP-1 luc) oder mittels Elektroporation (CA-46 luc, Daudi luc) in die Zellen gebracht (2.2.3.4.). Nach 3-tägigen Wachstum wurden die Zellen auf CD38-Expression angefärbt. Die CD38 negativen Zellen wurden schließlich mittels Durchflusszytometrie sortiert und weiter kultiviert. Abbildung 7 zeigt die Expression von GFP und CD38 der drei unterschiedlichen Varianten einer Zelllinie (WT, luc, KO) im Vergleich. Die Luziferase transduzierten Zellen (schwarz) zeigen eine starke GFP- und stabile CD38-Expression. Die anschließend generierten CD38-Knock out Zellen (rot) zeigen sich dagegen CD38 negativ mit gleichbleibender GFP-Expression.





Abb. 7: Modifizierten Zellinien exprimieren unterschiedlich GFP und CD38.

Die drei erzeugten Varianten der Tumorzellinien (WT, luc, KO) wurden für eine Stunde bei 4°C mit dem Nb JK26 auf CD38 angefärbt und anschließend mittels Durchflusszytometrie die GFP und CD38 Expression ermittelt. A) Exemplarische Gating-Strategie der FACS-Plots. Zunächst wurden die Duplets ausgeschlossen und danach die lebenden Lymphozyten ausgewählt. Anschließend erfolgte die Darstellung von CD38 gegenüber GFP. B) Überlagerte FACS-Plots der drei generierten Varianten einer Zelllinie. Wildtyp Zellen (grau), Luciferase und GFP transduzierte Zellen (schwarz) und CD38 knock out (rot).

3.1.3. Expression von Membranproteinen auf der Zelloberfläche der Zielzellen

Nach abgeschlossener Modifikation der Targetzellen, wurden alle in Kultur befindlichen Tumorzelllinien hinsichtlich ihres Oberflächen Markerprofils gefärbt. Dabei wurden fünf relevante Marker berücksichtigt (CD38, CD45, CD56, CD55 und CD59). CD38 ist das Zielprotein der hcAb. Die Menge an CD38 auf der Oberfläche beeinflusst dabei die Antikörperbindung und die Empfindlichkeit in späteren Tötungsassays (Nijhof et al 2015). CD45 ist ein Marker für Lymphozyten und zeigt sich beim Multiplen Myelom typischerweise negativ, wohingegen das Burkitt Lymphom CD45 exprimiert (Nakano et al 1990). CD56 ist ein NK-Zellmarker, der jedoch auch von einigen Myelomen überexprimiert wird (Van Acker et al. 2017). CD55 und CD59 sind Proteine, die die Komplementkaskade hemmen und die Zelle dadurch vor der Abtötung schützen können (Abb. 1). Für den CD38 spezifischen Antikörper Daratumumab konnte bereits gezeigt werden, dass Zellkulturen mit niedrigeren Expressionsleveln dieser Komplementinhibitoren ein besseres Ansprechen hinsichtlich des

CDC zeigen (Nijhof et al. 2016). Die Anfärbung der jeweiligen Zellen erfolgte durch spezifische, Fluorochrom-gekoppelte Antikörpern (**2.1.1**.), die für eine halbe Stunde bei 4°C inkubiert wurden. Nach gründlichem Waschen erfolgte die Bestimmung der mittleren Fluoreszenz (MFI) mittels Durchflusszytometrie. Die Expressionsstärke wurde anschließend anhand der MFI definiert. Zellen mit einer MFI unter 500 wurden als negativ [-], mit einer MFI zwischen 500 und 1000 als schwach positiv ([+]), mit Werten von 1.000-10.000 als positiv [++] und mit einer MFI>10.000 als stark positiv definiert (**Tabelle 1**). Die getesteten Lymphom-und Myelomzelllinien zeigen alle CD38 auf der Zelloberfläche, allerdings in unterschiedlich hohem Ausmaß. CD45 ist bei allen Burkitt-Lymphomzelllinien detektierbar, bei den Myelomzelllinien nicht. CD56 wird lediglich von den Myelomzelllinien RPMI8226 und Amo1 auf der Zelloberfläche exprimiert. Die Komplementinhibitoren CD55 und CD59 variierten stark in ihren Expressionsleveln auf der Zelloberfläche. Auf Daudi, CA-46 und LP-1 Zellen waren diese Marker nicht detektierbar, weshalb diese Zelllinien für künftige Zytotoxizitätsassays als besonders geeignet erscheinen (**Tabelle 1**).

	Zelllinie	CD38	CD45	CD56	CD55	CD59
	Daudi	++	+	-	(+)	-
hon	Daudi luc	++	+	-	(+)	-
ymp	Daudi luc CD38 KO	-	+	-	(+)	-
an L	CA46	+	+	-	-	-
lum	CA46 luc	+	+	-	-	-
Ŧ	Ca46 luc CD38 KO	-	+	-	-	-
	LP-1	++	-	-	(+)	-
F	LP-1 luc	++	-	-	(+)	-
elor	LP-1 luc CD38 KO	-	-	-	(+)	-
My	EJM	+	(+)	-	+	++
ples	KMS-12-BM	+	-	-	+	++
1ulti	RPMI 8226	+	-	+	++	+
2	Amo1	++	-	+	+	(+)
	U266 CD38sort	(+)	+	-	(+)	++

Tabelle 1: Übersicht der Expressionsmuster humaner Myelom- und Lymphomzelllinien. Die veschiedenen Zelllinien wurden für 30 minuten bei 4°c auf die unterschiedlichen Expressionsmarker CD38 (JK36-AF647, AG Nolte), CD45 (HI100-PE, BioLegend), CD56 (B159-PeCy7, Thermo Fischer), CD55 (IA10-PE, BD) und CD59 (P282-PE, BD) angefärbt. Die Expressionsstärke wurde dann anhand der mittleren Fluoreszenzintensität (MFI) in der Durchflusszytometrie bestimmt und ist definiert als negativ <500 [-], positiv >1000 [+], >10000 [++], >30000 [+++]. Werte zwischen 501 und 1000 wurden als schwach positiv gewertet [(+)].

3.1.4. Stabile Transduktion von humanen NK-Lmyphom Zellen mit humanem oder murinem CD16 (FcgRIII)

Beim ADCC erkennt eine Effektorzelle mit Hilfe von Fc-Rezeptoren die am Zielantigen auf der Zielzelle gebundenen Antikörper und tötet die Zielzelle dann durch Freisetzung von Perforinen und Granzymen (Abb. 2). Zur Herstellung von potenten Effektorzellen wurde die bereits etablierte NK-Zelllinie NK-92 (DSMZ Nr. ACC-488) modifiziert. NK-92 Zellen exprimieren keine eigenen Fcy-Rezeptoren. Um eine spezifische Antikörper abhängige Zelltötung zu ermöglichen wurde ein humaner oder muriner CD16 Fcy-Rezeptor III eingebracht. Hierfür wurde die extrazelluläre Domäne von CD16 mit der transmembran und intrazellulären Domäne der gamma Kette des FcERI fusioniert (Clémenceau et al 2006, 2013). Die Sequenzen wurden anhand der Vorlage von Clémenceau et al. kommerziell synthetisiert (2.2.3.5.). Die Konstrukte wurden in den Retroviralen Vektor SF91-iGFP kloniert (Abb. 4). Dieser enthält zusätzlich eine Sequenz für das Reportergen GFP, um eine spätere Selektion der transduzierten Zellen zu ermöglichen. Die Produktion der Viren sowie die Transduktion der NK-92 Zellen wurde freundlicher Weise durch Dr. Kristoffer Riecken (AG Fehse, UKE) durchgeführt und entspricht dem Vorgehen wie bei der Luziferase (2.2.3.3.). Sieben Tage nach Transduktion wurden die Zellen mit einem für human oder maus CD16 spezifischen Antikörper angefärbt und in der Durchflusszytometrie gemessen. Tranduzierte Zellen zeigten sich GFP positiv und zudem spezifisch mit Antikörpern gegen murines oder humanes CD16 anfärbbar (Abb. 8). Die Zellen wurden auf CD16 Expression sortiert und in die laufende Kultur aufgenommen.



3.1.5. CD16-transduzierte NK-92 Zellen zeigen eine spezifische Antikörper-abhängige Zytotoxizität (ADCC)

Nach erfolgreicher Transduktion des Fcg-Rezeptors, wurden die generierten NK-Zelllinien (NK-92 mCD16 und NK-92 hCD16) auf ihre Funktionalität im ADCC getestet. Hierzu wurden eFluor450 makierte CA-46 luc Zielzellen mit Daratumumab als Positivkontrolle und einem nicht bindenden Nb hcAb als Negativkontrolle für 10 min bei 4°C inkubiert. Anschließend wurden nicht bindende Antikörper durch waschen entfernt und NK-92-hCD16 oder NK-92-mCD16 im Verhältnis 1:3 (Z:E) hinzugegeben. Nach 4 Stunden Inkubation bei 37°C wurde die Zellen mit Propidiumiodid (PI) gefärbt. PI ist ein Farbstoff, der sich an Nukleinsäuren in der Zelle anlagert. Er kann die Zellmembran nur überwinden, wenn die Zellen tot und löchrig sind. PI dient daher als Marker für tote Zellen (Lecoeur 2002). Der Anteil toter Zielzellen (eFlour450+, PI+) wurde anschließend mittels Durchflusszytometrie ermittelt. Die Ergebnisse zeigen, dass die Effektorzelle NK-92-hCD16 in Kombination mit

Daratumumab eine starke Tötungskapazität aufweist. NK-92 mCD16 hingegen zeigte keine spezfisiche Tötungskapazität (**Abb. 9**). Die fehlende Aktivität der NK-92 mCD16 kann dadurch erklärt werden, dass Daratumumab einen humanen Fc-Teil trägt, der mit dem murinen Fcg-Rezeptor nicht kompatibel ist. Die generelle Funktionalität der NK-mCD16 Zelllinie konnte später mit murinen Antikörpern bestätigt werden (Natalie Baum, AG Nolte, persönliche Mitteilung). Mutierte hIgG1 Konstrukte, die eine verstärkte Bindung an Fcg-Rezeptoren vermitteln, zeigten ebenfalls eine gute Tötungskapazität auch mit NK-92-mCD16 Effektorzellen (nicht dargestellt).



Abb. 9: NK-92 hCD16 induzieren effektiven ADCC.

CA-46 Lymphomzellen wurden mit eFluor450 markiert und anschließend mit einem contr. hcAb (l-15 hcAb) oder Daratumumab für 10 min bei 4°C inkubiert. Nun wurden NK-92 human oder maus CD16 in einem Verhältnis von 1 zu 3 (Z:E) hinzugegeben und für 4h bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde der Anteil PI positiver CA-46 Zellen in der Durchflusszytometrie ermittelt. A) Exemplarische Gatingstrategie anhand von NK-92 hCD16. Zunächst wurde auf die eFluor450 positiven Zielzellen gegated und anschließend der Prozentsatz PI positiver Zellen ermittelt. B) Darstellung der % toten Zielzellen (eFluor+, PI+) im Balkendiagramm.

3.2. Herstellung und Charakterisierung von Schwerekettenantikörpern

Nanobodies sind die variablen Domänen (VHH) von Schwerekettenantikörpern, die natürlich Weise in Lamas vorkommen. Gegenüber konventionellen Antikörpern zeigen sie eine höhere Stabilität und einfachere Umklonierung in bi-und multivalente Formate (siehe auch **Abschnitt 1.5.**). In vorherigen Arbeiten waren mehrere Familien CD38-spezifischer Nanobodies mit unterschiedlich langen CDR3 Region selektiert und in einen eukaryoten Expressionsvector (pCSE2.5, AG Schirrmann, Braunschweig) kloniert worden. Dieser ermöglicht eine vereinfachte Produktion in HEK6-E Zellen (Fumey et al. 2017, Königsdorf 2016). Die VHH Domänen wurden dabei entweder mit einem 6his-myc Tag versehen oder vor die hinge, CH2 sowie CH3 Domäne von humanem IgG1 kloniert, um humanisierte Schwerekettenantikörper (hcAb) zu erzeugen. Diese hcAbs erkennen drei unterschiedliche Epitope auf CD38 (E1, E2, E3). Die hinzugefügte Fc-Domäne vermittelt die Bindung an Fcγ-Rezeptoren sowie an den Komplementfaktor C1q und ermöglicht somit ADCC und CDC. Die von Königsdorf und Fumey et al. generierten Plasmide wurden als Grundlage für die Versuche dieser Forschungsarbeit verwendet.

3.2.1. Klonierung von Expressionsvektoren für biparatopische hcAb

Biparatopische hcAb wurden generiert, um die Eigenschaften zweier Nanobodies in einem Konstrukt zu vereinen. Dazu wurden zwei Nanobodies über einen GS-Linker aneinandergehängt und dann um die hinge und Fc-Region von human IgG1 ergänzt. Dadurch erhält man einen tetra-valenten hcAb, der vier Antigen-bindende Einheiten enthält (**Abb. 11 Nr. 4**). Erzeugt wurden biparatopische hcAb, die jeweils den drei möglichen Epitopkombinationen entsprechen (211-121 (E1+E3), 36-1067 (E3+E2) und 1067-1068 (E2+E1)).

Für die Klonierung wurden die Nanobody-Plasmide wie in **Abbildung 10** dargestellt mittels spezifischen Primern amplifiziert, verdaut und anschließend mit dem hinge-Fc oder 6hismyc tragenden pCSE2.5 Vektor ligiert. Der erste Schritt der Klonierung ist die PCR Amplifikation. Dabei werden zunächst die beiden Nanobodies aus ihren Vektoren mittels PCR vervielfältigt und mit spezifischen Primern ein GS-Linker und eine BamH1-Schnittstelle, sowie eine NcoI oder NotI Schnittstelle angefügt. Der später vordere Nanobody wird am hinteren Ende um den Linker sowie die Schnittstelle ergänzt, der später hintere Nanobody am vorderen Ende (Abb. 10 A). Durch Verwendung unterschiedlicher Primer ist es möglich, die Länge des GS-Linkers zu variieren. Nach Aufreinigung der

erzeugten PCR Fragmente werden diese mit dem Restriktionsenzym BamHI und entweder NotI oder NcoI verdaut (**Abb. 10 B**). Der Verdau erzeugt spezifische "klebrige Enden", die sich bevorzugt mit einem kompatiblen Ende zusammenlagern. Der pCSE2.5. Vektor besitzt ebenfalls NcoI und NotI Schnittstellen vor dem hinge-Fc kodierenden Abschnitt und wurde ebenfalls verdaut und aufgereinigt. Im dritten Schritt, der Ligation, werden Vektor und beide Nanobody PCR Fragmente zusammengebracht und die klebrigen Enden verbinden sich. Es entsteht ein Plasmid, welches für den biparatopischer hcAb kodiert (**Abb. 10 C**).



Im ersten Schritt, der Amplifikation (A), werden die Nanobodies aus ihrem Plasmid mittels PCR und spezifischen Primern vervielfältigt. Die Primer bestehen dabei aus der Erkennungssequenz für den Nb, einem Teil des GS-Linkers und einer BamH1-Schnittstelle, welche dem Nb angefügt werden. (B) Im zweiten Schritt werden die erzeugte Nb PCR Fragmente mit dem Restriktionsenzymen verdaut, um klebrige Enden zu erzeugen. (C) In der Ligation werden die Konstrukte schließlich zusammengeführt und zu einem Plasmid vereint.

3.2.2 Produktion und Aufreinigung von hcAb

Zur Produktion der verschiedenen Nanobodykonstrukte wurden humane HEK-6E mit den für die Nanobodies oder Antikörper kodierenden Expressionsvektoren transient transfiziert (2.2.3.2.) und in serumfreien Medium kultiviert. Die Expressionsvektoren (pCSE2.5) kodieren angrenzend an die Nanobody kodierende Region dabei entweder einen 6his-myc tag oder die hinge, CH2 und CH3 Region von humanem IgG1 (hFc). Dieses ermöglicht die Produktion von einzelnen 6his-myc tag tragenden Nanobodies oder von humanisierten Schwerekettenantikörpern (hcAb). Für die Herstellung von konventionellen Antikörpern ist hingegen eine Ko-Transfektion der Plasmide für die leichte und die schwere Kette notwendig, die anschließend von der Zelle einzeln produziert werden und sich sekundär zu einem vollständigen Antikörper zusammenlagern. Nach erfolgreicher Transfektion beginnt die Zelle die Konstrukte zu produzieren und in den Überstand abzugeben. Nach 6 Tagen wird der Überstand gesammelt und mittels SDS-PAGE und Coomassie-Färbung auf erfolgreiche Produktion überprüft (Abb. 11). Durch Größenauftrennung der einzelnen Bestandteile des Überstandes neben einem Marker mit bekannten Bestandteilen und Konzentrationen (Albu min 1 µg 65kDA, IgH 0.5 µg 50kDA, IgL 0.25 µg 25kDA, Lysozyme 0.1 µg 14kDA) kann der Überstand auf eine Bande mit der errrechneten Größe geprüft werden (Abb. 11). Da die Zellen ohne Serum kultiviert wurden, befinden sich im Überstand neben den Nanobody-Konstrukten nur wenige weitere zelluläre Proteine. Dennoch wurden die Konstrukte über eine Nickel-NTA-Säule (für 6his-myc Konstrukte) oder eine Protein-G-Säule (für hcAb-Konstrukte) affinitätschromatographisch aufgereinigt. Bei diesem Verfahren bleiben die Tag-tragenden Konstrukte an der Säule hängen und können nach mehrmaligem Wegwaschen der übrigen Bestandteile durch Zugabe von Imidazol, bzw. Reduzierung des pH wieder abgelöst werden (2.2.2.1.). Auf diese Weise wurden alle Nanobodies als 6his-myc und als hcAb Variante produziert und aufgereinigt.



Abb. 11: SDS-PAGE verschiedener Antikörperkonstrukte mit schematischer Darstellung des Aufbaus und der Größe.

l μg aufgereinigter Nanobody- oder Antikörperkonstrukte wurden auf eine SDS-PAGE aufgetragen und mittels Coomassiefärbung dedektiert. Schematischer Aufbau und Größe der Konstrukte sind rechts aufgezeigt. Die Zahlen markieren die zugehörige Bande der SDS-PAGE.

3.2.3. Kopplung der verschiedenen Konstrukte an Alexa Fluor 647

Für die Verwendung der produzierten Konstrukte in der Durchflusszytometrie wurden diese über A minogruppen (Lysin-Seitenketten, N-Ter minus) ungerichtet an den fluoreszierenden Farbstoff Alexa Fluor 647 (AF647) gekoppelt (**2.2.2.3.**). Nach Kopplung wurden die Konstrukte mittels SDS-PAGE ihrer Größe nach aufgetrennt. Anschließend erfolgte eine Analyse der Fluoreszenzintensität mittels Messung im IVIS 200 (Caliper Life Sciences). Zusätzlich wurden die Proteine im Gel mit Coomassie gefärbt, um die Reinheit und relativen Proteinmengen zu visualisieren (**Abb. 12**). Alle Konstrukte zeigten eine Bande auf der erwarteten Höhe und waren unterschiedlich stark fluoreszierend. Um eine konstante Anfärbung auch durch unterschiedlich stark gekoppelte Nanobodies zu erhalten, wurden Verdünnungsreihen der Konstrukte erstellt. Mit diesen wurde dann ein äquivalentes Gemisch aus CD38 positiven und negativen Zellen angefärbt und in der Durchflusszytometrie die AF647 Intensität gemessen. Die Konstrukte wurden schließlich auf diejenige Vedünnung eingestellt, die noch eine deutliche Abgrenzung CD38 positiver von negativer Populationen ermöglichte.





scFv hcAb, 6 = koventioneller Ak.

3.2.4. Epitopkartierung der Bindungsstellen der Nanobodies an CD38

Fumey et al konnte bereits zeigen, dass die verschiedenen Nanobodies unterschiedliche Eigenschaften aufweisen (Fumey et al. 2017). Unter anderem wurden Kreuzblockadeassays durchgeführt, die zeigen, dass die Nanobodies an unterschiedlichen Stellen (Epitopen) auf CD38 binden. CD38 exprimierende CA-46 Zellen wurden hierfür zunächst für 30 min mit einem Überschuss unkonjugiertem Nanobody vorinkubiert. Dann wurden AF647 konjugierte Nb hinzugegeben und der Ansatz für weitere 30 min inkubiert um CD38 anzufärben. Bindet der konjugierte Nb an gleicher Stelle wie der zuvor unkonjugierte, so wird die Bindung blockiert und es zeigt sich keine Anfärbung in der Durchflusszytometrie. Auf diese Weise konnten drei nicht überlappende Epitope identifiziert (im Nachfolgenden E1-3 genannt) und die verschiedenen Nanobodies diesen Epitopen zugeordnet werden (**Tabelle 2**). Alle Epitop 1 Nanobodies sowie einige Epitop 2 Nanobodies blockierten die Bindung von Daratumumab. Einige Nanobodies scheinen zudem überlappende Epitope zu binden (WF121, WF124, und JK28 ein mit E1 und E3 überlappendes Epitop, sowie MU523 und MU1067 ein mit E1 und E2 überlappendes Epitop).

ер	fam	name	JK36	WF100	JK19	WF211	MU274	MU1068	MU523	MU1067	JK2	Dara
3	18	WF121	99	99	99	71	10	59	-13	5	16	99
3	21	WF124	100	99	97	88	15	64	-9	3	22	99
3	3	WF42	99	97	99	3	7	23	-2	4	14	97
3	1	WF9	49	66	65	-16	5	18	-13	3	22	-23
3	2	JK36	97	96	97	-13	16	22	-13	4	18	-9
3	22	WF100	90	80	88	9	0	27	-7	6	52	46
3	15	JK19	99	98	97	12	8	39	-17	1	-35	86
3	7	WF14	62	69	69	16	6	25	-12	2	26	32
1	9	MU738	39	33	-8	64	53	74	-15	6	8	87
1	11	JK22	27	5	29	97	96	97	-8	0	23	99
1	8	JK28	74	60	96	94	94	95	-9	8	-10	98
1	17	WF211	18	4	52	97	96	97	-9	8	12	99
1	14	MU1053	10	12	38	94	93	95	-10	6	-11	98
1	5	MU370	24	26	31	89	80	86	-5	5	-8	97
1	13	MU274	36	45	14	98	99	99	2	7	-32	99
1	12	MU1068	46	35	36	86	81	90	-7	5	0	97
1	6	JK29	33	36	1	97	98	98	-4	4	9	99
1	16	MU415	37	47	18	98	98	98	-11	7	36	98
1	10	JK44	45	28	-6	87	83	90	-13	3	10	95
2	19	MU523	43	40	8	30	20	71	98	98	99	99
2	20	MU1067	26	48	34	31	8	79	99	99	99	99
2	4	JK2	9	20	9	-2	3	15	16	17	56	-1

Tabelle 2: Kreuzblockade zur Epitopkartierung aller Naobody-Familien.

CD38 positive Zellen wurden mittels unkunjugierten Nanobodies vorinkubiert (links angezeigt). Nach gründlichem Waschen wurde dann mittels AF647 konjugierten Nb angefärbt (oben angezeigt) und die mittlere Fluoreszenz in der Durchflusszytometrie ermittelt. Die Tabelle zeigt die Prozentzahl der Blockung gegenüber einer Anfärbung ohne vorausgegangene Inkubation mit einem unkonjugiertem Nb. Blockungen >80% sind dunkelgrau, Blockungen zwischen 50-80% hellgrau markiert. Die Selbstblockade der zur Färbung benutzen Nanobodies ist durch Boxen hervorgehoben (Abbildung: Fumey et al. 2017).

3.2.5. Bindungsavidität von hcAb im Vergleich zu einzelnen Nanobodies

Fumey et al. hatten für CD38-spezifische Nanobodies unterschiedliche Bindungsaviditäten aufgezeigt. Dabei binden einige Nanobodies fester an CD38 als andere (Fumey et al. 2017). Für diese Arbeit wurden aus einzelnen Nanobodies humanisierte Schwerekettenantikörper (hcAb) generiert. Da diese über Disulfidbrücken in der hinge Region zu Dimeren verknüpft sind, besitzen hcAb im Vergleich zu einfachen Nanobodies zwei Bindedomänen. Um zu überprüfen, ob bivalente hcAb eine höhere Bindungsavidität aufweisen, wurde die Dissoziation Fluorochrom-konjugierter hcAb von membranständigem CD38 im Vergleich zu der Dissoziation monovalenter Nanobodies untersucht. Dabei wurden Zellen entweder mit einem Nb 6his myc AF647 oder dem gleichen Nb als hcAb AF647 inkubiert und gewaschen. Anschließend wurden die mit AF647-hcAb bzw. AF647-Nb beladenen Zellen mit eFluor450-gefärbten Zellen gemischt und weiter inkubiert und zu unterschiedlichen Zeitpunkten durchflusszytometrisch analysiert. Die eFluor450-gefärbten Zellen dienen dabei als potentielle Andockstell für dissoziierte Antikörper. Je geringer die Bindungsaffinität des Antikörpers, umso einfacher löst er sich wieder ab. Er hat dann die Möglichkeit an einer anderen Zelle erneut zu binden. Die zuvor ungefärbten Zellen, werden dadurch zunehmend stärker angefärbt, welches sich in der Durchflusszytometrie bestimmen lässt (Abb. 13). In der Abbildung 13 A wird exemplarisch die Bindungsaffinität des Nanobodies JK36 6his-myc gegenüber dem gleichen Nanobody als hcAb Variante dargestellt. Während beim his-myc Konstrukt bereits nach 30 Minuten eine leichte Anfärbung der zuvor eFluor450-gefärbten Zellen zu sehen ist und sich nach 400 Minuten die Populationen fast vollständig angenähert haben, zeigt der hcAb fast gar keine Ablösung, was auf eine stabilere Bindung schließen lässt. Abbildung 13 B vergleicht Nanobodies der drei unterschiedlichen Epitope zum Zeitpunkt 120 min. Während die Dissoziationsrate der einzelnen Nanobodies stark variiert, zeigen alle hcAb vergleichbar gute Bindung, die zudem etwas stabiler als die Bindung von Daratumumab erscheint.



Abb. 13: hcAb zeigen eine bessere Bindungsavidität als einzelne Nanobodies.

CD38 positive Zellen wurden mit einem AF647 konjugiertem Nb his-myc oder dem gleichen Nb als hcAb Variante gefärbt und anschließend gewaschen. Die gefärbten Zellen wurden dann mit der gleichen Menge ungefärbter Zellen (eFluor450 markiert) gemischt und im zeitlichen Verlauf in der Durchflusszytometrie gemessen. Die ungefärbten Zellen dienen dabei als Magnet für sich ablösende Antikörper und werden im Verlauf CD38 positiv angefärbt. A) Vergleich von JK36-Nb gegenüber JK36-hcAb im zeitlichen Verlauf. B) Bindungsaffinität von jeweils einem Vertreter der drei unterschiedlichen Epitope (WF211 (E1), MU1067 (E2), JK36 (E3)) in Nb oder hcAb Format oder Daratumumab zum Zeitpunkt 120 min nach Zugabe der ungefärbten Zellen.

3.2.6. Anfärbung von peripheren Blutlymphozyten mit Nanobodies

CD38 ist aufgrund seiner Überexpression auf Myelomzellen neben einem therapeutischen Ziel auch ein diagnostischer Marker, der in der Rutinediagnostik der Labore zur Detektion und Quantifizierung von Tumorzellinfiltration genutzt wird. Die Therapie mit CD38bindenden Antikörpern wie Daratumumab stellt die Labore vor das Problem, dass dessen Bindung die Bindung des Färbeantikörpers blockiert und die Zellen dadurch vermeintlich CD38 negativ erscheinen. Die standardmäßig verwendeten kommerziellen CD38 Färbeantikörper binden alle das Epitop 1 und werden daher blockiert (Oberle et al. 2017). Eine Umgehung des Problems wäre durch die Verwendung von unabhängig bindenden Färbenanobodies (Epitop 2 oder 3) möglich. Um die Nanobodies auf ihre Möglichkeit hin zu prüfen, zuverlässig primäre Proben anzufärben, wurden periphere Blutlymphozyten (PBL) angefärbt. Hierzu wurde einem gesunden Spender Blut entnommen und dieses mittels Dichtegradientenzentrifugation aufgetrennt. Die gewonnen peripheren Blutlypmphozyten wurden nun mit einem kommerziell erhältlichen, CD38 spezifischen Antikörper (LS198-4-3, Beckman Coulter) oder einem Alexa Fluor 647 gekoppeltem Nanobody hcAb angefärbt. Zusätzlich wurden zur Differenzierung der Zellen CD45 als Marker für Lymphozyten, CD19 als B-Zellmarker, CD3 als T-Zellmarker und CD16 als Marker für natürliche Killerzellen mitgefärbt (2.2.4.5.). Es zeigt sich eine vergleichbar gute und spezifische Anfärbung von CD3 positiven T-zellen, CD16 positiven NK-Zellen, sowie eine abgenzbare CD19 moderat positive, CD38 hochpositive Subpopulation von B-Zellen, die den Plasmazellen entspricht (Abb. 14). Die Ergebnisse zeigen, dass Nanobodies für zukünftige Versuche als Färbeantikörper zuverlässig zu verwenden sind und eine Blockierung des Färbeantikörpers durch den Therapieantikörper durch die Auswahl eines Nbs, der an ein unabhängiges Epitop bindet (z.B. JK36), vermieden werden kann.



Abb. 14: hcAb dedektieren CD38 auf peripherer Blutlymphozyten (PBLC) genau so gut wie konventionelle Antikörper.

Nach Entnahme von Blut eines gesunden Spenders erfolgte die Isolierung der PBMCs mittels Dichtegradientenzentrifugation. Die Zellen wurden nun auf unterschiedliche Marker gefärbt. Für die CD38 Anfärbung wurde dabei entweder ein konventioneller Ak (LS198-4-3), JK36 hcAb oder eine Isotypkontrolle (l-15 hcAb) verwendet. Nach Gating auf CD45 positive Lymphozyten wurde die Anfärbung der CD38 Expression auf CD16 positiven NK-Zellen (gelber Pfeil), CD19 positiven B-Zellen (grüner Pfeil) oder Plasmazellen (roter Pfeil), sowie CD3 positiven T-Zellen (blauer Pfeil) überprüft.

3.3. Komplement vermittelte und Antikörper vermittelte zelluläre Zytotoxizität gegenüber CD38 positiven Tumoren

Bei der Komplement vermittelten Zytotoxizität (CDC) wird nach Bindung von Antikörpern an Membranproteine der Zielzelle, die Bindung von C1q, dem ersten Bestandteil der Komplementkaskade, an die Fc-Domäne ermöglicht (**Abb. 1**). C1q liegt als Hexamer vor und wird durch Bindung mehrerer Fc-Teile (am besten sechs) aktiviert. Es ist bekannt, dass die meisten monoklonale IgG Antiköprer C1q nur ineffektiv binden und beispielzweise IgM Antikörper durch ihre Pentamerstruktur eine effektivere Komplementaktivierung auslösen können (Diebolder et al. 2014). Daratumumab als IgG1 Antikörper ist in der Lage eine schwache CDC auszulösen, was durch den Austausch bestimmter Aminosäuren in der Fc Region deutlich verstärkt werden kann, sogenannate Hexabody Mutationen, die die Ausrichtung der Fc-Enden in Hexamerformation begünstigen (de Weers et al. 2011, De Jong et al. 2016). Wird C1q aktiviert, setzt dieses eine Kaskade in Gang, die schließlich durch Eindringen von Wasser durch den Membran-angreifenden Komplex zum Platzen der Zielzelle führt (Abb. 1). In den nachfolgenden Versuchen wurden die generierten humanisierten Schwerekettenantikörper sowie Kombinationen von hcAb hinsichtlich ihrer Fähigkeit CDC auszulösen überprüft.

3.3.1. Einzelne hcAb induzieren keine CDC, wohingegen Kombinationen unabhängig bindender hcAb starke Zelltötung induzieren

Um die Fähigkeit Komplement vermittelte Zytotoxizität auszulösen zu testen, wurden CA-46 Lymphomzellen oder LP-1 Myelomzellen mit hcAb bei 4°C vorinkubiert. Als Negativkontrolle wurde ein nicht bindender hcAb, als Positivkontrolle der bereits klinisch zugelassene und bekanntermaßen CDC auslösende Antikörper Daratumumab verwendet. Nach erfolgter Bindung wurde gepooltes humanes Serum hinzugegeben, welches die Bestandteile der Komplementkaskade beinhaltet. Es erfolgte eine weitere Inkubation der Zellen für 30 minuten bei 37°C, um die Kaskade in Gang zu bringen. Als Kontrolle, dass gemessene Zelltötung durch das Komplementsystem bedingt ist, wurde parallel Serum verwendet, bei dem die enzymatischen Faktoren der Komplementkaskade zuvor durch Inkubation bei 56°C für 30 Minuten inaktiviert worden waren. Nach der Inkubation wurden die Zellen gewaschen und die DNA toter Zellen mittels Propidiumiodid angefärbt. Mittels Durchflusszytometrie wurde dann der Anteil toter Zellen bestimmt. Die Ergebnisse zeigen, dass einzelne hcAb nicht in die Lage sind, Tumorzellen mittels CDC zu töten (Abb. 15). Um eine Oligomerisierung von CD38 auf der Zellmembran zu ermöglichen und damit die Ausrichtung der Fc-Teile in Form eines Hexamers zu begünstigen, wurden zwei unabhängig bindende hcAb zur Zelltötung kombiniert. Die beiden hcAb wurden dabei im Verhältnis 1:1 gemischt und anschließend wie zuvor beschrieben für den Zytotoxizitätsassay verwendet. Im Gegensatz zu einzelnen hcAb zeigte die Kombination aus zwei hcAb nun eine effektive Zelltötung bis zu 100% (Abb. 15). Zur weiteren Charakterisierung wurden schließlich alle vorhandenen Nanobody hcAb mit einem weiteren der jeweiligen 3 Epitope kombiniert. Es zeigte sich, dass nur unabhängig bindende hcAb Kombinationen einen effektiven CDC auslösen können (Tabelle 3).



Abb. 15: Kombinationen aus zwei unabhängig bindenden hcAb induzieren eine starke Komplement-vermittelte Zytotoxizität (CDC).

Burkitt Lymphomzellen CA-46 (A) oder Myelomzellen LP-1 (B) wurden nach Zugabe von Daratumumab, individuellen hcAb, (1 μ g) oder Kombinationen von hcAb (0,5 μ g + 0,5 μ g) in Anwesenheit von 20% nativem humanem Serum für 30 min bei 37°C inkubiert. Als Kontrolle wurden paralell Ansätze mit inaktivem Serum (bei 56°C vorinkubiert, um die enzymatischen Komplementfaktoren zu inaktivieren) untersucht. Anschließend wurde mittels Durchflusszytometrie der Anteil Propidiumiodid (PI) positiver Zellen als Marker für tote Zellen ermittelt und im Balkendiagramm dargestellt. Die Gatingstrategie lässt sich den exemplarischen FACS Plots des kontr. Nb hcAb oder der Kombination von hcAb entnehmen.

	Epitop 1			Epit	op 2	Epitop 3				
	Name	WF211	MU274	Jk2	MU1067	Jk36	WF100			
	JKo28	2,78	2,28	99,7	99,9	99,8	53,00			
	WF211	2,85	2,87	99,7	99,6	99,5	36,50			
	WF69	2,57	4,12	99,8	99,9	99,7	96,70			
	MU1068	2,3	2,27	99,9	99,9	99,8	96,30			
	WF140	2,26	2,4	99,8	99,9	99,6	96,00			
	Jko44	4,6	5,22	99,9	99,9	99,9	97,80			
1	MU415	2,65	3,35	99,6	99,9	99,8	96,10			
	MU274	3,45	3,24	99,8	99,8	99,7	95,30			
	MU738	3,28	3,66	99,9	99,9	99,8	96,75			
	MU370	2,4	2,6	99,9	99,9	99,7	97,30			
	Jko29	1,86	2,21	99,1	99,8	99,8	97,40			
	Jko22	2,26	4,05	98,8	100	99,8	89,70			
	MU1053	3,15	2,37	99,5	100	99,7	54,00			
	MU523	99,2	99,2	4,2	4,6	99,7	96,60			
1 11	MU1067	99	98,7	4,3	4,8	99,7	95,80			
	Jko2	98	99,2	5	4,4	99,7	96,20			
	WF9	99	99,2	99,80	99,90	3,70	1,70			
	WF14	2,4	99,2	80,70	96,50	4,00	1,70			
	Jko36	97	99	99,6	99,6	4	1,72			
	WF32	96	98,8	99,8	99,8	4,5	1,80			
	Jko19	99	99,2	99,8	99,8	4,5	1,85			
3	WF100	98,5	99	99,8	99,8	5	1,96			
ΙШ	WF114	98,5	99,4	99,7	99,8	3,9	2,00			
	MU1105	99	99,1	99,5	99,8	3,8	2,12			
	WF42	98,6	99,2	95	98,1	8	2,20			
	WF121	99	99,2	99,2	98,9	4,2	1,94			
	WF139	99,3	99,2	98,6	99,4	5	2,25			
	WF124	48,4	99,3	95,5	99,6	4,3	2,17			

Tabelle 3: Nur unabhängig bindende hcAb Kombinationen induzueren CDC..

CA-46 Lymphomzellen wurden durch Zugabe verschiedener hcAb Kombinationen (angezeigt oben und links) im Beisein von 20 % gepooltem Serum für 30 min bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden der prozentuale Anteil toter Zellen mittels PI Färbung ermittelt und in der Tabelle dargestellt. Sich komplementierende Kombinationen sind in hellgrau und sich blockierende in dunkelgrau dargestellt. Einige Kombinationen verstärken sich nur teilweise (mittelgrau).

3.3.2. Kombinationen unabhängig bindender hcAb vermittelten auch im Falle des EGFR eine effektive Komplement abhängige Zytotoxizität

Um zu untersuchen, ob die Kombination zweier unabhängig bindender Antikörper auch bei anderen Oberflächenproteinen die Aktivierung des CDC verstärken, wurden ähnliche Versuche mit dem epidermalen Wachstumsfaktorrezeptor (EGFR) durchgeführt. Der epidermale Wachstumsfaktorrezeptor (EGFR) ist auf verschiedenen soliden Tumoren überexprimiert und ist ein gut erforschtes Zielprotein für Antikörper basierte Therapien (Roskoski 2014). Die beiden bereits publizierten EGFR-spezifischen Nanobodies 7D12 und 9G8 binden unabhängig voneinander an EGFR (Schmitz et al. 2013). Die beiden Nanobodies wurden an die hinge, CH2 und CH3 Domäne von humanem IgG1 fusioniert um EGFR-spezifische hcAb zu generieren. Der Komplement vermittelte Zytotoxizitäts-Assay (CDC) wurde nun an EGFR exprimierenden Hals-Kopf-Tumorzellen (SAT) unter Verwendung von 7D12 hcAb und 9G8 hcAb wiederholt. Auch hierbei zeigten einzelne hcAb keine zelltötende Wirkung, wohingegen die Kombination aus beiden zu einer effektiven Zelltötung führte (**Abb 16**). Der verstärkende Effekt von hcAb Kombinationen ist damit keine Besonderheit von CD38, sondern lässt sich auch auf andere Zielantigene übertragen.



Abb. 16: Kombinationen aus unabhängig bindende EGFR hcAb induzieren starken CDC.

SAT Zellen wurden nach Zugabe von 1 μ g hcAb oder 0,5 μ g + 0,5 μ g hcAb Kombinationen in der Anwesenheit von 40% gepooltem Serum (nativ oder Hitze inaktiviert) für 4 Stunden bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde der prozentuale Anteil PI positiver Zellen als Marker für tote Zellen mittels Durchflusszytometrie bestimmt. A) Exemplarische Gatingstrategie auf PI positive Zellen anhand des kontr. Nb hcAb oder der Kombination mit nativem Serum. B) Darstellung des prozentualen Anteils toter Zellen im Balkendiagramm.

3.3.3. Kombinationen aus Daratumumab mit einem unabhängig bindenden hcAb zeigen eine verstärkte CDC Aktivität

Als nächstes wurde untersucht, ob die Effektivität des zur Behandlung des Multiplen Myeloms eingesetzten konventionelle Antikörpers Daratumumab durch die Kombination mit einem unabhängig bindendem hcAb verstärken lässt. Hierdurch könnte die bestehende Therapie verbessert oder eventuelles Nichtansprechen auf Daratumumab überwunden werden. Um diese Fragestellung zu adressieren, wurden alle vorhandenen hcAb in einem Verhältnis von 1:1 mit Daratumumab gemischt und zur CA-46 Lymphomzelllinie gegeben. Nach Inkubation von 30 Minuten bei 37°C im Beisein von gepooltem Serum erfolgte die Analyse der getöteten Zellen mittels PI-Färbung in der Durchflusszytometrie. Es zeigte sich, dass alle Nb hcAb, die das gleiche Epitop binden wie Daratumumab (E1) in Kombination mit diesem nicht zu einer Steigerung des CDCs führten (Abb. 17 A). HcAb, die zuvor den Epitopen zwei und drei zugeordnet wurden, zeigten hingegen überwiegend eine starke Steigerung der Zelltötungsrate von Daratumumab (Abb. 17 B und C). HcAb die in den Kreuzblockade-Analysen ein mit Daratumumab überlappenden Epitop gezeigt hatten (s.o.Tabelle 2, WF121, WF124, und JK28 ein mit E1 und E3 überlappendes Epitop, sowie MU523 ein mit E1 und E2 überlappendes Epitop), zeigten ebenfalls keine Steigerung des CDC.





LP-1 Myelomzellen wurden mit einer Kombination aus Daratumumab bzw. dem scFv hcAb von Daratumumab (Epitop 1) und einem Nb hcAb (unten angezeigt) im Beisein von 20% gepooltem Serum für 30 min bei 37°C inkubiert. Anschleießnd wurde der Anteil PI positiver Zellen als Marker für tote Zellen ermittelt. A) Nb hcAb die dem Epitop 1 zugeordnet wurden. B) Epitop 2 C) Epitop 3.

3.3.4. CD38-spezifische biparatopische hcAb vermittelten eine effektive Komplement abhängige Zytotoxizität

Aufgrund der Tatsache, dass die Antigen-bindende Region eines Nanobodies nur von einer einzelnen Domäne gebildet wird, können Nanobodies einfacher als scFv von konventionellen Antikörper miteinander zu bi-und multispezifischen Konstrukten verbunden werden. Um zu ermitteln, ob die Fähigkeit der Oligomerisierung von CD38 auf der Zelloberfläche durch eine Kombination zweier unabhängige bindender hcAb in einem Konstrukt vereinigt werden kann, wurden biparatopische Schwerekettenantikörper generiert. Hierfür erfolgte die Verlinkung zweier unabhängig bindender Nanobodies mittels GS-Linker und die anschließende Fusion an die hinge und Fc-Domänen des humanem IgG1 (Abschnitt 3.2.1.). Diese biparatopischen Schwereketten-antikörper sind tetravalent und besitzen jeweils vier Bindungsdomänen für CD38. Da beide Nanobodies an unterschiedliche Epitope von CD38 binden, können biparatopische hcAb die Oligomerisierung mehrerer CD38 Moleküle auf der Zelloberfläche vermitteln. Dadurch könnte auch die Ausrichtung der Fc-Teile in Form eines Hexameres und im Folgenden eine C1q Aktivierung begünstigt werden. Um zu testen, ob biparatopische hcAb CDC auslösen können, wurden CA-46 Lymphomzellen oder LP-1 Myelomzellen mit einzelnen hcAb, Kombinationen aus hcAb oder biparatopischen hcAb im Beisein von gepooltem Serum für 30 Minuten bei 37°C inkubiert. Die toten Zellen wurden mittels Propidiumiodidfärbung in der Durchflusszytometrie ermittelt. Alle drei biparatopischen hcAb zeigten sich in der Lage CDC auszulösen und zeigten dabei stets eine höhere Zelltötungsrate als Daratumumab. Die Tötungskapazität des biparatopischen hcAb 211-121 (E1+E3) ist exemplarisch in Abbildung 18 dargestellt.



Abb. 18: Biparatopischen hcAb induzieren einen stärkeren CDC als Daratumumab. Burkitt Lymphomzellen CA-46 (A) oder Myelomzellen LP-1 (B) wurden nach Zugabe von 1 μg Ak, hcAb, biparatopischen hcAb oder Kombinationen von hcAb in Anwesenheit von 20% humanem Serum (nativ oder Hitze inaktiviert) für 30 min bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde mittels Durchflusszytometrie der Anteil Propidiumiodid (PI) positiver Zellen als Marker für tote Zellen ermittelt und im Balkendiagramm dargestellt. Die Gatingstrategie lässt sich den exemplarischen FACS Plots des kontr. Nb hcAb und biparatopischen hcAb entnehmen.

3.3.5. Die Länge des Linkers zwischen den beiden Nanobodies im biparatopischen hcAb kann die Effizienz des CDC beeinflussen

Die bisherigen Ergebnisse zeigten für drei biparatopische hcAb unterschiedlich gute Kapazitäten der Zelltötung, sowie teilweise eine schwächere Maximaltötungsrate als Kombination aus zwei entsprechenden hcAb (vergl. Abb 18). Im Unterschied zu Kombinationen aus zwei hcAb sind biparatopische hcAb aufgrund der Anordnung der Nanobodies im Dimer und auch aufgrund des verbindenden Linkers möglicherweise in ihrer Ausrichtung stärker eingeschränkt. Um einen möglichen Einfluss der Linkerlänge zwischen den beiden Nanobodies im bipartopischen hcAb zu untersuchen, wurden die Dimere 211-121 und 36-1067 mit unterschiedlich langen GS-Linkern kloniert, und zwar in Schritten von jeweils fünf Aminosäuren (GGGGS), von 5 bis zu 35 Aminosäuren (5GS-35GS) zwischen den beiden Nanobodies. Exemplarisch sind in Abbildung 19 B die Sequenzen des biparatopischen hcAb 211-121 mit den jeweils unterschiedlichen GS-Linkern (lila) aufgeführt. Die Nanobody-Sequenzen bleiben dabei identisch, es verlängert oder verkürzt sich lediglich der Abstand zwischen den beiden Domänen (Abb. 19 A). Alle Konstrukte wurden in HEK-6E Zellen produziert und auf ihre Kapazität CDC auszulösen getestet. Der biparatopische hcAb 211-121 zeigte dabei abhängig von der Linkerlänge eine deutlich unterschiedliche Tötungskapazität. Konstrukte mit kürzerem Linker (5GS, 10GS) lösten deutlich effektiver CDC aus (Abb. 19 C). Für den biparatopischen hcAb 36-1067 wurde hingegen im getesteten Linkerlängenbereich kein wesentlicher Unterschied festgestellt (Daten nicht gezeigt).



Abb. 19: Biparatopische hcAb 211-121 mit kürzeren Linkern sind effektivere CDC Induktoren.

A) Schemartische Darstellung eines biparatopischen hcAb. Der GS-Linker zwischen den beiden Nanobodies ist in seiner Länge variabel. B) Sequenz des biparatopischen hcAb 211-121. Die CDR 1 (grün), CDR2 (rot) und CDR3 (blau) Regionen der Nanobodies sind farbig markiert. Der GS-Linker (lila) variiert je nach Konstrukt zwischen 5 und 35 GS. C) CDC mit biparatopischen hcAb unterschiedlicher Linkerlänge. Nach Erstellung einer 1:2 Verdünnungsreihe des biparatopischen hcAb 211-121 mit GS-Linkerlängen variierend von 5 bis 35, wurden diese zu CA-46 Lymphomzellen gegeben und im Beisein von 20% humanem Serum für 30 min bei 37°C inkubiert. Anschließend erfolgte die Bestimmung PI positiver Zellen als Marker für tote Zellen in der Durchflusszytometrie.

3.3.6. Kombinationen von zwei unabhängig bindenden hcAb und biparatopische hcAb induzieren potenten CDC an primären Myelomzellen

In einem Pilotexperiment wurde analysiert, ob CD38-spezifische hcAb einen CDC auch an primären Knochenmarkzellen von Myelompatienten auslösen können. Hierzu erfolgte im Rahmen der Routinediagnostik eine Knochenmarkentnahme, von der nach Zustimmung des Patienten ein Aliquot für den CDC-Assay verwendet wurde. Lymphozyten und Myelomzellen (BMMC) wurden mittels Dichtegradientenzentrifugation angereichert. Anschließend wurden die Zellen mit einer Komibnation aus zwei hcAb oder dem entpsrechenden biparatopischen hcAb im Beisein von gepooltem humanem Serum für 120 Minuten bei 37°C inkubiert. Als Negativkontrolle diente ein unspezifischer hcAb, als Positivkontrolle Daratumumab. Nach der Inkubation wurden die Zellen hinsichtlich ihres Markerprofils (CD45 negativ, CD56 positiv, CD38 positiv) gefärbt und der Anteil toter Myelomzellen mittels Propidiumiodidfärbung ermittelt. Für die Anfärbung von CD38 wurde jeweils ein unabhängig zum hcAb bindender Alexa Fluor 647 gekoppelter Nanobody verwendet. Sowohl die hcAb Kombination (54%) als auch der biparatopische hcAb (48%) zeigten dabei eine deutlich stärkere Zelltötung als Daratumumab (19%) (Abb. 20).



Abb. 20: hcAb töten primäre Myelomzellen effektiver als Daratumumab.

Eine Knochenmarksprobe eines Myelompatienten mit 70% Tumorzellinfiltration wurde mittels Dichtegradientenzentrifukation aufgetrennt. Die gewonnenen BMMCs wurden nach Zugabe von 1 μ g Ak, hcAb oder 0,5 μ g + 0,5 μ g einer Kombination im Beisein von 20% gepooltem Serum für 120 min bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden die Zellen gefärbt und mittels Durchflusszytometrie der Anteil PI positiver Myelomzellen (CD45 neg, CD56 pos) ermittelt. Zur Färbung von CD38 wurde jeweils ein unabhängig bindender Nb zu dem zur Tötung verwendeten hcAb verwendet.

3.3.7. hcAb sind gute Ergänzungen zur Daratumumabtherapie

Um zu ermitteln, ob biparatopische hcAb oder Kombinationen aus zwei hcAb bzw. einem hcAb und Daratumumab eine gute Ergänzung und/oder Alternative zur Therapie mit Daratumumab darstellen könnten, wurde ein vergleichender CDC-Assay an CA-46 Lymphomzellen mit titrierten Konstrukten durchgeführt. Zu diesem Zweck wurden equimolare Mengen von Daratumumab, hcAb, biparatopischen hcAb oder Kombinationen in einer Verdünnungsreihe vorgelegt. Nach Zugabe von CA-46 Lymphomzellen und humanem Serum erfolgte eine Inkubation für 120 Minuten bei 37°C. Anschließend wurde der prozentuale Anteil toter Zellen nach Färbung mit Propidiumiodid mittels Durchflusszytometrie ermittelt (Abb. 21). Während Daratumumab auch in sehr hohen Konzentrationen nur eine schwache Zytotoxizität zeigte, waren Kombination aus zwei unabhängig bindenden hcAb wie auch die Kombination eines unabhängig bindenden hcAb mit Daratumumab bereits bei geringen Konzentrationen effektiv (EC50 \sim 3 nM). Der biparatopische hcAb zeigte eine geringere Tötungskapazität (EC50 \sim 10 nM, maximale Zytotoxizität 80% vs. 98% bei den Kombinationen), die aber dennoch deutlich die von Daratumumab übersteigt. Diese Ergebnisse deuten an, dass eine ergänzende Therapie mit einem hcAb, ober auch die Monotherapie mit einem biparatopischen hcAb eine Verbesserung der Therapie bringen könnte.





Es wurden Verdünnungsreihe equimolarer Mengen der verschiedenen Nb-Konstrukte, Daratumumab oder Kombinationen erstellt. Anschließend wurden CA-46 Lymphomzellen hinzugegeben und im Beisein von 20% gepooltem Serum für 120 min bei 37°C inkubiert. Der Anteil toter Zellen wurde mittels Propidiumiodidanfärbung ermittelt.

3.3.8 hcAb induzieren Antikörper abhängige zelluläre Zytotoxizität (ADCC)

Neben der Komplement vermittelten Zelltötung ist die Antikörper abhängige zelluläre Zytotoxizität (ADCC) ein weiterer wichtiger Mechanismus Zielzellen zu töten. Beim ADCC werden nach Bindung eines Antikörpers an das Zielantigen, Fc-Rezeptor-tragende Effektorzellen aktiviert, die durch Ausschüttung von Granzymen und Perforinen die Targetzelle abtöten (Abb. 2). Daratumumab ist in der Lage effektiven ADCC auszulösen (de Weers et al. 2011). Im Folgenden wurden alle verfügbaren hcAb Varianten auf ihre Fähigkeit hin getestet ADCC auszulösen. Hierfür wurde ein Lumineszenz-basierter Assay mit Luziferase-transfizierten LP-1 luc Zellen eingesetzt. Nach Zugabe des Substrats Luciferin wird von lebenden Zellen ein ATP-abhängiges Biolumineszenz Signal erzeugt, tote Zellen zeigen hingegen aufgrund des ATP-Verlusts nur schwache Signale. Es wurden Verdünnungsreihen von hcAb und Ab Kombinatinen erstellt. Anschließend wurden LP-1 luc Myelomzellen hinzugegeben und für 10 min bei 4°C inkubiert. Nach dem Waschen erfolgte die Zugabe von NK-92 hCD16 in einem Verhältnis von 1:3 [Z:E]. Nach 4h Inkubation bei 37°C wurden die Zellen gewaschen und in Luziferin-Lösung aufgenommen. Es erfolgte nach 20 min die Messung des Bioluminescenzsignales im Viktor. Alle Ansätze wurden in dreifacher Ausführung gemessen. Der prozentuale Anteil toter Zellen wurde im Verhältnis zur Negativkontrolle bestimmt. Hierfür wurde folgende Formel verwendet:

$$\%$$
toteZellen = $\left(1 - \frac{MeanBLISignalProbe}{MeanBLISignalNegativkontrolle}\right)x100$

Alle Konstrukte zeigten eine deutliche ADCC Aktivität (EC50 ~0.1 nM), die bei ähnlich niedrigen Konzentrationen ihr Maximum erreicht. Daratumumab zeigte dabei eine etwas geringere Maximaltötung als die hcAb (Abb. 22). Kombinationen von hcAb sowie der biparatopische hcAb bringen im Gegensatz zum CDC keine Verbesserung der Tötungskapazität gegenüber einzelnen hcAb.



Verdünnungsreihe verdünnt. Anschließend wurden diese zu LP-1 luc Myelomzellen (Zielzelle) gegeben und für 10 min bei 4°C inkubiert. Nach einmaligem Waschen wurden NK-92 hCD16 (Effektorzelle) in einem Verhältnis von 1 zu 3 (Z:E) hinzugegeben und für 4h bei 37°C inkubiert. Nach der Inkubation wurden die Zellen in 100 μ l Luciferin-Arbeitslösung aufgenommen und das Biolu minescenzsignal nach 20 min gemessen. Der Anteil toter Zellen wurde im Verhältnis zur Negativkontrolle bestimmt.

4. Diskussion

Ziel dieser Arbeit war die Herstellung humanisierter CD38-spezifischer Schwerekettenantikörper für die Markierung und Tötung von Tumorzellen über Fcabhängige Mechanismen. Die folgende Diskussion behandelt die erhobenen Ergebnisse in zwei Abschnitten. Im ersten Teil werden die Modifikationen der Target- und Effektor-Zelllinien diskutiert. Im zweiten Teil erfolgte eine Diskussion der Analysen der Schwerekettenantikörper hinsichtlich der Induktion von Komplement vermittelter Zytotoxizität und Antikörper abhängiger zellulärer Zytotoxizität.

4.1. Modifikation und Charakterisierung humaner Zelllinien

Um eine bessere Quantifizierung der Tötungsassays zu ermöglichen, wurden die Myelom Zelllinie LP-1 und die beiden Burkitt Lymphomzelllinien CA-46 und Daudi durch Eingringen von Reportergenen genetisch modifiziert. Zunächst erfolgte mittels lentiviraler Transduktion das Einbringen des Reportergens GFP zusammen mit einer Luziferase (3.1.1.). Das GFP ermöglicht die spätere Detektion der Tumorzellen in der Mikroskopie sowie Durchflusszytometrie. Die Luziferase setzt Luciferin unter Verbrauch von ATP um, wobei ein Bioluminescencesignal erzeugt wird (Wilson et al 1998). Diese Eigenschaft erlaubt den Einsatz der generierten Zelllinien in unterschiedlichen Versuchsmodellen. Das Bioluminescenzsignal ist sowohl in vitro als auch in vivo detektierbar. Dieses ermöglicht die Verwendung der Zellen für Vitalitätsassays in vitro (Nijhof et al 2015), sowie die Detektion von Tumorzellen mittels IVIS in einem Mausmodell in vivo (Wang et al 2018). Da ATP in hoher Konzentration von lebenden Zellen produziert wird und es für die Erzeugung eines Bioluminescenzsignals benötigt wird, korreliert die Höhe des Signales mit der Anzahl und Vitatlität der Zellen. Um die Luziferaseaktivität zu quantifizieren, wurde den Zellen Luciferin zugegeben. Anschließend erfolgte eine Bioluminescenzmessung alle 2 Minuten für einen Zeitraum von 2 Stunden. Wie dem Zeitverlauf in Abbildung 5 B zu entnehmen, zeigt sich zunächst ein rascher Anstieg des BLI Signals mit einem Maximum bei etwa 10 Minuten. Anschließend fällt das Signal langsam und kontinuierlich ab. Um größere Schwankungen in den Messungen zu vermeiden wurde für spätere Versuche daher eine Messzeit nach 20 Minuten gewählt.

Um Negativkontrollen für die Zytotoxizitätsassays bereit zu stellen, wurde in dieser Arbeit zudem das CD38-Gen in den verwendeten Zelllinien mittels CRISPR/Cas9 Technologie inaktiviert. Nach Bindung der spezifischen RNA Sequenz an den CD38 Genlokus, wird

durch die Cas9 Nuklease ein Doppelstrangbruch induziert und das Gen bei der Reparatur dieses Bruchs strukturell und funktionell inaktiviert (Sander and Joung 2014, Zhou et al 2018). Auf diese Weise konnten erfolgreich CD38-negative, Luciferase und GFP positive Kontrollzellen erstellt werden (Abb. 7). Obwohl die Methodik durch seine 20 Nukleotide umfassende RNA Erkennungssequenzen spezifisch ist, ist denkbar, dass neben CD38 weitere Gene inaktiviert werden, die eine ähnliche Sequenz tragen (Hsu et al 2013). Wenngleich dieser Umstand nie gänzlich auszuschließen ist, konnten bei den hier untersuchten Zellen weder im Wachstum noch in der Morphologie der Zellen auffällige Unterschiede festgestellt werden. Zudem zeigte die Anfärbung der für diese Arbeit relevanten Oberflächenmarker (Tabelle 1) jeweils ein ähnliches Oberflächenprofil der CD38-defekten und parentalen Zelllinien. Alle Lymphomzelllinien zeigten sich dabei positiv für CD45, wohingegen sich die Myelomlinien CD45 negativ darstellten. CD38 wurde von den getesteten Linien (bis auf KO) in unterschiedlich hohem Maße exprimiert. Ein wichtiger Einflussfaktor für die Sensitivität gegenüber dem CDC ist die Expression von CD55 und CD59. Beide Proteine inhibieren die Komplementkaskade durch Bindung der Faktoren C3b oder C8 (Fujita et al. 1987, Ricklin et al. 2010) und könnten deshalb eine Resistenz der Zellen gegenüber der CDC bewirken. Bei Myelompatienten, die unter Therapie mit Daratumumab einen Rückfall erlitten, zeigten die Tumorzellen eine Hochregulation dieser beiden Proteine auf der Zelloberfläche (Nijhof et al. 2016, Wang et al. 2017). Die Zelllinien LP-1, CA-46 und Daudi zeigen eine eher geringe oder keine Expression von CD55 und CD59, wohingegen die anderen untersuchten Myelomlinien eines oder auch beide Proteine in höherem Maße exprimieren (Tabelle 1). Korrelierend dazu zeigten Myelomlinien mit hoher Expression von CD55 und CD59 ein vermindertes Ansprechen im CDC (Daten nicht gezeigt).

Neben der Modifikation der Tumorzellen wurde auch die NK-92 Effektorzelllinie für die Durchführung der Antikörper abhängigen zellulären Zytotoxizität genetisch modifiziert. NK-92 Zellen entstammen einem Patienten mit monoklonalem NK-Zelllymphom und sind bekannt für ihre gute anti-Tumoraktivität (Klingemann et al. 2016). Sie erreichten in ersten klinischen Versuchen bei Patienten mit fortgeschrittenem Lungen-, Nieren- oder Hautkrebs gute Antitumoreffekte mit wenig Nebenwirkungen (Arai et al. 2008, Tonn et al. 2013). Um eine spezifische Antikörper abhängige Zelltötung zu ermöglichen, wurden NK-92 Zellen in dieser Arbeit wie von Clémenceau et al. zuvor beschrieben mit einem murinem oder humanem chimären CD16 Fusionsprotein (FcγRIII/FcεRI) transduziert (Clémenceau et al. 2006 und 2013). Die so generierten Zelllinien NK-92 mCD16 und NK-92 hCD16 wurden auf ihre spezifische Expression dieser Rezeptoren sortiert (Abb. 9). Anschließend erfolgte die Testung auf ihre Möglichkeit Antikörper abhängig Tumorzellen zu töten.
Zu diesem Zweck wurden Lymphomzellen mit dem bekannter maßen ADCC auslösendem Antikörper Daratumumab inkubiert (**Abb. 8**). Die Ergebnisse zeigen einen potenten ADCC durch NK-92_hCD16, aber nicht durch NK-92 mCD16. Murine und humane Fcγ-Rezeptoren unterscheiden sich zu ca. 30% und binden verschiedene Immunglobuline unterschiedlicher Spezies und Subklassen unterschiedlich gut (Bruhns 2012, Dekkers et al. 2017). Dieses könnte die geringe Effizienz der NK-92 mCD16 erklären. Trotzdem stehen diese Ergebnisse in Kontrast zu publizierten Arbeiten, die zeigten, dass humanes CD16 murines IgG2a nur schwach bindet, während murines CD16 humanes IgG1 vergleichsweise gut bindet (Bruhns 2012, Clémenceau et al. 2013, Dekkers et al. 2017). Dass das hier klonierte mCD16 generell funktionstüchtig ist, konnte in Versuchen mit ADCC-optimierten humanen Fc-Teilen verifiziert werden (Daten nicht gezeigt). Um dieses Phänomen weiter zu evaluieren, sollte ADCC-Assays mit murinen Schwerekettenantikörpern erfolgen. Zudem sollte bei *in vivo* Versuchen in der Maus beachtet werden, dass humanes IgG1 von murinen Fcγ-Rezeptoren eventuell abgeschwächt oder gar nicht gebunden wird.

4.2. Schwerekettenantikörper-vermittele Tötung von CD38 exprimierenden Tumorzellen

Der zweite Teil der Arbeit befasst sich mit der Erzeugung von humanisierten Schwerekettenantikörpern (hcAb), die auf ihre Fähigkeit Fc-vermittelte Zelltötung auszulösen untersucht wurden. Schwerekettenantikörper treten natürlicherweise in Kameliden auf. Sie haben im Laufe der Evolution die CH1 Domäne der schweren Kette und die Bindung zur leichten Kette verloren. Sie bestehen daher nur aus zwei schweren Ketten und bilden ihre Antigenbindungsstelle mit einer einzelnen variablen Domäne (VHH). Diese variable Domäne ist auch ohne den konstanten Teil zur Antigenbinung befähigt. Als rekombinante Einzeldomänen-Antikörper werden VHHs auch Nanobody genannt (Wesolowski et al 2009, Muyldermans et al 2013). Konventionelle Antikörper bestehen hingegen aus leichter und schwerer Kette und bilden ihre Antigenbindungsstelle aus den variablen Domänen beider Ketten. Schwerekettenantikörper haben einige Vorteile gegenüber konventionellen Antikörpern und Nanobodies haben Vorteile gegenüber den aus konventionellen Antikörpern rekombinant hergestellten Antigen-bindende Domänen, des sogenannten scFv (single chain variable Fragment). Aufgrund ihrer geringeren Größe zeigen Nanoboies eine bessere Gewebepenetration in vivo. Sie liegen unterhalb der Filtrationsgrenze der Niere (80kDa) und können renal ausgeschieden werden. Dieses führt zu einer schnellen Eliminierung aus der Blutbahn, was insbesondere für diagnostische Zwecke von Vorteil sein kann (Bannas et al. 2015). Im Gegensatz zu konventionellen Antikörpern, die relativ planar auf ihrem Antigen binden, sind Nanobodies in der Lage mit ihrer CDR3 Schleife in Vertiefungen zu binden. Dieses ermöglicht die Bindung z.B. des aktiven Zentrums eines Enzyms oder einer anderen schwer zugänglichen Region des Antigens (Fumey et al. 2017, Muyldermans et al. 2013). Des Weiteren sind Nanobodies sehr gut löslich und stabil. Sie lassen sich relativ einfach produzieren und auch modifizieren. So ist es aufgrund der guten Löslichkeit der einzelnen Bindungsdomäne problemlos möglich mehrere Nanobodies aneinander zu hängen und bi- oder multivalente Konstrukte zu erzeugen (Fumey et al. 2017). Gleichzeitig können weitere Funktionen durch Kopplung an andere Substanzen wie beispielsweise Toxine oder radioaktive Tracer generiert werden (Bannas et al. 2015, Yu et al. 2017, Iezz et al. 2018).

In Vorarbeiten hatte die AG Nolte 22 Familien CD38-spezifischer Nanobodies aus immunisierten Lamas gewonnen (Fumey et al. 2017). Um humanisierte Schwerekettenantikörper zu erzeugen, wurden einzelne Nanobodies (VHH) mit der hinge, CH2 sowie CH3 Domäne von humanem IgG1 fusioniert (Abb. 11). Anschließend wurden diese humanisierten hcAb in HEK Zellen produziert und aufgereinigt. Ausgewählte Nanobodies und Schwerekettenantikörper wurde an AlexaFluor 647 gekoppelt, um eine Detektion in der Durchflusszytometrie zu ermöglichen (Abb. 12). Die spezifische Bindung der erzeugten Nb hcAb wurde durch die Anfärbung von peripheren Blutlymphozyten bestätigt (Abb. 14).

Durch die Fusion an einen Fc-Teil gewinnen Nanobodies neue Funktionalitäten. Zum einen hat ein hcAb im Vergleich zu einem Nanobody zwei Antigenbindungsstellen, was eine stärkere Bindung an das Zielantigen erwarten lässt. Diese Erwartung konnte in einem Dissoziationsassay bestätigt werden (Abb. 13). Des Weiteren hat ein hcAb die Möglichkeit, Fc-abhängige Effektor-Mechanismen wie die Komplement vermittelte Zytotoxizität (CDC) oder die Antikörper abhängige zelluläre Zytotoxizität (ADCC) auszulösen. Um die Auslösung des CDC zu evaluieren, wurden LP-1 Myelom- und CA46 Lymphomzelllinien mit CD38 spezifischen hcAb im Beisein von gepooltem humanem Serum als Quelle für das Komplementsystem inkubiert. Als Negativkontrolle diente ein nicht bindender hcAb. Als Positivkontrolle diente Daratumumab, der bekanntermaßen Komplementaktivierung zeigt (de Weers et al. 2011). Die getesteten hcAb waren alleine nicht in der Lage eine Komplement vermittelte Zelltötung auszulösen (Abb. 15). Die Möglichkeit eines Antikörpers das Komplementsystem zu aktivieren hängt von mehreren Faktoren ab und ist noch nicht abschließend geklärt. Das Expressionslevel des Zielantigens und damit die Menge an gebundenem Antikörper spielt eine Rolle (van Meerten et al. 2006). Für die Versuche wurden daher Tumorzellen mit einer hohen CD38 Expression auf der Zelloberfläche verwendet. Ein weiterer wichtiger Faktor für die Komplementaktivierung scheint die Ausrichtung der Fc-Teile in Form eines Hexamers zu sein, um die Bindung von C1q zu stärken (Abb. 1) (Diebolder et al. 2014). C1q ist als Hexamer in der Lage sechs Fc-Teile gleichzeitig zu binden. Es wird angenommen, dass eine suffiziente Komplementaktivierung auch nur dann erfolgt, wenn tatsächlich mehrere Fc-Teile gleichzeitig binden. Dieses wird begünstigt durch die Ausrichtung von sechs IgG-Antikörpern in Form eines Hexamers (Diebolder et al. 2014, Cook et al. 2016). Es wird angenommen, dass sowohl Größe, Dichte und Beweglichkeit des Zielantigens auf der Zelloberfläche, sowie das durch den Antikörper gebundene Epitop die Anordnung der IgGs bestimmen (Diebolder et al. 2014). Auch die Bindung verschiedener Antikörper an das gleiche Zielprotein könnte die Ausbildung von Hexameren auf der Zelloberfläche begünstigen. Um diese Hypothese zu testen, wurden zwei unabhängig voneinander bindende hcAb kombiniert in CDC Assays eingesetzt. Dieses war möglich, da die 22 Familien von CD38-spezifischen Nanobodies an drei unterschiedliche, nicht überlappende Epitope binden (Tabelle 2, Fumey et al. 2017). Die Kombination von einem hcAb mit einem weiteren hcAb eines anderen Epitops löste tatsächlich eine nahezu 100 %ige Zelltötung bereits binnen 30 Minuten aus (Abb. 15). Alle drei möglichen Epitopkombinationen (E1 + E2, E1 + E3, E2 + E3) zeigten dabei eine ähnlich gute Induktion der Zelltötung (Tabelle 3). Um zu verifizieren, dass die Tötung Komplement vermittelt war und nicht durch andere Mechanismen hervorgerufen wurde, wurde Hitze inaktiviertes Serum verwendet, welches kein funktionelles Komplementsystem enthält. Die Ergebnisse zeigen, dass die Induktion des Zelltods durch Kombiantionen zweier unabhängig bindender Schwerekettenantikörper in der Tat Komplement abhängig ist. Um zu ermitteln, ob vergleichbare Effekte auch bei anderen Zelloberflächenantigen erzielt werden können, wurden die beiden durch Schmitz et al. publizierten EGFR-spezifischen Nanobodies 7D12 und 9G8 an die hinge, CH2 und CH3 Domäne von humanem IgG1 fusioniert und rekombinant hergestellt. 7D12 und 9G8 binden unabhängig voneinander auf dem EGF Rezeptor (Schmitz et al. 2013). Die so erzeugten EGFR spezifischen hcAb wurden nun hinsichtlich ihrer Kapazität getestet bei EGFR exprimierenden Hals-Kopf-Tumoren Komplement vermittelte Zytotoxizität auszulösen. Auch hierbei zeigten die einzelnen hcAb keinen CDC-induzierenden Effekt, wohingegen die Kombination aus beiden hcAb eine starke CDC verursachte (Abb. 16). Das Phänomen der CDC Steigerung durch Kombination zweier unabhängig bindender hcAb scheint demnach auf andere Ziele übertragbar zu sein. Es ließe sich durch eine Begünstigung der Hexamerbildung erklären. Die Hypothese ist dabei, dass die Hexamerbildung durch eine Quevernetzung von CD38 auf der Zelloberfläche erfolgt. Einzelne hcAb können mit ihren beiden Armen lediglich zwei CD38 Moleküle vernetzen (**Abb. 23 A**). Zwei unabhängig bindende hcAb hingegen sind in der Lage mehrere CD38 Moleküle zu vernetzen und deren Fc-Teile in räumliche Nähe zu bringen, was eine Hexamerbildung begünstigen könnte (**Abb. 23 B und C**).



Abb. 23: Schematische Darstellung möglicher Quervernetzungen von CD38 durch hcAb.

A) Einzelne hcAb können lediglich zwei CD38 miteinander verbinden. B und C) Zwei unabhängig voneinander bindende hcAb können mehrere CD38 quervernetzen und eine Hexamerbildung der Fc-Teile ermöglichen. D) Biparatopische hcAb sind ebenfalls in der Lage eine Quervernetzung zu erzeugen.

Um diese These zu prüfen wurden biparatopische hcAb konstruiert, die zwei unabhängig bindende Nanobodies über einen GS-Linker verbinden. Das erzeugte tetravalente Konstrukt müsste in der Lage sein, zwei Epitope auf CD38 zu binden und damit Quervernetzungen von mehreren CD38 Molekülen zu erzeugen (Abb. 23 D). Dabei besitzt ein biparatopischer Schwerekettenantikörper jedoch nur einen Fc -Teil und erhöht damit nicht die absolute Menge an gebundenen Antikörper. Die Ergebnisse der Zytotoxizitätsassays zeigen, dass biparatopische hcAb tatsächelich eine CDC Aktivierung induzieren können (Abb. 18).

Dabei zeigten biparatopische hcAb jedoch in der Regel eine etwas geringere Tötungsrate als Kombinationen von zwei unabhängig bindenden hcAb. Wir vermuteten, dass der GS-Linker zwischen den beiden Nanobodies in einem biparatopischen hcAb die Anordnung der hcAb auf der Zelloberfläche und/oder die Flexibilität der Antikörperausrichtung eingeschränken könnte. Aus diesem Grund wurden die biparatopischen hcAb 211-121 (E1 + E3) und 36-1067 (E3 + E2) mit unterschiedlichen Linkerlängen (5-30 GS) kloniert und produziert. Die Ergebnisse von Zytotoxizitätsassays mit diesen Konstrukten ergaben tatsächlich teils erhebliche Unterschiede in der Komplementaktivierung durch biparatopische hcAb mit unterschiedlichen GS-Linkern. Während bei dem biparatopischen hcAb 211-121 die Konstrukte mit kurzem Linker (5 und 10GS) eine stärkere Komplementaktivierung auslösten (Abb. 19 C), zeigten 36-1067 Konstrukte mit unterschiedlichen Linkerlängen jeweils eine ähnlich gute Aktivierung des CDC (nicht gezeigt). Dieser Umstand könnte durch die unterschiedlichen Epitopkombinationen erklärt sein. Dass kürzere Linker eine höhere Komplementaktivierung aufweisen, könnte verschiedene Gründe haben. Eine Möglichkeit ist, dass ein langer Linker dem biparatopischen hcAb ermöglicht, mit beiden Nanobodies eines Armes das gleiche CD38 Molekül zu binden (Abb. 24 B). Dieses würde eine Quervernetzung einschränken und damit die Formierung von Hexameren reduzieren. Eine weitere Möglichkeit ist, dass mit langen Linkern ausgestattete biparatopische hcAb zwar CD38 Moleküle vernetzen, diese sich aber dennoch zu weit auseinander befinden um effiziente Hexamerformierung zu erlauben (Abb.24 D). Kurze GS-Linker hätten diese Probleme nicht. Auch wenn der kurze Linker die gleichzeitige Bindung beider Nanobodies eines Armes verhindern würde, wäre eine Quervernetzung weiterhin möglich (Abb.24 C). Für weitere Versuche wurden daher biparatopische hcAb mit der für ihre Epitopkombination effizienteste Linkerlänge gewählt. Es erfolgte schließlich die Evaluierung der biparatopischen Schwerekettenantikörper an primären Mylomzellen aus dem Knochenmark von Myelompatienten. Tumorzellen wurden zunächst mittels Dichtegradientenzentrifugation angereichert und anschließend mit verschiedenen hcAb oder Daratumumab im Beisein von gepooltem humanem Serum behandelt. Sowohl Kombinationen von zwei hcAb als auch biparatopische hcAb zeigten dabei eine deutlich effektivere Induktion der Tumorzelllyse als Daratumumab (Abb. 20). Diese hcAb bieten daher eine potentiell effektivere Alternative für die Behandlung von Myelompatienten. Es ist jedoch eine Unterstützung des therapeutischen Effekts von Daratumumab durch unabhängig bindende hcAb denkbar. Um diese Hypopthese zu testen, wurden vorhandene hcAb 1:1 mit Daratumumab gemischt und anschließend CDC Assays durchgeführt. Hierbei zeigte sich - analog zu hcAb Kombinatioen - eine Verstärkung der Komplementaktivierung mit unabhängig von Daratumumab bindenden hcAb (Abb. 17). Im Gegensatz dazu, zeigten hcAb, die ein mit Daratumumab überlappendes Epitop binden, keine Verstärkung der Wirkung von Daratumumab.



Abb. 24: Schematische Darstellung der möglichen Bindung von biparatopischen hcAb mit kurzem und langem GS-Linker.

A und C) Biparatopischer hcAb mit kurzem GS-Linker. B und D) Biparatopischer hcAb mit langem GS-Linker. Ein zu langer GS-Linker könnte dazu führen, dass der hcAb beide Epitope desselben CD38 bindet und dadurch eine Quervernetzung verhindert (B). Gleichermaßen ist es möglich, dass zwar CD38 quervernetzt wird, dir Fc-Teile aber dennoch zu weit auseinander liegen, um sich zu Hexameren zu formieren (D). Ein kurzer GS-Linker erlaubt diese Möglichkeiten nicht (A und C).

Im direkten Vergleich von hcAb, biparatopischen hcAb und Kombinationen von zwei hcAb oder Kombinationen eines hcAb mit Daratumumab, zeigten sich alle Kombinationen jeweils als am effezientesten, dicht gefolgt von dem biparatopischen hcAb (**Abb. 21**). Bereits geringe Konzentrationen von ca. 10 nM (0,00001 µmol/ml) führten zu einer maximalen Zelltötung binnen 30 Minuten. Biparatopische hcAb bieten daher eine mögliche Alternative zu Daratumumab in der Therapie des Multiplen Myeloms. Denkbar wäre auch einen hcAb zur unterstützenden Therapie mit Daratumumab zu verwenden. Dieser könnte entweder primär mit Daratumumab kombiniert werden oder aber auch bei Nichtansprechen hinzugenommen werden. Es sind allerdings weitere Untersuchungen notwendig um zu prüfen, ob Resistenzen mit derartigen Antikörper Kombinationen überwunden werden können.

Neben der Komplement vermittelten Zytotoxizität ist die Antikörper abhängige zelluläre Zytotoxizität ein wichtiger Mechanismus in der Antikörper basierten Tumortherapie. Studien mit Fc-Rezeptor knock out Mäusen, oder mit Mäusen, die aufgrund fehlender Effektorzellen nicht in der Lage sind, ADCC auszulösen, zeigen eine schlechtere anti-Tumoraktivität von Antikörper auf als bei immunkompetenten Mäusen, obwohl CDC weiterhin möglich ist (de Haij et al. 2010). Die hcAb wurden daher auf ihre Fähigkeit, ADCC auszulösen, untersucht. Sowohl einzelne hcAb als auch biparatopische hcAb und Kombinationen von hcAb induzierten eine zelluläre Zytotoxizität (Abb. 22). Dabei waren alle Konstrukte in etwa gleichwertig, d.h. man konnte keine Effektsteigerung durch Kombinationen von hcAb erkennen. Dieser Umstand ist damit zu erklären, dass für die NK-Zell vermittele Tötung keine Hexamerformierung nötig ist. Zudem ist der ADCC weniger abhängig von der Dichte des Zielantigens auf der Zelloberfläche als der CDC (van Meerten et al. 2006). Vermutlich können CDC und ADCC nicht gleichzeitig ablaufen, aber dennoch ergänzende Effekte zeigen. Der ADCC greift dabei meistens dann, wenn der CDC limitiert ist (Mishima et al. 2003, van Meerten et al. 2006). Zudem kann der ADCC, solange genügend CDC ausgelöst wird, inhibiert sein (Mishima et al. 2003).

4.3. Ausblick auf weiterführende Arbeiten

Zusammenfassend deuten die hier gezeigten Ergebnissen an, dass humanisierte Schwerekettenantikörper Potential für die Verwendung in der Tumortherapie aufweisen. Aufgrund ihrer Eigenschaften zeigen hcAb einige Vorteile gegenüber konventionellen Antikörpern. Durch ihren CDR3 Loop können sie andere Epitope als konventionelle Ak erreichen. Zusätzlich sind sie kleiner und ermöglichen daher eine bessere Gewebepenetration. Ein entscheidender Vorteil bildet zudem die relativ einfache Produktion und Modifikation von Nanobodies. So können relativ einfach bi- oder multivalente Konstrukte, oder Kopplungen an weitere Strukturen erfolgen. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass CD38 spezifische biparatopische hcAb in der Lage sind Myelom- und Burkitt Lymphomzelllinien effektiv durch CDC und ADCC zu töten. Sie zeigten dabei eine deutliche bessere Effektivität als Daratumumab. Gleichzeitig könnten unabhängig bindende hcAb eine Therapie mit Daratumumab unterstützen. Beides könnte die Myelomtherapie deutlich verbessern. Entscheidend für die anti-Tumoreffekte eines Antikörpers sind jedoch vermutlich verschiedene Mechanismen. So sollte die anti-Tumoraktivität der hcAb in einem Setting getestet werden, dass CDC und ADCC Tötungsmechanismen gleichzeitig zulässt. In weiteren Versuchen sollte zudem getestet werden, ob hcAb in der Lage sind, andere Zytotoxizitätsmechanismen, wie die Antikörper abhängige zelluläre Phagozytose (ADCP) oder eine direkte Apoptose, auszulösen. Zusätzlich ist denkbar, dass CD38 spezifische hcAb in vivo ähnliche immunregulatorische Effekte wie Daratumumab auslösen (Krejcik et al 2016). Auch dieses müsste in weiteren Versuchen evaluiert werden.

5. Zusammenfassung

CD38 ist ein Zelloberflächen-Enzym, das von hämatologischen Neoplasien wie dem Multiplen Myelom und dem Burkitt Lymphom oft überexprimiert wird. Nanobodies sind Einzeldomänenantikörper und bestehen der aus variablen Domäne von Schwerekettenantikörpern, die natürlicherweise in Lamas vorkommen. In Vorarbeiten hatte unsere Arbeitsgruppe Nanobodies aus immunisierten Lamas isoliert, die spezifisch an CD38 binden. In der vorliegenden Arbeit wurden diese Einzeldomänenantikörper an die hinge und Fc-Domänen humanem fusioniert, von IgG1 um einen humanisierten Schwerkettenantikörper (hcAb) zu erzeugen. Diese Antikörper wurden hinsichtlich ihrer Kapazität untersucht, Komplement vermittelte Zytotoxizität (CDC) und Antikörper abhängige zelluläre Zytotoxizität (ADCC) gegenüber LP-1 Myelom und CA-46 Burkitt Lymphom Zelllinien auszulösen. Während einzelne hcAb nicht in der Lage sind Tumorzellen mittels CDC zu töten, vermittelt die Kombination aus zwei unabhängig bindenden hcAb hingegen eine starke Zelltötung. Gleichermaßen sind humanisierte Schwerekettenantikörper in der Lage, die CDC des bereits zur Therapie des Multiplen Myeloms zugelassenen Antikörpers Daratumumab zu verstärken, sofern die hcAb unabhängig von Daratumumab an CD38 binden. Zur weiteren Optimierung wurden biparatopische Schwerekettenantikörper konstruiert, in denen zwei unabhängig bindende Nanobodies über einen Linker verbunden und mit der hinge, CH2 sowie CH3 Domäne von humanem IgG1 fusioniert wurden. Die resultierenden tetrameren biparatopischen hcAb sind ebenfalls in der Lage Tumorzellen mittels CDC zu töten und zeigen dabei eine bessere Effektivität als Daratumumab. Alle getesteten hcAb zeigen zudem eine hohe Kapazität, ADCC auszulösen, die vergleichbar mit der von Daratumumab ist. Somit bieten humanisierte Schwerekettenantikörper neue Optionen für die Therapie von CD38 überexprimierenden Neoplasien.

Abstract

CD38 is a cell surface ectoenzyme that is highly expressed by many haematological malignancies including multiple myeloma and Burkitt's lymphoma. Nanobodies correspond to the variable fragment of heavy chain only antibodies that naturally occur in llamas. In previous studies our group selected nanobodies that recognize three non-overlapping epitopes on CD38. In this study we fused these nanobodies to the hinge, CH2 and CH3 domains of human IgG1 to generate humanized heavy chain antibodies (hcAb). We then tested the capacity to induce complement dependent cytotoxicity (CDC) and antibody dependent cellular cytotoxicity (ADCC) towards LP-1 myeloma or CA46 Burkitt lymphoma cell lines. While single hcAb were not able to induce CDC, a combination of two hcAb that recognize distinct epitopes of CD38 led to high CDC. Some hcAbs also increased the CDC of daratumumab, a recently licensed antibody for treatment of multiple myeloma, provided that the hcAb could bind to CD38 independently of daratumumab. Further, we genetically fused two nanobodies that bind independent epitopes of CD38 in a biparatopic dimer format and fused the resulting construct to the hinge, CH2 and CH3 domain of human IgG1 to generate biparatopic hcAbs. The biparatopic hcAbs showed potent CDC and were more efficient than daratumumab. Last, we tested the capacity to induce ADCC. All hcAb induced potent ADCC similar to daratumumab. The CD38-specific humanized heavy chain antibodies described in this thesis hold promise as new therapeutics for multiple myeloma and other hematological malignants expressing CD38.

6. Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
Ab	Antibody, Antikörper
ADCC	Antikörper abhängige zelluläre Zytotoxizität
ADCP	Antikörper abhängige zelluläre Phagozytose
AF	AlexaFluor
Alpha-MEM	Minimal Essential Medium Alpha
ATP	Adenosintriphosphat
bi hcAb	biparatopischer heavy chainAntibody
BL	Burkitt Lymphom
BLI	Bioluminescence
BSA	Bovine Serum Albumin
CDC	Komplement vermittelte Zytotoxizität
CDR	contemplementeraty-determing regions
СН	Konstante Domäne der schweren Kette
CL	Konstante Domäne der leichten Kette
CRISPR	Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DSMZ	Deutsche Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen
Fab	Fragment antigen binding
FACS	Flourecsens activated cell scanning
Fc	Fragment crystallizable
FCS	Fetal Calf Serum
GFP	Green Fluorecent Protein
h	Stunde
H2O	Wasser
hcAb	heavy chain Antibody
HEK	Human Embryonal Kidney
KO	Knock out
1	Liter
luc	Luciferase
mAb	Monoklonaler Antikörper
min	Minute/Minuten
MM	Multipley Myelom
NAD	Nicotinamidadenindinukleotid
Nb	Nanobody
Nb hcAb	humanisierter Schwerekettenantikörper
NK	Natürliche Killerzelle
PBS	Phosphat buffered Saline
PEI	Polyethylenimin
PI	Propidiumiodid
RNA	Ribonukleinsäure
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
scFv	single chain variable fragment
SDS-PAGE	sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis
VH	Variable Domäne der schweren Kette
VHH	Variable Domäne eines Schwerekettenantikörpers
VL	Variable Domäne der leichten Kette
Z:E Verhältnis	Ziel zu Effektor Verhältnis

7. Literaturverzeichnis

- Afonina IS, Cullen SP, Martin SJ (May 2010). "Cytotoxic and non-cytotoxic roles of the CTL/NK protease granzyme B". Immunological Reviews. 235 (1): 105–16. doi:10.1111/j.0105-2896.2010.00908.x. PMID 20536558
- An N, Hou YN, Zhang QX, Li T, Zhang QL, Fang C, Chen H, Lee HC, Zhao YJ, Du X.
 Anti-Multiple Myeloma Activity of Nanobody-Based Anti-CD38 Chimeric Antigen Receptor T Cells.Mol Pharm. 2018 Oct 1;15(10):4577-4588. doi: 10.1021/acs.molpharmaceut.8b00584. Epub 2018 Sep 21.
- Arai S, Meagher R, Swearingen M, Myint H, Rich E, Martinson J, et al. Infusion of the allogeneic cell line NK-92 in patients with advanced renal cell cancer or melanoma: a phase I trial. Cytotherapy (2008) 10:625– 32.10.1080/14653240802301872
- ATCC, NK-92 (ATCC[®] CRL-2407[™]) n. J. Online aufrufbar: http://www.lgcstandardsatcc.org/products/all/CRL-2407.aspx?geo_country=de
- Attal M, Harousseau JL, Stoppa AM, Sotto JJ, Fuzibet JG, Rossi JF et al. A prospective, randomized trial of autologous bone marrow transplantation and chemotherapy in multiple myeloma. Intergroupe Francais du Myelome. N Engl J Med 1996; 335 :91–97
- Bannas P, et al. Molecular imaging of tumors with nanobodies and antibodies: Timing and dosage are crucial factors for improved in vivo detection. Contrast Media Mol Imaging. 2015;10:367–378. doi: 10.1002/cmmi.1637.
- Bannas P, Hambach J, Koch-Nolte F (2017) Nanobodies and Nanobody-Based Human Heavy Chain Antibodies As Antitumor Therapeutics. Front Immunol 8:1603. doi: 10.3389/fimmu.2017.01603
- Bannas P und Koch-Nolte F. Perspectives for the Development of CD38-Specific Heavy Chain Antibodies as Therapeutics for Multiple Myeloma. Front Immunol. 2018; 9:

2559. Published online 2018 Nov 6. doi:[10.3389/fimmu.2018.02559]

- Bruhns P. Properties of mouse and human IgG receptors and their contribution to disease models. Blood 2012 119: 5640-5649 doi:10.1182/blood-2012-01-380121
- Bryceson YT, March ME, Ljunggren HG, Long EO. Synergy among receptors on resting NK cells for the activation of natural cytotoxicity and cytokine secretion. Blood (2006) 107:159–66.10.1182/blood-2005-04-1351
- Boussif O., Lezoualc'h,F., Zanta,M.A., Mergny,M.D., Scherman,D., Demeneix,B. and Behr,J.P. (1995) A versatile vector for gene and oligonucleotide transfer into cells in culture and in vivo: polyethylenimine. Proc. Natl Acad. Sci. USA, 92, 7297–7301
- Casneuf, T.; Xu, X.S.; Adams, H.C.; Axel, A.E.; Chiu, C.; Khan, I.; Ahmadi, T.; Yan, X.; Lonial, S.; Plesner, T.;et al. Effects of daratumumab on natural killer cells and impact on clinical outcomes in relapsed or refractorymultiple myeloma.Blood Adv.2017,1, 2105–2114.
- Casulo C. & Friedberg J. Treating Burkitt Lymphoma in Adults. Curr Hematol Malig Rep (2015) 10:266–271 DOI 10.1007/s11899-015-0263-4
- Chini EN, Chini CC, Kato I, Takasawa S, Okamoto H (February 2002). CD38 is the major enzyme responsible for synthesis of nicotinic acid-adenine dinucleotide phosphate in mammalian tissues. The Biochemical Journal. 362 (Pt 1): 125–30
- Chiu M L and Gary L Gilliland. Engineering antibody therapeutics. Structural Biology 2016,38 :163–173
- Clémenceau B, Congy-Jolivet N, Gallot G, Vivien R, Gaschet J, Thibault G, et al. Anti body- dependent cellular cytotoxicity (ADCC) is mediated by geneti- cally modified antigen-specific human T lymphocytes. Blood 2006; 107:4669-77; PMID:16514054; http:// dx.doi.org/10.1182/blood-2005-09-377

- Clémenceau B, Vivien R, Pellat C, Foss M, Thibault G, Vié H. The human natural killer cytotoxic cell line NK-92, once armed with a murine CD16 receptor, represents a convenient cellular tool for the screening of mouse mAbs according to their ADCC potential. MAbs. 2013 Jul-Aug;5(4):587-94. doi: 10.4161/mabs.25077. Epub 2013 May 29.
- Clémenceau B, Valsesia-Wittmann S, Jallas AC, Vivien R, Rousseau R, Marabelle A, Caux C, Vié H. In Vitro and In Vivo Comparison of Lymphocytes Transduced with a Human CD16 or with a Chimeric Antigen Receptor Reveals Potential Off-Target Interactions due to the IgG2 CH2-CH3 CAR-Spacer. J Immunol Res. 2015;2015:482089. doi: 10.1155/2015/482089. Epub 2015 Nov 17.
- Cook EM, Lindorfer MA, van der Horst H, Oostindie S, Beurskens FJ, Schuurman J, Zent CS, Burack R, Parren PW, Taylor RP. Antibodies That Efficiently Form Hexamers upon Antigen Binding Can Induce Complement-Dependent Cytotoxicity under Complement-Limiting Conditions. J Immunol. 2016 Sep 1;197(5):1762-75. doi: 10.4049/jimmunol.1600648. Epub 2016 Jul 29.
- Cong L., Ran F.A., Cox D., Lin S., Barretto R., Habib N., Hsu P.D., Wu X., Jiang W., Marraffini L.A., et al. Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems. Science. 2013;339:819–823. doi: 10.1126/science.1231143.
- de Haij S, J.H. Marco Jansen, Peter Boross, Frank J. Beurskens, Jantine E. Bakema, Desiree L. Bos, Anton Martens, J. Sjef Verbeek, Paul W.H.I. Parren, Jan G.J. van de Winkel and Jeanette H.W. Leusen. In vivo Cytotoxicity of Type I CD20 Antibodies Critically Depends on Fc Receptor ITAM Signaling. Cancer Res. 2010 Apr 15;70(8):3209-17. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-09-4109. Epub 2010 Mar 30.
- de Jong, R, Frank J. Beurskens, Sandra Verploegen, et al. A Novel Platform for the Potentiation of Therapeutic Antibodies Based on Antigen-Dependent Formation of IgG Hexamers at the Cell Surface PLoS Biol. 2016 Jan; 14(1): e1002344. doi: 10.1371/journal.pbio.1002344

- Dekkers G, Arthur E. H. Bentlage, Tamara C. Stegmann, Heather L. Howie, Suzanne Lissenberg-Thunnissen, James Zimring, Theo Rispens, Gestur Vidarsson Affinity of human IgG subclasses to mouse Fc gamma receptors. Mabs 2017, Vol 9, No. 5, 767-773, https://doi.org/10.1080/19420862.2017.1323159
- de Weers M, Tai YT, van der Veer MS, Bakker JM, Vink T, Jacobs DC, et al. Daratumumab, a novel therapeutic human CD38 monoclonal antibody, induces killing of multiple myeloma and other hematological tumors. J Immunol. (2011) 186:1840–8. 10.4049/jimmunol.1003032
- Deutsche Krebsgesellschaft, o. J., online aufrufbar: https://www.krebsgesellschaft.de/onko-internetportal/basis-informationen krebs/krebsarten/multiples-myelom-plasmozytom-morbus-kahler/therapie.html, [29.11.2018]
- Diebolder CA, Beurskens FJ, de Jong RN, Koning RI, Strumane K, Lindorfer MA,
 Voorhorst M, Ugurlar D, Rosati S, Heck AJ, van de Winkel JG, Wilson IA, Koster
 AJ, Taylor RP, Saphire EO, Burton DR, Schuurman J, Gros P, Parren PW:
 Complement is activated by IgG hexamers assembled at the cell surface. Science
 343: 1260–1263, 2014
- Durocher Y, Sylvie Perret, and Amine Kamen. High-level and high-throughput recombinant protein production by transient transfection of suspension-growing human 293-EBNA1 cells. Nucleic Acids Res. 2002 Jan 15; 30(2): e9
- Feller BE, Kellis JT, Cascão-Pereira LG, Knoll W, Robertson CR, Frank CW (2008) Fluores-cence quantification for surface plasmon excitation. Langmuir 24:12303– 12311. doi: 10.1021/la8013943
- Fujita T, Inoue T, Ogawa K, Iida K, Tamura N: The mechanism of action of decay accelerating factor (DAF). DAF inhibits the assembly of C3 convertases by dissociating C2a and Bb. J Exp Med 166: 1221–1228, 1987

- Fumey W, Koenigsdorf J, Kunick V, Menzel S, Schütze K, Unger M, Schriewer L, Haag F, Adam G, Oberle A, Binder M, Fliegert R, Guse A, Zhao YJ, Cheung Lee H, Malavasi F, Goldbaum F, van Hegelsom R, Stortelers C, Bannas P, Koch-Nolte F (2017) imaging of CD38(+) tumors in mouse models in vivo. Sci Rep 7:14289. doi: 10.1038/s41598-017-14112-6
- Gül N and Marjolein van Egmond. Antibody-Dependent Phagocytosis of Tumor Cells by Macrophages: A Potent Effector Mechanism of Monoclonal Antibody Therapy of Cancer. Cancer Research DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-15-1330 Published December 2015
- Hochuli E, Bannwarth W, Döbeli H, Gentz R, Stüber D (1988) Genetic Approach to Facilitate Purification of Recombinant Proteins with a Novel Metal Chelate Adsorbent. Nat Bio-technol 6:1321–1325. doi: 10.1038/nbt1188-1321
- Horenstein AL, Chillemi A, Quarona V, Zito A, Roato I, Morandi F, et al. NAD(+) Metabolizing ectoenzymes in remodeling tumor-host interactions: the human myeloma model. Cells (2015) 4:520–37. 10.3390/cells4030520
- Hsu PD ,Scott DA, Weinstein JA, Ran FA, Konermann S, Agarwala V, Li Y, Fine EJ, Wu
 X, Shalem O, Cradick TJ, Marraffini LA, Bao G, Zhang F. DNA targeting
 specificity of RNA-guided Cas9 nucleases. Nat Biotechnol. 2013 Sep;31(9):827-32.
 doi: 10.1038/nbt.2647. Epub 2013 Jul 21.
- Iezzi ME, Policastro L, Werbajh S, Podhajcer O, Canziani GA. Single-Domain Antibodies and the Promise of Modular Targeting in Cancer Imaging and Treatment.Front Immunol. 2018 Feb 19;9:273. doi: 10.3389/fimmu.2018.00273. eCollection 2018. Review.
- Jäger V, Konrad Büssow , Andreas Wagner, Susanne Weber, Michael Hust, André Frenzel and Thomas Schirrmann. High level transient production of recombinant antibodies and antibody fusion proteins in HEK293 cells. BMC Biotechnology 2013, 13:52

- Klingemann H, Laurent Boissel, Frances Toneguzzo. Natural Killer Cells for Immunotherapy – Advantages of the NK-92 Cell Line over Blood NK Cells Front Immunol. 2016; 7: 91. Published online 2016 Mar 14. doi: 10.3389/fimmu.2016.00091
- Koch-Nolte F, Reyelt J, Schössow B, Schwarz N, Scheuplein F, Rothenburg S, Haag F,
 Alzogaray V, Cauerhff A, Goldbaum FA (2007) Single domain antibodies from
 llama effectively and specifically block T cell ecto-ADP-ribosyltransferase ART2.2
 in vivo. FASEB J 21:3490–3498. doi: 10.1096/fj.07-8661com
- Königsdorf J (2016) Selektion, rekombinante Expression und molekulare Charakterisierung CD38-spezifischer Einzeldomänen-Antikörper. (Dissertation, Humanmedizin) Medizinische Fakultät der Universität Hamburg.
- Krejcik J, Casneuf T, Nijhof IS, et al. Daratumumab depletes CD38+ immune regulatory cells, promotes T-cell expansion, and skews T-cell repertoire in multiple myeloma. Blood . 2016;128(3):384-394.
- Kronvall G, Williams RC (1969) Differences in anti-protein A activity among IgG subgroups. The Journal of Immunology 103:828–833
- Kumar SK, Rajkumar V, Kyle RA, van Duin M, Sonneveld P, Mateos MV, Gay F, Anderson KC. Multiple myeloma. Nat Rev Dis Primers. 2017 Jul 20;3:17046. doi: 10.1038/nrdp.2017.46.
- Laemmli U.K.: Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. In: Nature. Bd. 227, 1970, S. 680–685, doi:10.1038/227680a0, PMID 5432063
- Lecoeur H (2002). "Nuclear apoptosis detection by flow cytometry: influence of endogenous endonucleases". Exp. Cell Res. **277** (1): 1–14. doi:10.1006/excr.2002.5537

- Li T, Qi S, Unger M, Hou YN, Deng QW, Liu J, et al. Immuno-targeting the multifunctional CD38 using nanobody. Sci Rep. (2016) 6:27055. doi: 10.1038/srep27055
- Lokhorst HM, Plesner T, Laubach JP, et al. Targeting CD38 with daratumumab mono therapy in multiple myeloma. N Engl J Med. 2015;373(13):1207-1219.
- Lonial S, Weiss BM, Usmani SZ, et al. Daratumumab monotherapy in patients with treatment-refractory multiple myeloma (SIRIUS): an open-label, randomised, phase 2 trial. Lancet. 2016;387(10027):1551-1560.
- Makou E, Herbert AP, Barlow PN: Functional anatomy of complement factor H. Biochemistry 52: 3949–3962, 2013
- Mali P., Yang L., Esvelt K.M., Aach J., Guell M., DiCarlo J.E., Norville J.E., Church G.M. RNA-guided human genome engineering via Cas9. Science. 2013;339:823–826. doi: 10.1126/science.1232033.
- Martin T, Baz R, Benson DM, Lendvai N, Wolf J, Munster P, et al. . A phase 1b study of isatuximab plus lenalidomide and dexamethasone for relapsed/refractory multiple myeloma. Blood (2017) 129:3294–303. 10.1182/blood-2016-09-740787
- Mateos MV, Cavo M, Blade J et al. Overall survival with daratumumab, bortezomib, melphalan, and prednisone in newly diagnosed multiple myeloma (ALCYONE): a randomised, open-label, phase 3 trial. Lancet. 2020 Jan 11;395(10218):132-141. doi: 10.1016/S0140-6736(19)32956-3. Epub 2019 Dec 10.
- Mathern DR, Heeger PS. Molecules Great and Small: The Complement System. Clin J Am Soc Nephrol. 2015;10(9):1636–1650.
- Milan Bier (1959). Electrophoresis. Theory, Methods and Applications (3rd ed.). Academic Press. p. 225. OCLC 1175404. LCC 59-7676.

- Mishima Y¹, Terui Y, Mishima Y, Kuniyoshi R, Matsusaka S, Mikuniya M, Kojima K, Hatake K. High reproducible ADCC analysis revealed a competitive relation between ADCC and CDC and differences between FcγRllla polymorphism. Int Immunol. 2012 Aug;24(8):477-83. doi: 10.1093/intimm/dxs048. Epub 2012 Mar 21.
- Mock U, Thiele R, Uhde A, Fehse B, Horn S. Efficient lentiviral transduction and transgene expression in primary human B cells. Hum Gene Ther Methods. 2012
 Dec;23(6):408-15. doi: 10.1089/hgtb.2012.160. PubMed PMID: 23240650.
- Mullis KB. Target amplification for DNA analysis by the polymerase chain reaction. Ann Biol Clin (Paris). 1990;48(8):579-82. PMID:2288446
- Muyldermans S. Nanobodies: natural single-domain antibodies. Annu Rev Biochem. 2013;82:775–797. doi: 10.1146/annurev-biochem-063011-092449.
- Myeloma Trialists' Collaborative Group. Combination chemotherapy versus melphalan plus prednisone as treatment for multiple myeloma: an overview of 6,633 patients from 27 randomized trials. J Clin Oncol 1998; 16: 3832–3842.
- Myelom Deutschland e.V, o. J., online aufrufbar: http://www.myelom-deutschland.de/dasmultiple-myelom/beschreibung-des-multiplen-myeloms/, [02.10.2017]
- Nakano A, Harada T, Morikawa S, Kato Y. Expression of leukocyte common antigen (CD45) on various human leukemia/lymphoma cell lines. Acta Pathol Jpn. 1990 Feb;40(2):107-15. PMID:2140233
- Niels W. C. J. van de Donk, Paul G. Richardson and Fabio Malavasi. CD38 antibodies in multiple myeloma: back to the future. Blood 2018 131:13-29; doi: https://doi.org/10.1182/blood-2017-06-740944
- Nijhof S, RWJ Groen, HM Lokhorst, B van Kessel, AC Bloem, J van Velzen, R de Jong Korlaar, H Yuan, WA Noort, SK Klein, ACM Martens, P Doshi, K Sasser, T Mutis and WCJ van de Donk. Upregulation of CD38 expression on multiple myelomacell s by all-trans retinoic acid improves the efficacy of daratumumab. Leukemia

- Nijhof I S, Tineke Casneuf, Jeroen van Velzen, Berris van Kessel, Amy E. Axel, Khaja Syed, Richard W. J. Groen, Mark van Duin, Pieter Sonneveld, Monique C. Minnema, Sonja Zweegman, Christopher Chiu, Andries C. Bloem, Tuna Mutis, Henk M. Lokhorst, A. Kate Sasser and Niels W. C. J. van de Donk. CD38 expression and complement inhibitors affect response and resistance to daratumumab therapy in myeloma. Blood 2016 128:959-970; doi: https://doi.org/10.1182/blood-2016-03-703439
- Nooka, A.K.; Joseph, N.S.; Kaufman, J.L.; Heffner, L.T.; Gupta, V.A.; Gleason, C.; Boise, L.H.; Lonial, S.Clinical efficacy of daratumumab, pomalidomide, and dexamethasone in patients with relapsed or refractorymyeloma: Utility of retreatment with daratumumab among refractory patients.Cancer2019,125, 2991– 3000.
- Overdijk MB, Jansen JH, Nederend M, et al. The therapeutic CD38 monoclonal antibody daratumumab induces programmed cell death via Fcg receptor-mediated cross-linking. J Immunol . 2016;197(3):807-813.
- Oberle A, Brandt A, Alawi M, Langebrake C, Janjetovic S, Wolschke C, **Schütze K**, Bannas P, Kröger N, Koch-Nolte F, Bokemeyer C, Binder M. Long-term CD38 saturation by daratumumab interferes with diagnostic myeloma cell detection. Haematologica. 2017 Sep;102(9):e368-e370. doi: 10.3324/haematol.2017.169235
- Picot J, Guerin CL, Le Van Kim C, Boulanger CM (March 2012). "Flow cytometry: retrospective, fundamentals and recent instrumentation". Cytotechnology. 64 (2): 109–30. doi:10.1007/s10616-011-9415-0. PMC 3279584. PMID 22271369.
- Rajan AM and Kumar S Review: New investigational drugs with single-agent activity in multiple myeloma. Blood Cancer Journal (2016) 6, e451; doi:10.1038/bcj.2016.53
- Ricklin D, Hajishengallis G, Yang K, Lambris JD: Complement: A key system for immune surveillance and homeostasis. Nat Immunol 11: 785–797, 2010

- Robert-Koch-Institut, Zentrum für Krebsdaten 2017, Übersicht über die wichtigsten epidemiologischen Maßzahlen für Deutschland, ICD-10 C90, online aufrufbar: https://www.krebsdaten.de/Krebs/DE/Content/Publikationen/Krebs_in_Deutschland /kid_2017/kid_2017_c90_multiples_myelom.pdf?__blob=publicationFile, [02.10.2017]
- Rogers LM, Veeramani S, Weiner GJ. Complement in monoclonal antibody therapy of cancer. Immunol Res. 2014 Aug;59(1-3):203-10. doi: 10.1007/s12026-014-8542-z.
- Roskoski R Jr (2014). "The ErbB/HER family of protein-tyrosine kinases and cancer". Pharmacol Res. **79**: 34–74. doi:10.1016/j.phrs.2013.11.002. PMID 24269963.
- Sander JD, Joung JK. CRISPR-Cas systems for editing, regulating and targeting genomes. Nat Biotechnol. 2014 Apr;32(4):347-55. doi: 10.1038/nbt.2842. Epub 2014 Mar 2. Review. PMID: 24584096
- Sanger F, Nicklen S, Coulson AR. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. Proc Natl Acad Sci U S A. 1977 Dec;74(12):5463-7.
- Schirrmann T. & Büssow K. in Antibody Engineering Vol. 2 (eds R. Kontermann & S. Dübel) 387-398 (Springer-Verlag, 2010).
- Schirrmann T, Al-Halabi L, Dübel S, Hust M. Production systems for recombinant antibodies. Front Biosci. 2008 May 1;13:4576-94.
- Schmitz K R, Atrish Bagchi, Rob C. Roovers, Paul M. P. van Bergen en Henegouwen, and Kathryn M. Ferguson 'Structural Evaluation of EGFR Inhibition Mechanisms for Nanobodies/VHH Domains Structure. 2013 Jul 2; 21(7): 1214–1224.
 Published online 2013 Jun 20. doi: [10.1016/j.str.2013.05.008]
- Skerra A, Plückthun A. Assembly of a functional immunoglobulin Fv fragment in Escherichia coli . Science. 1988;240(4855):1038–1041.

- Spriestersbach A, Kubicek J, Schäfer F, Block H, Maertens B. Purification of His-Tagged Proteins. Methods Enzymol. 2015;559:1-15. doi: 10.1016/bs.mie.2014.11.003. Epub 2015 May 4.
- Szabó Á, Szendi-Szatmári T, Ujlaky-Nagy L, Rádi I, Vereb G, Szöllősi J, Nagy P.The Effect of Fluorophore Conjugation on Antibody Affinity and the Photophysical Properties of Dyes. Biophys J. 2018 Feb 6;114(3):688-700. doi: 10.1016/j.bpj.2017.12.011.
- Tonn T, Schwabe D, Klingemann HG, Becker S, Esser R, Koehl U, et al. Treatment of atients with advanced cancer with the natural killer cell line NK-92. Cytotherapy 2013) 15:1563–70.10.1016/j.jcyt.2013.06.017
- van Acker H, Capsomidis A, Smits E and Van Tendeloo V. CD56 in the Immune System: More Than a Marker for Cytotoxicity? Front Immunol. 2017; 8: 892. doi: 10.3389/fimmu.2017.00892
- van de Donk NWCJ, Richardson PG, Malavasi F (2018) CD38 antibodies in multiple myeloma: Back to the future. Blood 131:13–29. doi: 10.1182/blood-2017-06-740944
- van Meerten T, van Rijn RS, Hol S, Hagenbeek A, Ebeling SB. Complement-induced cell death by rituximab depends on CD20 expression level and acts complementary to antibody-dependent cellular cytotoxicity. Clin Cancer Res. 2006 Jul 1;12(13):4027-35.
- Wang TH, Fang JY, Wu SJ, Liu YW ,Chan CW, Chuang SY, Chen CY. 2-O-Methylmagnolol Induces Apoptosis and Inhibits IL-6/STAT3 Signaling in Oral Squamous Cell Carcinoma.Cell Physiol Biochem. 2018;50(3):883-892. doi: 10.1159/000494474. Epub 2018 Oct 24.
- Wang W, Amy K. Erbe, Jacquelyn A. Hank, Zachary S. Morris, and Paul M. Sondel. NK Cell-Mediated Antibody-Dependent Cellular Cytotoxicity in Cancer Immunotherapy. Front Immunol. 2015; 6: 368. Published online 2015 Jul 27. doi: [10.3389/fimmu.2015.00368]

- Wang Y, Yang YJ, Wang Z, Liao J, Liu M, Zhong XR, Zheng H, Wang YP. CD55 and CD59 expression protects HER2-overexpressing breast cancer cells from trastuzumab-induced complement-dependent cytotoxicity. Oncol Lett. 2017 Sep;14(3):2961-2969. doi: 10.3892/ol.2017.6555.
- Weber B, Heitkam T, Holtgräwe D, Weisshaar B, Minoche A: Highly diverse chromoviruses of Beta vulgaris are classified by chromodomains and chromosomal integration. In: Mobile DNA. Band 4, Nr. 1, 1. März 2013, ISSN 1759-8753, S. 8, doi:10.1186/1759-8753-4-8
- Weber K, Bartsch U, Stocking C, Fehse B. A multicolor panel of novel lentiviral gene ontology (LeGO) vectors for functional gene analysis. Mol Ther 2008; 16 : 698– 706.
- Wesolowski J, Alzogaray V, Reyelt J, Unger M, Juarez K, Urrutia M, Cauerhff A, Danquah W, Rissiek B, Scheuplein F, Schwarz N, Adriouch S, Boyer O, Seman M, Licea A, Ser-reze DV, Goldbaum FA, Haag F, Koch-Nolte F (2009) Single domain antibodies: Promising experimental and therapeutic tools in infection and immunity. Med Microbiol Immu-nol 198:157–174. doi: 10.1007/s00430-009-0116-7
- Wilson T and Hastings J W. BIOLUMINESCENCE. Annual Review of Cell and Developmental Biology Vol. 14:197-230 ,1998 https://doi.org/10.1146/annurev.cellbio.14.1.197
- Yu Y, Li J, Zhu X, Tang X, Bao Y, Sun X, Huang Y, Tian F, Liu X, Yang L.Humanized CD7 nanobody-based immunotoxins exhibit promising anti-T-cell acute lymphoblastic leukemia potential.Int J Nanomedicine. 2017 Mar 13;12:1969-1983. doi: 10.2147/IJN.S127575. eCollection 2017.
- Zhou Q, Zhan H, Liao X, Fang L, Liu Y, Xie H, Yang K, Gao Q, Ding M ,Cai Z, Huang W, Liu Y .A revolutionary tool: CRISPR technology plays an important role in construction of intelligentized gene circuits.Cell Prolif. 2018 Dec 5:e12552. doi: 10.1111/cpr.12552

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt meiner Arbeitsgruppe, die mich tatkräftig unterstützt hat. Vielen Dank zunächst an Prof. Dr. Koch-Nolte und PD Dr. Bannas für die gute Betreuung mit vor allem wichtigem fachlichen Input und stets neuen Anregungen für meine Arbeit.

Ein riesiger Dank geht dann an Joanna Schmid und Birte Albrecht für die hervorragende Entlastung durch Teilung der Zellen und allen sonstigen Aufgaben, die ich immer wieder abverlangt habe. Durch eure Arbeit konnte ich mich ganz auf meine Versuche konzentrieren.

Und ein ganz herzlicher Dank geht an Levin Schriewer, William Fumey, Julia Hambach und Birte Albrecht für die stets lustige Zeit im Labor, mit vielen fachlichen und nicht so fachlichen Gesprächen, vielen lustigen Bildern und Videos und darauf, dass wir irgendwann doch nochmal unser Projekt tanzen werden.

Ein weiterer Dank geht schließlich an Dr. Kristoffer Riecken, der die lentiviralen Transduktionen für mich durchgeführt hat.

Ich danke außerdem meiner Familie, meinen Freunden und Martin, dass sie sich das schwierige Fachjargon stets angehört haben und Verständnis für lange Laboraufenthalte oder stundenlanges Schreiben aufgebracht haben.

Stark zu sein bedeutet nicht, nie zu fallen, sondern immer wieder

aufzustehen.

-Konfuzius -

9. Lebenslauf

Der Lebenslauf wurde aus datenschutzrechtlichen Gründen entfernt.

10. Eidesstattliche Erklärung

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

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

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

Die unter **2.2.3.2.** und **2.2.3.4.** beschriebenen Transduktionen, sowie die Produktion der Viren erfolgte durch Dr. Kristoffer Riecken aus der AG Fehse, Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf. Für die durchflusszytometrische Sortierung der Kulturen wie unter **2.2.3.3.** und **2.2.3.4.** beschrieben danke ich der FACS Core Facility des UKE. Die unter **3.2.5.** verwendeten Knochenmarkproben wurden von der AG Binder, Abt. Hämatologie-Onkologie, UKE, unter dem Einverständnis des Patienten bereitgestellt.

Unterschrift: