



Hochschule für Angewandte
Wissenschaften Hamburg
Hamburg University of Applied Sciences



Universitätsklinikum
Hamburg-Eppendorf

Hochschule für Angewandte Wissenschaften Hamburg
Fakultät Life Sciences
Department Biotechnologie

Bachelor Thesis

Etablierung eines Hochdurchsatzverfahrens zum zellbasierten Screening von Antikörper-Phagenbanken

Fabrice Viol

1961718

durchgeführt im

Forschungslabor der II. Medizinischen Klinik für Onkologie und
Hämatologie

AG Cancer Biology

Gutachter: Prof. Dr. phil. nat. Oliver Ullrich (HAW Hamburg)

Gutachter: PD Dr. med. Mascha Binder (UKE Hamburg)

Hamburg, 23.04.13

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Frau PD Dr. Mascha Binder der II. Medizinischen Klinik für und Onkologie und Hämatologie der Universitätsklinik Hamburg Eppendorf für die wissenschaftliche Betreuung der Arbeit, das mir entgegengebrachte Vertrauen und die ständige Bereitschaft zur Diskussion.

Herrn Prof. Dr. Oliver Ullrich möchte ich ausdrücklich für die Betreuung meiner Arbeit, das mir stets erbrachte Entgegenkommen und der überaus zuvorkommenden Kooperativität danken.

Friederike Braig (Msc) möchte ich für die sehr intensive Betreuung im Labor und für die zahlreichen freundschaftlichen und fachlichen Diskussionen danken.

Nicole Pritzlaff, Benjamin Thiele, Anita Jacholkowski und Fabian Hofmann danke ich für die kollegiale Unterstützung und Hilfsbereitschaft.

Meiner Familie danke ich für die emotionale Unterstützung während meines Studiums, dabei gilt ein besonderer Dank meinem Bruder Patrick, der die ein oder andere wissenschaftliche Arbeit mit mir diskutiert und korrigiert hat.

All meinen Freunden danke ich für die außerordentlich gute Freundschaft und das erbrachte Verständnis, dabei ist meine Freundin Nadine hervorzuheben, die mir in jeder Lebenssituation zur Seite steht.

Inhaltsverzeichnis

Danksagung	I
Inhaltsverzeichnis	II
Abkürzungsverzeichnis	V
1. Einleitung	1
1.1. Humane Immunantwort	1
1.2. Struktur und Funktion des Antikörpers	3
1.3. Antikörper-Entwicklung und Diversität	5
1.4. Phage-Display und Antikörper-Phagenbanken	6
1.5. Generierung von Antikörper-Phagenbanken	9
1.6. Zielsetzung der Arbeit	11
2. Material	14
2.1. Laborgeräte	14
2.2. Verbrauchsmaterialien	15
2.3. Chemikalien, Puffer und Lösungen	16
2.3.1. Chemikalien	16
2.3.2. Puffer und Lösungen für Agarosegele	17
2.3.3. Puffer und Lösungen für Phage-Display	17
2.3.4. Sonstige Chemikalien und Lösungen	18
2.4. Kit-Systeme	18
2.5. Zellbiologische Materialien	18
2.5.1. Zelllinien	18
2.5.2. Zellkultur-Medien	18
2.5.3. Zusätze für Zellkultur-Medien	19
2.6. Molekularbiologisches Material	19
2.6.1. Bakterienstämme	19
2.6.2. Bakteriophagen	19
2.6.3. Medien für Bakterienkulturen	20
2.6.4. Enzyme und Puffer	21
2.6.5. Primer	22
2.6.6. Plasmide	23
2.6.7. Oligonucleotide	23
2.6.8. Antikörper und Proteine	23

3. Methoden	24
3.1. Molekularbiologische Methoden	24
3.1.1. Restriktionsverdau	24
3.1.2. Dephosphorilieren von DNA-Fragmenten	25
3.1.3. Ligation von DNA-Fragmenten	25
3.1.4. Polymerase-Kettenreaktion	26
3.1.5. Agarosegelelektrophorese	27
3.1.6. Aufreinigung von DNA	27
3.1.7. Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren	28
3.2. Mikrobiologische Methoden	28
3.2.1. Kultivierung von <i>E. coli</i> Bakterien	28
3.2.2. Bestimmung der Zelldichte von <i>E. coli</i> Bakterien	28
3.2.3. Herstellen von elektrokompetenten Bakterien	29
3.2.4. Transformation von Bakterien mittels Elektroporation	29
3.3. Zellbiologische Methoden	30
3.3.1. Zellen auftauen	30
3.3.2. Stammerhaltung	30
3.3.3. Passagieren von Zellen	30
3.3.4. Bestimmung der Zellzahlen	30
3.4. Phage-Display Methoden	31
3.4.1. Aufreinigung der Antikörper-Phagen über PEG/NaCl-Fällung	31
3.4.2. Helferphagen Präparation	31
3.4.3. Titration des Helferphagen	32
3.4.4. Präparation der Antikörper-Phagenbank	32
3.4.5. Titration der Antikörper-Phagenbank	32
3.5. Etablierung eines zellbasierten Selektionssystems	33
3.5.1. BRASIL-Verfahren	33
3.5.2. Amplifikation der Antikörper-Phagen	34
3.5.3. Titration der selektierten Antikörper-Phagen	34
3.5.4. Bindungsassay gepickter Phageneinzelklone	34
3.6. Etablierung eines Hochdurchsatz-Screenings zellselektiv bindender Phageneinzelklone	34
3.6.1. Hochdurchsatz-Amplifikation gepickter Phageneinzelklone	34
3.6.2. Evaluierung des zellbasierten Fluoreszenz-ELISA	36
3.6.3. Bindungsassay der Einzelklone mittels Fluoreszenz-ELISA	36
4. Ergebnisse	37
4.1. Generierung Antikörper-Phagenbank	37
4.2. Etablierung eines zellbasierten Selektionssystems	40
4.2.1. Anreicherung selektierter Antikörper-Phagen an Myelomzellen	40

4.2.2. Bindungsassay gepickter Antikörper-Phageneinzelklone	41
4.3. Etablierung eines Hochdurchsatz-Screenings zellselektiv bin-	
dender Phageneinzelklone	43
4.3.1. Phagentiter nach der Hochdurchsatz-Amplifikation	43
4.3.2. Evaluierung des zellbasierten Fluoreszenz-ELISA	44
4.3.3. Bindungsassay der Einzelklone mittels Fluoreszenz-ELISA . . .	45
5. Diskussion	46
5.1. Generierung Antikörper-Phagenbank	46
5.2. Etablierung eines zellbasierten Selektionssystems	47
5.3. Etablierung eines Hochdurchsatz-Screenings zellselektiv bin-	
dender Phageneinzelklone	49
6. Zusammenfassung	51
Literaturverzeichnis	52
Abbildungsverzeichnis	58
Tabellenverzeichnis	58
A. Anhang	i
A.1. Restriktionsverdau der zweiten Klonierung pFB-Fab + HC	
IgG und LC κ	i
A.2. Übersicht der Antikörper-Phagentiter	ii
A.2.1. Phageninput, Phagenoutput und Titer in den Selektionsrunden	ii
A.2.2. Titer und Phagenoutput der Antikörper-Phageneinzelklone . .	iii
A.3. Eidesstattliche Erklärung	iv
A.4. Sequenz des Vektors pFB-Fab	v

Abkürzungsverzeichnis

Ω	Ohm, elektrischer Widerstand
μF	Mikrofarad, elektrische Kapazität
μg	Mikrogramm
μl	Mikroliter
μM	Mikromol/Liter
2x YT	Doppelt konzentriertes Bakterienvollmedium
Amp	Ampicillin
ADCC	Antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity
ATP	Adenosintriphosphat
bp	Basenpaare
BSA	Bovine Serum Albumin
c	Konzentration
CDC	Complement-Dependent Cytotoxicity
CDR	Complementarity Determining Region
CH1	1. konstante Domäne der schweren Kette
CL	Konstante Domäne der leichten Kette
DMEM	Dulbeccos Modified Eagle Medium
ddH ₂ O	Double Distilled water
DNA	Desoxyribonucleic acid
E	Extinktion
E.coli	Escherichia coli
ELISA	Enzyme Linked Immunosorbent Assay
Fab	Fragment antigen binding
Fc	Fragment cristalline
FCS	Fetal Calf Serum
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
G C T A	Guanin, Cytosin, Thymin, Adenin
h	Stunde
HAW	Hochschule für Angewandte Wissenschaften
HC IgG	Heavy Chain Immunglobulin G
IgG	Immunglobulin G
kb	Kilobasen
kDa	Kilo Dalton
l	Liter
LB	Luria-Bertani
LC κ	Light Chain kappa
M	Mol/Liter

mg	Milligramm
min	Minute
ml	Milliliter
mM	Millimol/Liter
N	Normalität, Äquivalenzkonzentration
ng	Nanogramm
OD	Optische Dichte
ORI	Replikationsursprung
PBS	Phosphate Buffered Saline
PBST	Phosphate Buffered Saline with Tween 20
PBMC	Peripheral Blood Mononuclear Cell
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
RT	Raumtemperatur
RNA	Ribonucleic acid
RPMI	Roswell Park Memorial Institute, Zellkultur-Medium
rpm	Rounds per Minutes
sek	Sekunde
SOB	Super Optimal Broth
ssDNA	single stranded Desoxyribonucleic acid
TAE	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
TBS	Tris Buffered Saline
U	Units, Enzymeinheiten
UKE	Universitätsklinikum Hamburg Eppendorf
UV	Ultraviolett
VH	Variable Domäne der schweren Kette
VL	Variable Domäne der leichten Kette
V	Volt

1. Einleitung

Die vorliegende Arbeit ist im Rahmen der Erforschung von tumorassoziierten Antigenen des Multiplen Myeloms und der Gewinnung von potentiellen therapeutischen Antikörpern entstanden. Die Identifizierung der Epitope tumorassoziierter Antigene oder die Isolierung therapeutischer Antikörper können die Grundlage für eine zielgerichtete Therapiestrategie bilden. Das Multiple Myelom ist eine häufige, maligne in aller Regel unheilbare Erkrankung des Knochenmarks (Suzuki, 2013). Das Multiple Myelom, auch Plasmazytom genannt, wird durch eine Akkumulation von Antikörper-produzierenden Plasmazellen im Knochenmark charakterisiert (Manier *et al.*, 2012). Diese Plasmazellen vermögen jedoch nur noch monoklonale Antikörper oder Bruchstücke, sogenannte Paraproteine, zu produzieren (Trepel *et al.*, 2012, Bladé *et al.*, 1998). Um das Multiple Myelom und vergleichbare bösartige Krankheiten erfolgreich therapieren zu können, ist neben der Entwicklung neuer Therapiestrategien auch der technische Fortschritt in der Forschung von großer Bedeutung. Technischer Fortschritt stellt eine Grundlage sowohl für die Entwicklung als auch für den Erfolg neuer Therapiestrategien dar. Diese Bachelor Thesis ist fokussiert auf die technische Etablierung einer Möglichkeit, auf Grundlage des Phage-Display, Antikörper-Phagenbanken, die das Antikörperrepertoire von Myelompatienten darstellen, im Hochdurchsatz screenen zu können.

1.1. Humane Immunantwort

Das humane Immunsystem bildet ein komplexes Netzwerk aus verschiedenen Organen, Zelltypen und Molekülen als Abwehrsystem gegen körperfremde Eindringlinge. Man differenziert dabei das unspezifische Immunsystem, die sogenannte angeborene Immunantwort, von dem adaptiven Immunsystem, der erworbenen Immunantwort. Ferner wird zwischen zellulärer und humoraler Immunantwort unterschieden (Janeway und Travers, 2008). Die zellvermittelte Immunität bezieht sich auf Zellen, die in den Blutgefäßen, den Lymphbahnen sowie im Gewebe vorkommen. Wichtige Vertreter der zellulären Immunantwort sind zum Beispiel neutrophile Granulozyten, natürliche Killerzellen, dendritische Zellen oder T-Lymphozyten, die alle entweder über Phagozytose den Erreger selbst vernichten oder durch die Produktion von Zytokinen und anderen Botenstoffen die Immunreaktion des Organismus steuern und andere Abwehrzellen zum Ort der Entzündung locken. Die humorale Immunantwort bezieht sich auf unterschiedliche Plasmaproteinen, die ebenfalls in unserem Blut und Lymphsystem zirkulieren. Zu ihnen zählen Interleukine, die als körpereigene Botenstoffe von den Zellen des Immunsystems gebildet werden, das Komplementsystem bestehend aus über 20 Plasmaproteinen, die Membranangriffskomplexe bilden können. Die wichtigste Funktion des humoralen Immunsystems jedoch haben die

Antikörper inne, die die Pathogene spezifisch binden und für das Immunsystem erkennbar machen (Abbas, 2005). Die Immunantwort unterteilt sich in vier Hauptaufgaben, deren erste die immunologische Erkennung bildet. Eine Infektion muss erkannt werden: Dafür ist die zellvermittelte Immunantwort, aber auch die humorale Immunabwehr, verantwortlich. Die Immuneffektorfunktion übernimmt die Aufgabe, die Infektion einzudämmen und wenn möglich vollständig zu eliminieren. Die dritte Aufgabe ist die Fähigkeit des Immunsystems, sich selbst zu regulieren. Versagt diese Funktion, kann es zu Allergien und Autoimmunkrankheiten kommen. Ein weiteres einzigartiges Merkmal des adaptiven Immunsystems besteht in der Entwicklung eines immunologischen Gedächtnisses. Mit dieser Eigenschaft ist es in der Lage, einen Mensch vor einem erneuten Auftreten der Krankheit zu schützen, wenn dieser zuvor mit diesem Krankheitserreger in Kontakt gekommen ist. Kommt es zur erneuten Infektion, zeigt der immunisierte Mensch eine sofortige und stärkere Reaktion auf diesen Erreger (Janeway und Travers, 2008).

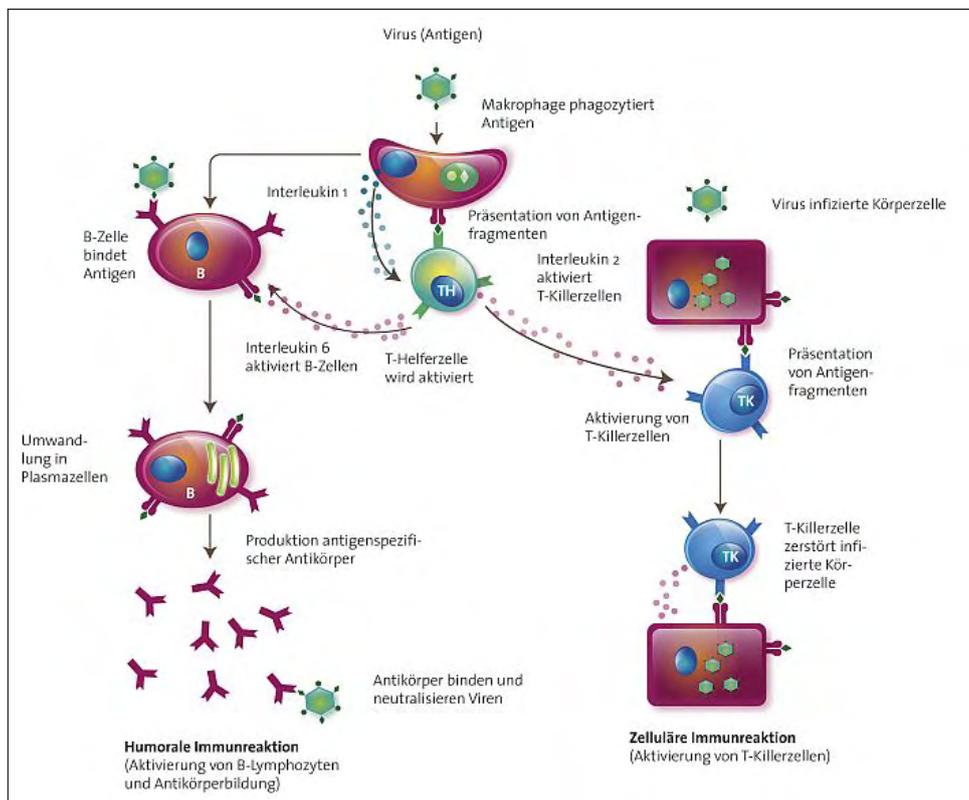


Abbildung 1: Schematische Übersicht der humanen Immunantwort: Dringt ein Antigen (hier: grün) in den Organismus ein, wird er zunächst von antigenpräsentierenden Zellen wie den Makrophagen phagozytiert und Peptidbruchstücke des Antigen werden auf der Oberfläche der Zellen präsentiert. Bindet eine T-Helfer-Zelle nun an diesen Rezeptor, wird diese aktiviert und schüttet Interleukine als Botenstoffe aus. Die Interleukine sind ihrerseits in der Lage die humorale sowie die zelluläre Immunantwort zu stimulieren. Wird eine B-Zelle entweder durch Interleukine oder durch die Bindung eines Antigen auf ihrer Oberfläche aktiviert, differenziert sich diese in eine Antikörper-produzierende Plasmazelle. Die Antikörper binden und neutralisieren dann jene Antigene (humorale Immunreaktion). Infiziert ein Antigen eine Körperzelle, so können ebenfalls Peptidbruchstücke des Antigen auf der Oberfläche präsentiert werden. T-Zellen können durch die Bindung an diesen präsentierten Peptiden oder durch die Stimulation von Interleukinen zu T-Killerzellen aktiviert werden und jene infizierte Körperzelle zerstören (zelluläre Immunreaktion). Bild: (Renner, 2012)

1.2. Struktur und Funktion des Antikörpers

Antikörper, auch Immunglobuline genannt, sind Proteine aus der Klasse der Globuline, die in Wirbeltieren als Reaktion auf Antigene gebildet werden. Sie sind die sezernierte

Form der B-Zell-Antigen-Rezeptoren. Da die Immunglobuline in großen Mengen sezerniert werden und löslich sind, lassen sie sich gut isolieren und untersuchen. Antikörper haben in etwa die Form eines „Y“ und bestehen aus drei gleich großen Abschnitten, die durch flexible Disulfidbrücken lose miteinander verbunden sind. IgG-Antikörper sind große Moleküle mit einer relativen Molekülmasse von 150 kDa und sind gleichermaßen aus vier gepaarten schweren und leichten Polypeptidketten aufgebaut. Diejenige Kette mit annähernd 50 kDa bezeichnet man als schwere oder H-Kette, die andere mit 25 kDa als leichte oder L-Kette (Janeway und Travers, 2008).

Die beiden schweren Ketten sind durch Disulfidbrücken miteinander verbunden und jede schwere mit einer leichten. Jedes Antikörpermolekül besitzt zwei identisch schwere und leichte Ketten, somit also zwei Antigenbindungsstellen mit der es gleichzeitig zwei gleiche Strukturen binden. Es gibt fünf Hauptklassen von schweren Ketten oder Isotypen. Sie bestimmen die funktionelle Aktivität eines Antikörpermoleküls. Die wichtigsten Klassen sind: IgM, IgD, IgG, IgA und IgE. IgG kommt am häufigsten vor. Aus diesem Grund wird die Funktion und der weitere Aufbau an dieser Klasse deutlich gemacht. Wie erwähnt, ähnelt die Form eines Antikörpers der eines „Y“. Die Schen-

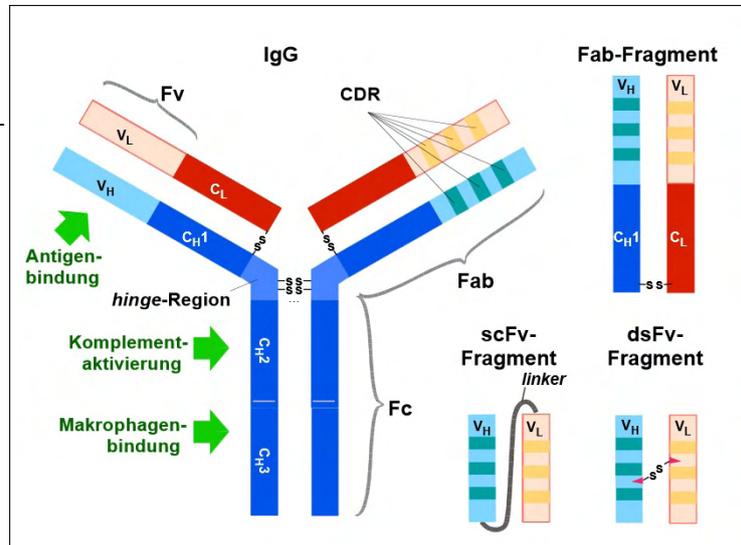


Abbildung 2: Schematische Übersicht eines IgG-Antikörpers und anderer Antikörperformate: IgG-Antikörper: Dargestellt ist ein IgG-Antikörper mit seinen funktionellen Domänen. Die schwere Kette (hier: blau) bestehend aus der CH1, CH2 und CH3 Domäne ist 50 kDa groß und übernimmt Immuneffektorfunktionen, durch die Aktivierung des Komplements oder durch die Bindung der Makrophagen. Diese Regionen, einschließlich der ersten konstanten Domäne der leichten Kette (hier: rot), sind weitestgehend konstant und variieren nur unter den verschiedenen Hauptklassen. Die leichte Kette (hier: rot und hellrot) ist 25 kDa groß und besteht aus der CL und VL Domäne. Die variablen Domänen der schweren sowie der leichten Kette binden das Epitop des Antigens und besitzen durch die CDR's eine ausgesprochen hohe Variabilität. In der *hinge*-Region werden die Ketten durch Disulfidbrücken miteinander verbunden. **Fab-Fragment:** Besteht aus der ersten konstanten Domäne der schweren und der leichten Kette und den variablen Domänen beider Ketten. Sie sind in der konstanten Region über Disulfidbrücken miteinander verbunden. **scFv-Fragment:** Das scFv-Fragment besteht aus den variablen Domänen deren schweren Kette VH und leichten Kette VL über einen Peptidlinker miteinander verbunden sind. **dsFv-Fragment:** Disulfidbrücken-stabilisierte Fv-Fragmente werden durch Disulfidbrücken zusammengehalten, die durch eine eingefügte Mutation hervorgerufen werden können. Bild: (Schmiedl und Dübel, 2004)

kel des „Y“ enden in der variablen Region, die bei den unterschiedlichen Molekülen stark variieren. Dieser Bereich bindet das Epitop des Antigens. Die ausgesprochene Variabilität der Antigenbindungsstelle bezeichnet man auch als CDR (Complementarity Determining Region) (Taussig, 1988). Das Bein des „Y“, die konstante Region und stark invariabel ist, interagiert mit den Effektorzellen des Immunsystems, wie den Makrophagen, der natürlichen Killer-Zellen oder dem Komplementsystem (Edelman *et al.*, 1968). Wird das Molekül mit Hilfe proteolytischer Enzyme, wie Papain oder Pepsin, gespalten, die an bestimmten Polypeptidsequenzen schneiden, kann ermittelt werden, welcher Bereich für welche Funktion verantwortlich ist. Fc (fragment cristalline) ist der Abschnitt unterhalb der *hinge*-Region, Fab (Fragment antigen binding) ist der Arm inklusive konstanter und variabler Region und Fv (Fragment variable) sind die ersten 126 Aminosäuren der variablen Proteindomäne (Duebel, 2007). Die sezernierten Antikörper wirken auf unterschiedliche Weise. Die Neutralisation ist dabei der einfachste Mechanismus. Der Antikörper bindet das Antigen, zum Beispiel ein bakterielles Toxin, welches an Zellen mit Toxinrezeptoren in Wechselwirkung tritt. Durch die Neutralisation des Antigens, kann das Toxin seine toxische Wirkung nicht mehr entfalten. Im Anschluss folgt die Aufnahme des Antigen-Antikörper-Komplexes über Phagozytose durch Makrophagen. Eine weitere Möglichkeit besteht darin, ein Antigen zu opsonieren. Dabei binden Antikörper die Antigene auf der Oberfläche von Krankheitserregern oder Fremdpartikel und markieren sie. Der konstante Bereich des Antikörpers wird durch Makrophagen erkannt und der gesamte Komplex wird verdaut (Schmiedl und Dübel, 2004). Weitere Funktionen sind die ADCC (Antibody-Dependent Cell-Mediated Cytotoxicity) und die CDC (Complement-Dependent Cytotoxicity). Die ADCC ist die Reaktion von Nk-Zellen und Makrophagen mit antikörperbeladenen Ziel-Zellen; CDC ist die Aktivierung des Komplementsystems, eine Proteinkaskade aus ungefähr 20 Proteinen, die Membranangriffskomplexe bilden und somit eine Zellyse bewirken (Janeway und Travers, 2008). Antikörper birgen somit durch ihre Eigenschaft der spezifischen Affinität ein enormes Potenzial als Therapeutikum.

1.3. Antikörper-Entwicklung und Diversität

Die Hauptaufgabe der Antikörper innerhalb einer Immunreaktion besteht darin, Antigene spezifisch zu binden und auf unterschiedliche Art und Weise für das Immunsystem kenntlich zu machen (Janeway und Travers, 2008, Abbas, 2005).

Da der menschl-

che Organismus

von einer Vielzahl

an Antigenen wie

Bakterien, Viren,

Pilzen, Toxinen und

anderen Fremdstof-

fen befallen wer-

den kann, muss ein

riesiges Arsenal an

Antikörpern mit

höchster Variabili-

tät bereitgestellt

werden. Der menschl-

liche Organismus ist

in der Lage, mehr

als 10^8 unterschied-

liche Antikörpermoleküle zu sekretieren und muss dabei die Information aller Moleküle nicht als Gen in der DNA abspeichern (Schmiedl und Dübel, 2004). Die

ausgesprochen hohe Variabilität der Antikörper kommt durch einfache Prinzipien

der Kombinatorik zustande. Eine geringe Anzahl an Genfragmenten in der B-Zelle

werden untereinander per Zufallsprinzip zusammengefügt. Man bezeichnet dieses

Prinzip als somatische Rekombination oder V(D)J-Rekombination (Briney und Jr,

2013). Es handelt sich um eine Rekombination, bei der die unterschiedlichen DNA-

Abschnitte der Gene für die leichten und schweren Ketten der Antikörper zufällig

miteinander kombiniert werden (Janeway und Travers, 2008). Darüber hinaus kann

die Diversität durch Einfügen von Mutation in die reife B-Zelle, zusätzlich gesteigert

werden. Dieser Prozess wird als somatische Hypermutation bezeichnet. Beide

Mechanismen erlauben in kurzer Zeit eine effiziente humorale Immunantwort durch

die Bereitstellung eines äußerst variablen Antikörperrepertoires. Die variable Regi-

on der schweren sowie der leichten Kette eines Immunglobulins wird von mehreren

Gensegmenten codiert. Die leichte Kette eines Antikörpers wird von zwei unter-

schiedlichen Gensegmenten codiert. Die ersten 95 bis 101 Aminosäuren werden von

den größeren sogenannten V-Gen-Segmenten codiert. Das wesentlich kleinere Joining

oder J-Gen-Segment codiert 13 Aminosäuren. Für die variable Domäne der schwe-

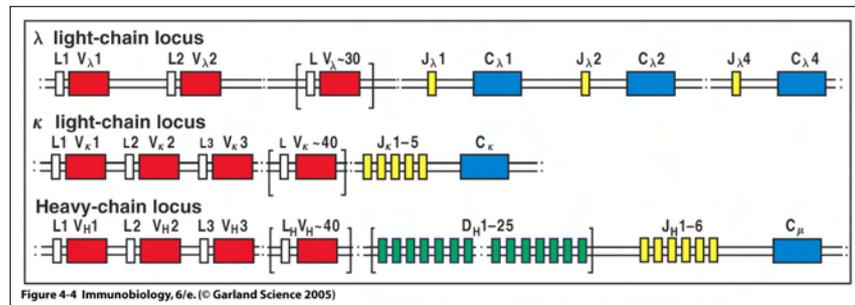


Abbildung 3: Schematisch dargestellter Genlokus der schweren Kette und der leichten Kette κ und λ : Der genetische Lokus der leichten Kette λ besteht aus 29 bis 33 funktionalen V-Gen-Segmenten und vier bis fünf Paaren an funktionalen J-Gen-Segmenten und C-Gensegmenten. Dieser Genlokus ist auf dem Chromosom 22 abgelegt. Der genetische Lokus für die leichte Kette κ besteht aus ca. 38 funktionalen V-Gen-Segmenten, fünf J-Gen-Segmenten, einem C-Gen und ist auf Chromosom 2 abgelegt. Der Genlokus der schweren Kette besitzt ca. 40 funktionale VH-Gen-Segmente. Zusätzlich besteht die schwere Kette aus ca. 23 DH-Gen-Segmenten, die zwischen sechs JH-Gen-Segmenten und der VH-Gene liegen. Darüber hinaus besteht die schwere Kette aus CH-Gen-Segmenten. Die gezeigte Abbildung ist vereinfacht dargestellt und die Längen sind nicht untereinander vergleichbar. Der genetische Lokus der schweren Kette ist über 2 Millionen bp lang, wobei die D-Gen-Segmente nur 6 bp lang ist. Bild: (Janeway und Travers, 2008)

ren Kette gibt es ein zusätzliches Gen-Segment; das D-Gen-Segment (Taussig, 1988, Tonegawa *et al.*, 1978). Eine Möglichkeit diese auf natürliche Weise entstehende Diversität technisch zu realisieren und nutzen zu können, bietet die Phage-Display-Technologie unter Zuhilfenahme der Polymerase-Kettenreaktion.

1.4. Phage-Display und Antikörper-Phagenbanken

Eine moderne Methode, Antikörper schnell und mit einer hohen spezifischen Affinität zu produzieren, stellt das Phage-Display dar. Diese Methode nutzt Bibliotheken an filamentösen Phagen, die eine außerordentliche Diversität an unterschiedlichen Proteinen oder Peptiden auf ihrer Oberfläche exprimieren (Huse *et al.*, 1989, McCafferty *et al.*, 1990). Diese Proteine oder Peptide werden von der ssDNA, dem sogenannten Phagemid innerhalb des Phagens codiert. (Breitling *et al.*, 1991).

Dabei wird eine oder mehrere beliebige DNA-Sequenzen an die DNA-Sequenz des „Coating-Proteins“ in einem Phagemid ligiert, sodass die aus der Sequenz hervorkommenden Proteine oder Peptide N-terminal als Fusionsprotein auf der Oberfläche der Phagen präsentiert werden. Dieses Prinzip ermöglicht durch die Expression der

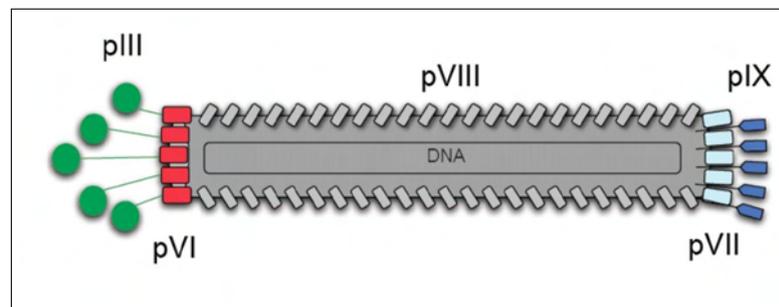


Abbildung 4: Schematische Übersicht des M13-Phagen: Die DNA des filamentösen Bakteriophagen M13 ist von einer röhrenförmigen Proteinhülle umgeben, die sich aus ca. 2.700 helical angeordneten identischen Untereinheiten des Hauptproteins pVIII (grau) zusammensetzt. Die Proteine pVII (hellblau) und pIX (blau) sind an einem Ende lokalisiert und dienen der Replikation. Die am anderen Ende lokalisierten Proteine pIII (grün) und pVI (rot) sind die Coat-Proteine und dienen als Fusionsprotein. Die Gesamtgröße beträgt ca. 6 nm Durchmesser und 860 nm Länge. Bild (Hess *et al.*, 2012)

Proteine und Peptide auf der Oberfläche eine direkte Verbindung zwischen Genotyp und Phänotyp des Phagen (Smith, 1985, Sidhu, 2000). Die Verwendung von Phagen für Protein- oder Antikörperbibliotheken hat einige Vorteile. Die Phagen können gram-negative Bakterien wie *E.coli* infizieren. Die Infektion ist äußerst effizient und die Vermehrung der Phagen innerhalb der Zelle verläuft sehr schnell. Für die Generierung von Phagenbibliotheken wird häufig der filamentöse M13-Phage verwendet. Dieser ist gut charakterisiert (Haq *et al.*, 2012) und eignet sich für die Präsentation von Proteinen und Peptiden. Für die Infektion der Bakterien benötigen die M13-Phagen das F-Plasmid (Fertilitätsplasmid), deshalb werden sie auch als Fφ-Phagen bezeichnet. Das Phagen genom codiert für 11 Proteine, welche für die DNA-Replikation, die Bindung an die einzelsträngige DNA und das Zusammenbauen des Phagen zuständig sind oder die Hüllproteine selbst repräsentieren. Infiziert ein M13-Phage nun ein gram-negatives Bakterium, bindet dieser an den F-Pilus auf der

Oberfläche der Bakterien. Der F-Pilus ist eine vom F-Plasmid codierte fadenförmige Ausstülpung, die für den Austausch von DNA unter den Bakterien (bzw. für den Zell-Zell-Kontakt) notwendig ist. Der Phage wird durch den Abbau des Pilus zur Bakterienmembran gebracht (Maneewannakul *et al.*, 1993), die Phagenhüllproteine in diese integriert und die DNA des Phagen in das Cytoplasma injiziert. Aus der ssDNA wird mit Hilfe bakterieller Enzyme ein Doppelstrang, wonach durch Replikation die Phagenproduktion innerhalb der Zelle beginnt.

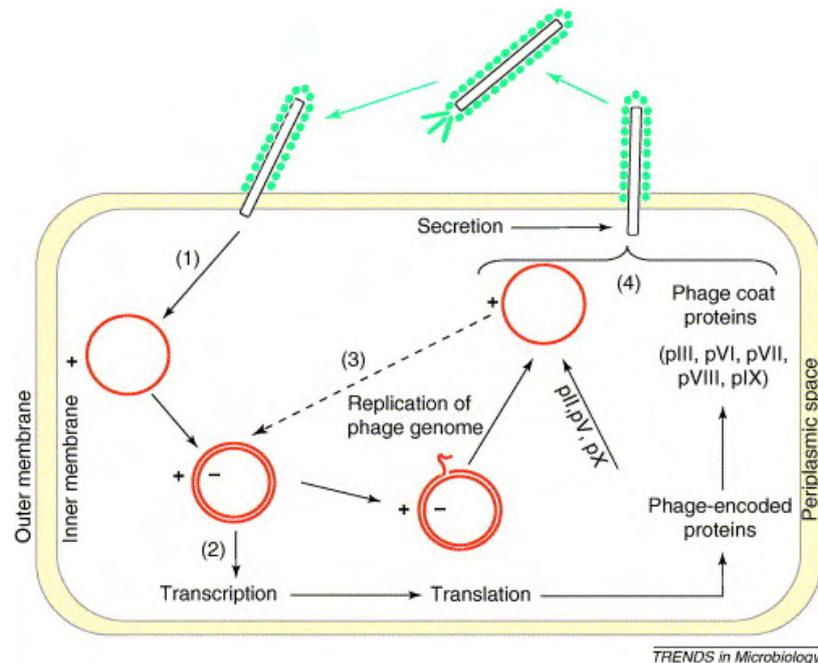


Abbildung 5: Skizzierte Übersicht des Lebenszyklus eines M13-Phagen: 1) Der M13-Phage bindet an der Oberfläche (F-Pilus) der Bakterienzelle und injiziert seine ssDNA (+ Strang) in das Cytoplasma. Diese wird mit bakteriellen Enzymen zu einem Doppelstrang (+ Strang und - Strang) synthetisiert. 2) Es folgt die Transkription und Translation der Phagenhüllproteine pIII, pVI, pVII, pVIII und pIX. 3) Mit den gebildeten Phagenproteinen pII, pV und pX ist die erneute Synthese einer ssDNA (+ Strang) möglich, die entweder zu Beginn mit der injizierten ssDNA erneut einen Doppelstrang bilden kann oder in 4) mit den synthetisierten Phagenproteinen zu neuen Phagen verpackt werden. Diese werden über Sekretion aus Bakterienzelle geschleust und können wiederum an andere Bakterienzellen infizieren

Die Hüllproteine des Phagens, die durch die bakterielle Translation gebildet werden, werden in die Bakterienmembran eingebaut und mit der viralen DNA zu neuen Phagen „verpackt“ (Tikunova und Morozova, 2009). Dieser Mechanismus ermöglicht eine Vielzahl von Anwendungen. Werden randomisierte Peptidphagen-Banken verwendet, können Zellrezeptoren oder Epitope von Antikörpern näher untersucht werden. Aber auch die Interaktionen zwischen Substrat und Protein können durch Entschlüsselung von Bindungsstellen charakterisiert werden. Verwendet man Phagenbanken, die ganze Proteine oder Antikörper präsentieren, ermöglicht dies eine effiziente Methode, spezifische Antikörper oder Proteine zu isolieren. Mit Hilfe von Antikörper-Phagenbanken können im Gegensatz zur Hybridomtechnologie (Koehler und Milstein, 1975), voll humanisierte Antikörper gewonnen werden. In der Hybri-

domtechnologie ist es für eine therapeutische Anwendung notwendig, die murinen monoklonalen Antikörpern zu humanisieren. Je nach Ausgangsmaterial unterscheidet man zwischen naiven und immunisierten Antikörperbibliotheken. Naive Antikörperbibliotheken entstammen aus dem B-Zell-Antikörperrepertoire von gesunden Spendern, immunisierte Antikörperbibliotheken werden aus den B-Zellen von Patienten gewonnen, die bereits mit einem Antigen in Kontakt gekommen waren. Diese Anwendung spielt unter anderem während der Isolierung von therapeutischen Antikörpern in der Onkologie oder Hämatologie eine Rolle. Für eine Isolierung dieser Art wird zunächst eine Antikörper-Phagenbank kloniert, dabei können Fv, scFv, dsFv oder Fab-Fragmente auf der Oberfläche von Phagen exprimiert werden (Tikunova und Morozova, 2009). Diese Antikörper-Phagen werden mit dem Target inkubiert und alle nicht gebundenen Phagen über mehrere Waschschrte entfernt. Im nächsten Schritt werden alle spezifischen Phagen vom Target eluiert: Mit ihnen können wiederum Bakterien für die Amplifikation infiziert werden. Dieser Zyklus wird drei bis fünf mal wiederholt um eine targetspezifische Anreicherung zu erreichen.

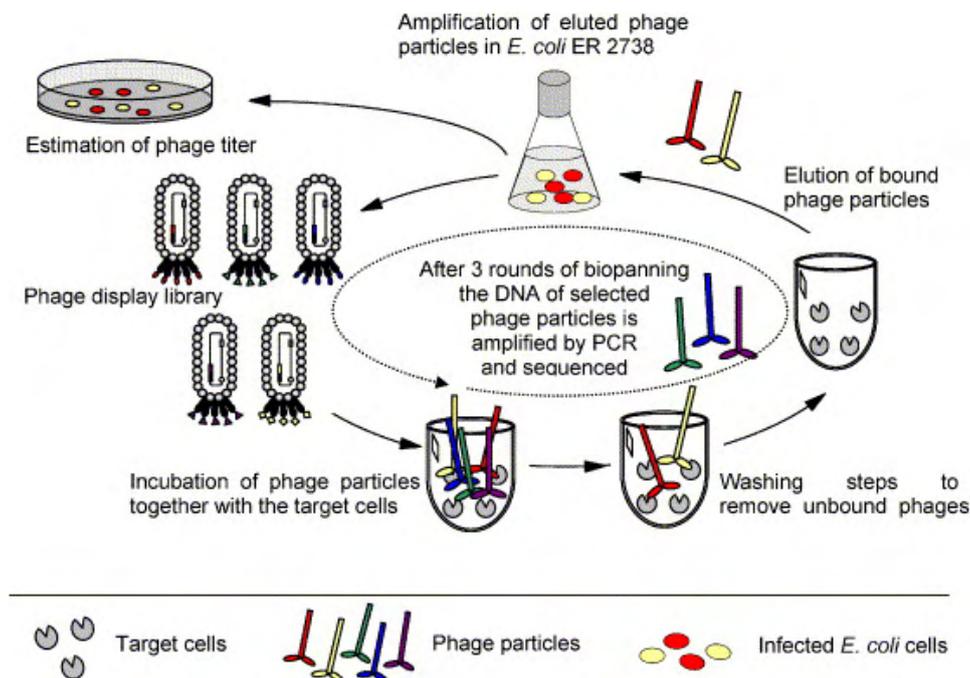


Abbildung 6: Schema eines Phage-Display Selektionsprozesses: Präparierte Antikörper-Phagen werden zusammen mit Target-Zellen inkubiert und über mehrere Waschschrte werden nicht gebundene Phagen entfernt. Werden die Phagen von den Targets eluiert, können mit ihnen wieder Bakterien infiziert werden. Durch Ausplattieren der infizierten Bakterien kann die Anreicherung der Phagen bestimmt werden. Nach der Amplifikation der Phagen in den Bakterien werden ihre Titer bestimmt und es kann mit der nächsten Selektionsrunde begonnen werden. Nach drei bis fünf Runden können Phageeinzelklone gepickt, ihre DNA sequenziert oder ihre Bindungseigenschaft näher untersucht werden. Bild: (Steingroewera *et al.*, 2007)

1.5. Generierung von Antikörper-Phagenbanken

Wie schon erwähnt, werden Antikörper-Phagenbanken hinsichtlich der Herkunft ihres Ausgangsmaterials unterschieden. Jedoch sind Antikörper-produzierende Zellen, wie B-Zellen die Grundlage jeder Antikörperbibliothek. Für die Gewinnung spezifischer Antikörperfragmente, die ihr Target mit hoher Affinität binden, ist die Qualität der Antikörperbibliothek von entscheidender Bedeutung. Im Allgemeinen ist dabei die Affinität des isolierten Antikörpers proportional zur Diversität der Ausgangsbibliothek (Schmiedl und Dübel, 2004). In jedem Fall beginnt die Generierung jeder Antikörper-Phagenbank mit der Isolierung von Antikörper-produzierenden Zellen. Aus diesen wird die mRNA isoliert und mit Hilfe einer reversen Transkription in cDNA umgeschrieben. Durch die Polymerase-Kettenreaktion ist es möglich antikörperkodierende cDNA mit Hilfe von Pools an Primern spezifisch zu amplifizieren. Dadurch lässt sich ein Großteil des Antikörperrepertoires des Menschen molekularbiologisch isolieren und anschließend für den Aufbau komplexer Antikörperbibliotheken nutzen (Schirrmann und Hust, 2010). Die amplifizierten Antikörpergene werden um Restriktionsschnittstellen elongiert und je nach Art der Antikörper-Phagenbank mit unterschiedlichen Klonierungsstrategien in einen Phagemidvektor eingebracht.

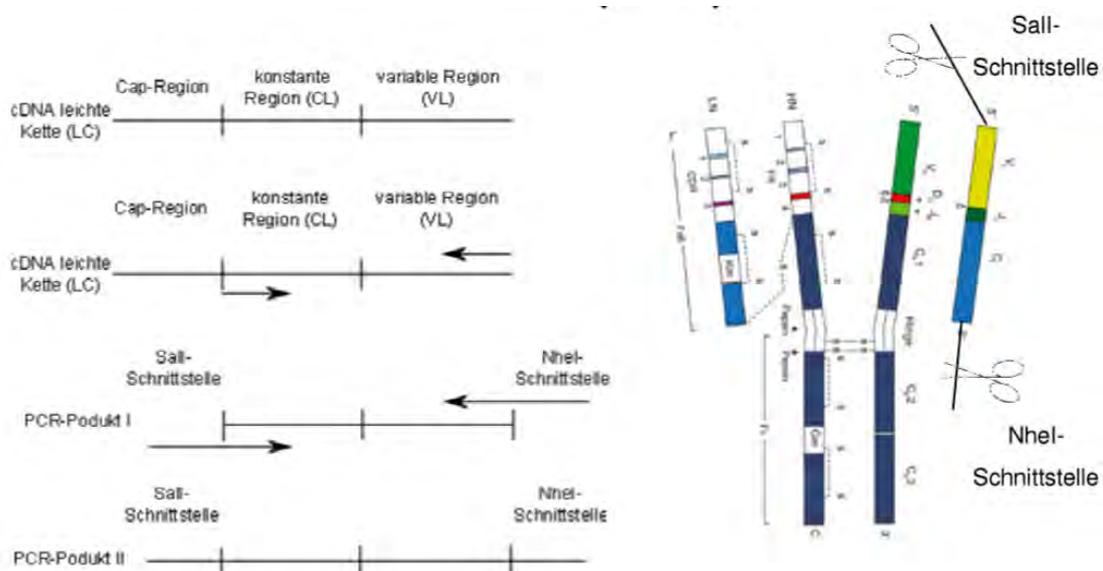


Abbildung 7: Amplifizierungsstrategie der leichten Kette zur Generierung eines Fab-Fragments: Zu Beginn wird die CL- und VL-Region mit Pools degenerierter familien-spezifischer Primer aus der cDNA herausamplifiziert. In einer darauf folgenden PCR wird das Antikörpergen um Restriktionsschnittstelle elongiert und kann somit von Restriktionsenzymen verdaut werden. Bild: (Friederike Braig, 2012)

Wird eine Fab-Antikörperbibliothek generiert, werden die CH1- und VH-Regionen der schweren Kette und die CL- und VL-Regionen der leichten Kette für die Klonierung verwendet (Wu *et al.*, 2001, Baskar *et al.*, 2009). In diesem Fall geht man einer sequenziellen Klonierungsstrategie nach, indem zunächst die schwere Kette in den Vektor kloniert wird und daraufhin die leichte Kette. Das ermöglicht eine weitere Steigerung der Diversität, da unterschiedliche schwere Ketten mit unterschiedlichen leichten Ketten gepaart werden.

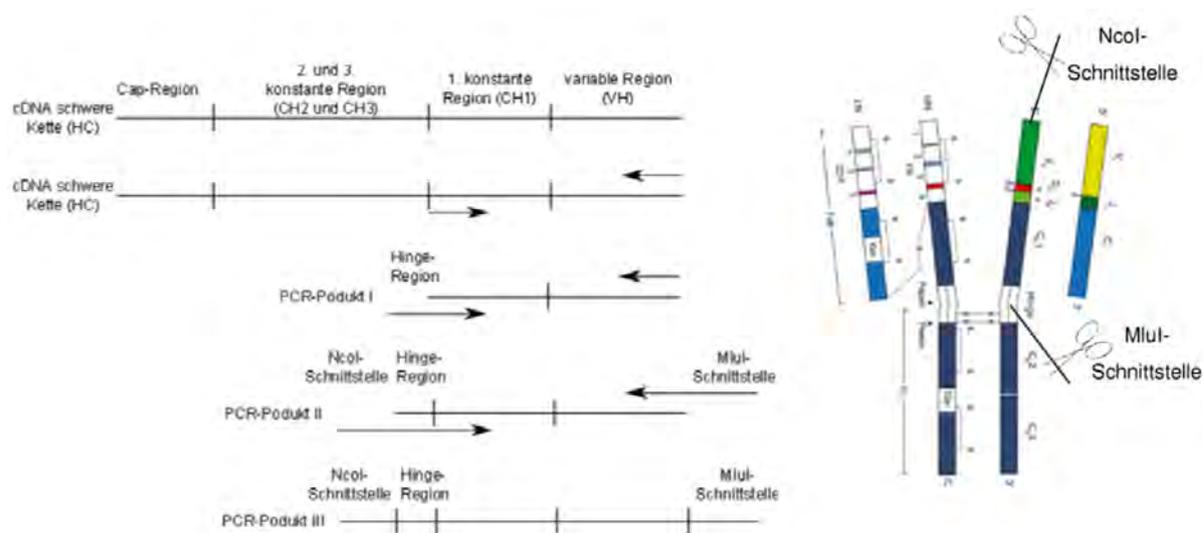


Abbildung 8: Amplifizierungsstrategie der schweren Kette zur Generierung eines Fab-Fragments: Zu Beginn wird die CH1- und VH-Region mit Pools degenerierter familien-spezifischer Primer aus der cDNA herausamplifiziert. In einer darauffolgenden PCR wird das Antikörpergen um die *hinge*-Region verlängert, damit die Möglichkeit gegeben wird eine Disulfidbrücke zwischen leichter und schwerer Kette auszubilden. In einer letzten PCR wird das Antikörpergen ebenfalls um Restriktionsschnittstellen elongiert. Bild: (Friederike Braig, 2012)

Dadurch kommen Kombinationen von Fab-Fragmenten zustande, die nicht natürlich-erweise im humanen B-Zell-Antikörperrepertoire vorkommen (Schmiedl und Dübel, 2004, Schirrmann und Hust, 2010). Nach jeder Ligation werden die Reaktionsansätze über eine Elektroporation in *E.coli*-Zellen transformiert, da diese Methode hohe Transformationseffizienzen gewährleistet. Als Selektion solcher sequenziellen Klonierungen, bedient man sich meistens sogenannter „Suizid-Gene“, sodass Phagemidvektoren entstehen, die beide Antikörpergene tragen. Darüber hinaus tragen die Phagemidvektoren Replikationsursprung und Verpackungssignal der Phagen. Phagemide beinhalten lediglich das gIII, welches als Fusionsprotein mit der Sequenz für ein Antikörper-Format exprimiert wird. Alle anderen Hüllproteine fehlen und müssen bei der Herstellung rekombinanter Antikörper-Phagen von Helferphagen produziert werden. Demnach werden die Antikörpergen-tragenden Phagemidvektoren in *E.coli*-Zellen transformiert, die von Helferphagen infiziert werden können (F-Pilus). Anschließend können die Antikörper-Phagen nach der Amplifikation in

den Bakterien über PEG/NaCl reversibel gefällt und aufgereinigt werden. Die so entstandenen filamentösen Phagen tragen dann ein an einem Fusionsprotein gekoppeltes Antikörperfragment auf ihrer Oberfläche. Werden die Antikörper-Phagen titriert, so kann mit einer definierten Menge an Antikörper-Phagen eine Selektionsrunde begonnen werden (Pande *et al.*, 2010).

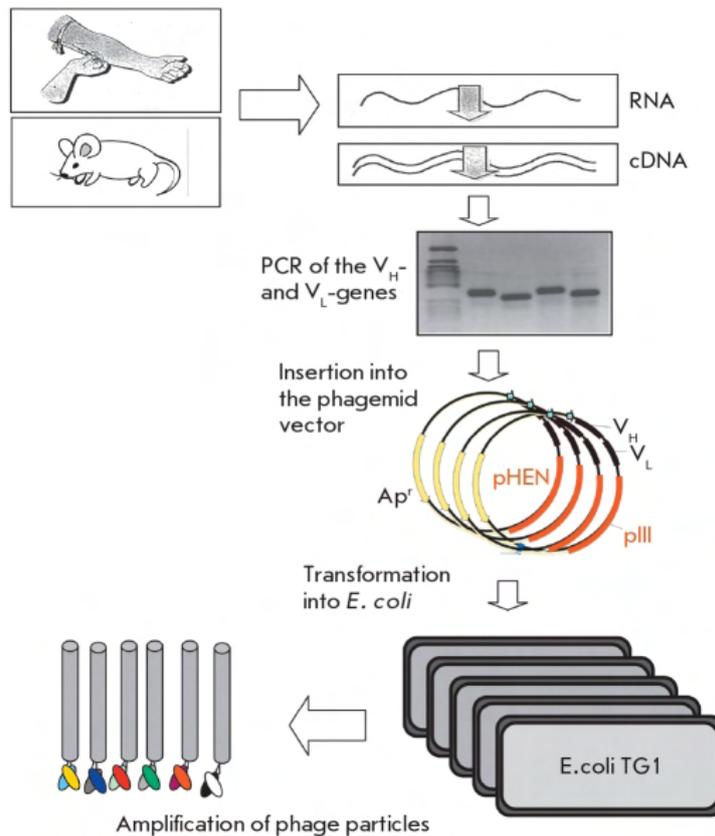


Abbildung 9: Schematisches Flussdiagramm zur Konstruktion von Antikörper-Phagenbanken: Antikörper-produzierende Zellen werden aus dem Vollblut humaner oder tierischer Spender isoliert. Die mRNA dieser Zellen wird über reverse Transkription in cDNA umgeschrieben. Die cDNA dient als Template in der PCR für die Amplifizierung und zur Elongation der Restriktionsschnittstellen der Antikörpergene. Ligierte Phagemidvektoren werden in *E. coli*-Zellen (hier TG1) transformiert und über die Infektion mit einem Helferphagen können Phagen exprimiert werden, die Antikörperfragmente, gekoppelt an dem Fusionsprotein pIII, auf ihrer Oberfläche tragen. Bild: (Tikunova und Morozova, 2009)

1.6. Zielsetzung der Arbeit

Zielstellung des Projektes ist es, ein geeignetes System zu etablieren, mit dem es möglich ist Antikörper-Phagenbanken, die das B-Zell Antikörperrepertoires von Myelompatienten als Fab-Fragmente exprimiert auf Bakteriophagen darstellen, im Hochdurchsatz gegen Myelomzelllinien zu screenen. Im Verfolg dieses Projektziels teilt sich die Arbeit in zwei Teile. Zunächst wird mit Hilfe eines bereits im Labor etablierten Systems eine Antikörper-Phagenbank kloniert, die als Grundlage für die Etablierung des Selektionssystems dienen soll. Für die Expression von Antikörper-

Fab-Fragmenten auf Bakteriophagen müssen die Antikörpergene CH1 und VH der schweren Kette IgG und CL und VL der leichten Kette kappa aus cDNA eines Myelompatienten über eine Polymerase-Kettenreaktion gewonnen und mit Restriktionsschnittstellen versehen werden. Diese Antikörperfragmente werden für die Klonierung der Antikörper-Phagenbank zur Verfügung gestellt. Sie werden demnach nur mit Restriktionsenzymen verdaut und in Phagemid-Vektoren ligiert. Im zweiten Teil soll versucht werden, die Antikörper-Phagen an Myelomzellen über drei Selektionsrunden anzureichern. Angereicherte Antikörperphagen werden gepickt, amplifiziert und in einem Bindungsassay näher untersucht. Ferner wird versucht, das System als zellbasierten Fluoreszenz-ELISA zu etablieren, um Phageneinzelklone im Hochdurchsatz screenen zu können. Im Zuge dieser Etablierung muss ein Protokoll entworfen werden, um Antikörper-Phagen im 96-Well-Format zu kultivieren. Entscheidend ist dabei der zu erreichende Phagentiter. Darüber hinaus werden Mikrotiterplatten mit verschiedenen Konzentrationen an Suspensionszellen gecoated und mit Kontrollphagen inkubiert. Um eine Aussage über eine erfolgreiche Etablierung des Fluoreszenz-ELISA machen zu können, werden noch potentielle Antikörper-Phagen aus dem Einzelklonbindungsassay gescreent.

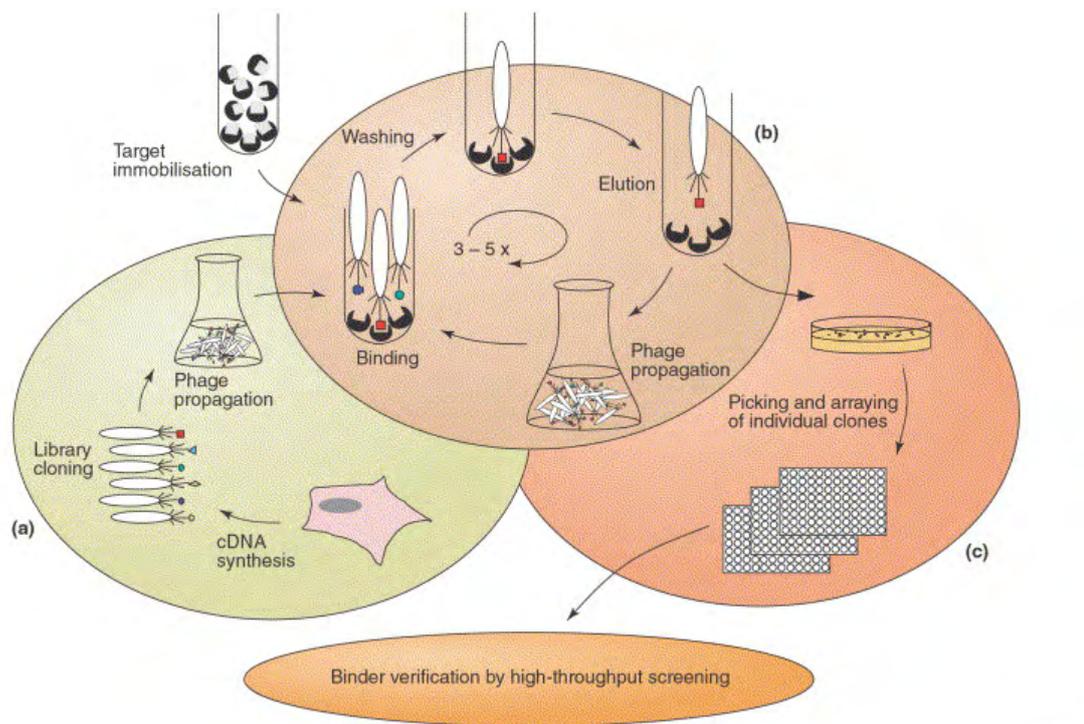


Abbildung 10: Schematisch dargestelltes Arbeitsprogramm der Bachelor Thesis: a) Generierung der Antikörper-Phagenbank durch Restriktion und Ligation bereitgestellter Antikörper-Amplikons HC IgG und LC κ im Zuge einer sequenziellen Klonierung. Präparation der Antikörper-Phagenbank, Amplifikation und Titration. b) Etablierung eines zellbasierten Selektionssystems durch Anreicherung der Antikörper-Phagen an vier unterschiedlichen Myelomzelllinien mittels BRASIL-Verfahren. c) Picken von Antikörper-Phageneinzelklonen und Untersuchung der Bindungscharakteristik. Etablierung des Hochdurchsatz-Screenings zellselektiv bindender Phageneinzelklone und Optimierung einer Amplifikationsstrategie der Phageneinzelklone im 96-Well-Format. Bild: (Konthur und Cramer, 2003)

2. Material

2.1. Laborgeräte

Gerät	Hersteller
Zentrifuge 5417R	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Concentrator 5301	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Mastercycler Gradient	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Biophotometer	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Zentrifuge Minifuge RF	Heraeus Holding GmbH, Hanau, Deutschland
Brutschrank	Heraeus Holding GmbH, Hanau, Deutschland
Laborbench Laminarflow	Heraeus Holding GmbH, Hanau, Deutschland
Laborbench Microflow	Nalge Nunc International, NY , USA
Zentrifuge Sorvall RC5C Plus	Thermo Scientific, USA
MicroPulser Elektroporator	Bio-Rad Laboratories, München, Deutschland
Gelkammer DNA Sub Cell	Bio-Rad Laboratories, München, Deutschland
Schüttelinkubator Certomat IS	B.Braun Biotech International, Melsungen, Deutschland
Nanodrop ND-100	Peqlab Erlangen, Deutschland
Geldokumentationsystem	Peqlab Erlangen, Deutschland
Netzteil E122 max. 150 V	Consort, Turnhau, Belgien
Vortexer Reax 2000	Heidolph, Schwabach, Deutschland
Pipetboy	Integra Biosciences GmbH, Fernwald, Deutschland
Reinstwassersystem	membraPure, Berlin, Deutschland
Photometer Infinite M200	Tecan Group ltd., Männedorf, Schweiz
Mikroskop	A.Krüß Optronik GmbH, Hamburg, Deutschland
Magnetrührer RET	IKA GmbH Co. KG, Staufen, Deutschland
Feinwaage Pioneer PA512C	Ohaus, Nänikon, Schweiz
Mikrowelle Express	Sharp Electronics GmbH, Hamburg, Deutschland
Wasserbad	GFL, Burgwedel, Deutschland

2.2. Verbrauchsmaterialien

Material	Hersteller
Mikroreaktionsgefäße 0,2 ml	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Mikroreaktionsgefäße 0,5 ml	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Mikroreaktionsgefäße 1,5 ml	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Mikroreaktionsgefäße 2,0 ml	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Pipettenspitzen 20 µl	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Pipettenspitzen 200 µl	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Pipettenspitzen 1000 µl	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Brazilröhrchen 400 µl	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Kulturröhrchen 13 ml	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Tissue Culture Flask 75 cm ²	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Petrischalen 30 x 30 cm	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Zentrifugenröhrchen 15 ml	Greiner Bio-One, Frickenhausen, Deutschland
Zentrifugenröhrchen 50 ml	Greiner Bio-One, Frickenhausen, Deutschland
Pipetten 5 ml	Falcon, Franklin Lakes, USA
Pipetten 10 ml	Falcon, Franklin Lakes, USA
Pipetten 25 ml	Falcon, Franklin Lakes, USA
Cell Scraper 25 cm	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Reagent Reservoir	Thermo Scientific, USA
Kryoröhrchen	Greiner Bio-One, Frickenhausen, Deutschland
Gene Pulser Cuvette, 0,1 cm	Bio-Rad Laboratories, München, Deutschland
Mikrotiterplatte 96 Well, Round- Bottom, clear	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Mikrotiterplatte 96 Well, Flat- Bottom, black	Perkin Elmer, Massachusetts, USA

2.3. Chemikalien, Puffer und Lösungen

Alle Chemikalien wurden bei den Herstellern New England Biolabs, Fermentas, peqlab, Qiagen, Merck, Roche, und Roth erworben.

2.3.1. Chemikalien

Chemikalie	Konzentration
Ethanol	Stocklösung 100 %, Arbeitskonzentration 70 % und 100 %
Natriumacetat	Stocklösung 3 M
Ethidiumbromid	Stockkonzentration 10 mg/ml
Isopropanol	Stocklösung 100%
NaCl	Arbeitskonzentration 2,5 M
KaCl	Arbeitskonzentration 2,5 M
NaOH	Stocklösung 2 N
HCl	Stocklösung 6 N
Acetat	Stocklösung 99 %
EDTA	Stocklösung 0,25 M
Tris-Base	Arbeitskonzentration 2 M
Glycerol	Arbeitskonzentration 15%, 30 %, 50 %
Ampicillin	Arbeitskonzentration 100 µg/ml
Tetrazyklin	Arbeitskonzentration 12,5 µg/ml
Kanamycin	Arbeitskonzentration 60 µg/ml
Flüssigstickstoff	
Bromphenolblau	Arbeitskonzentration 2,5 mg/ml
Xylencyanol	Arbeitskonzentration 2,5 mg/ml
Trypan Blue Stain	Arbeitskonzentration 0,4 %
Trypsin-EDTA	Stocklösung 100 % Arbeitskonzentration 10%
Paraformaldehyd	Stocklösung 16 % Arbeitskonzentration 4 %
Dibutylphtalat	Stocklösung 100% Arbeitskonzentration 90%
Cyclohexan	Stocklösung 100% Arbeitskonzentration 10%
Polyethylen Glykol 6000	Stocklösung 100 % Arbeitskonzentration 20 %

2.3.2. Puffer und Lösungen für Agarosegele

Puffer und Lösung	Komponenten und Konzentration
Agarose	5-10 g/l (in 1 x TAE)
TAE (10 x, pH 8,18 - 8,29)	48,4 g/l Tris-Base 10,9 g/l Acetat 2,92 g/l EDTA
6x DNA Loading Dye	2,5 mg/ml Bromphenolblau 2,5 mg/ml Xylencyanol 400 mg/ml D(+)-Saccharose in ddH ₂ O lösen

2.3.3. Puffer und Lösungen für Phage-Display

Puffer und Lösung	Komponenten und Konzentration
10x PBS	80 g/l NaCl 2 g/l KCL, 14,4 g/l Na ₂ HPO ₄ , 2,4 g/l KH ₂ PO ₄ , pH-Wert 7,4, in ddH ₂ O lösen und autoklavieren
10x TBS	60,5 g/l Tris 87,6 g/l g NaCl in ddH ₂ O lösen und autoklavieren
PBS-T	PBS + 0,2 % Tween 20
1 % BSA/PBS	1 g BSA in 100 ml PBS lösen
20 % PEG/NaCl	200 g/l PEG 8000 233,8 g/l NaCl in ddH ₂ O lösen und autoklavieren
BRASIL-ÖL	90 % Dibutylphtalat 10 % Cyclohexan
4 % Paraformaldehyd	8 g in 40 ml ddH ₂ O 1 h bei 55°C lösen 5 ml 10x PBS dazugeben pH auf 7,3 einstellen und aliquotieren
0,01 % Poly-L-Lysin	

2.3.4. Sonstige Chemikalien und Lösungen

Chemikalie und Lösung	Hersteller
BSA	NEB, Ipswich, UK
DMSO	NEB, Ipswich, UK
Nukleotide	NEB, Ipswich, UK
DNA-Marker 1 kb , 100 bp	Fermentas, St. Leon-Rot, Deutschland

2.4. Kit-Systeme

Kit	Hersteller
Plasmid Maxikit	Qiagen, Hilden, Deutschland
Nucleo-Spin Gel and PCR-Cleanup	Macherey-Nagel GmbH Co. KG, Düren, Deutschland

2.5. Zellbiologische Materialien**2.5.1. Zelllinien**

Zelllinie	Information
U266	Suspensionszellen, Multiples Myelom
KMS	Suspensionszellen, Multiples Myelom
AM01	Suspensionszellen, Multiples Myelom
CA46	Suspensionszellen, Burkitt Lymphom
PBMC's	Blutzellen des peripheren Blutsystems, frisch aus der Blutspende erhalten

2.5.2. Zellkultur-Medien

Medium und Seren	Hersteller
DMEM (1x) + GlutaMAX TM -I	Gibco, Darmstadt, Deutschland
FCS	Gibco, Darmstadt, Deutschland
RPMI 1640	Gibco, Darmstadt, Deutschland

2.5.3. Zusätze für Zellkultur-Medien

Medium	Zusatz
DMEM (1X) + GlutaMAX™-I	1 % Pen Strep, 15 % FCS
RPMI 1640	1 % Pen Strep, 10 % FCS
Einfriermedium	90 % FCS, 10 % DMSO

2.6. Molekularbiologisches Material

2.6.1. Bakterienstämme

Bakterienstamm	Genotyp	Hersteller
<i>E. coli</i> DB3.1, elektrokompetente Zellen	F- gyrA462 endA1 glnV44 Δ(sr1-recA) mcrB mrr hsdS20(rB-, mB-) ara14 galK2 lacY1 proA2 rpsL20(Smr) xyl5 Δ leu mtl1	Invitrogen, Carlsbad, USA
<i>E. coli</i> DH10B, elektrokompetente Zellen	F- endA1 recA1 galE15 galK16 nupG rpsL Δ lacX74 Φ80lacZΔM15 araD139 Δ(ara,leu)7697 mcrA Δ(mrr-hsdRMS- mcrBC) λ-	Invitrogen, Carlsbad, USA
<i>E. coli</i> TG1, elektrokompetente Zellen	F' [traD36 proAB+ la- cIq lacZΔ M15]supE thi- 1 Δ(lac-proAB)Δ(mcrB- hsdSM)5, (rK-mK-)	Stratagene, La Jolla, USA
<i>E. coli</i> K12 ER2738	F'proA+B+ la- cIq Δ(lacZ)M15 zzf::Tn10(TetR)/ fhuA2 glnV Δ(lac-proAB) thi-1 Δ(hsdS-mcrB)5	NEB, Ipswich, UK

2.6.2. Bakteriophagen

Bakteriophage	Hersteller	Information
Helferphage M13K07	NEB, Ipswich, UK	Superinfektion der Antikörper-Phagen
X12 Peptidphage TSMK3	NEB, Ipswich, UK	Positivkontrolle
X12 Peptidphage R1	NEB, Ipswich, UK	Negativkontrolle

2.6.3. Medien für Bakterienkulturen

Medium	Komponenten und Konzentration
LB-Medium	10 g/l Bacto Trypton 5 g/l Hefeextrakt 10 g/l NaCl in ddH ₂ O lösen und autoklavieren
SOB-Medium	20 g/l Bacto Trypton 5 g/l Hefeextrakt 0,5 g/l NaCl 0,186 g/l KCl in ddH ₂ O lösen, mit NaOH auf pH 7 einstellen und autoklavieren
SOC-Medium	1 ml 1 M sterilfiltrierte Glucose und 0,5 ml 1 M autoklaviertes MgCl ₂ in 48,5 ml SOB-Medium lösen
LB-Agar	10 g/l Bacto Trypton 5 g/l Hefeextrakt 10 g/l NaCl 15 g/l Bacto Agar in ddH ₂ O lösen und autoklavieren
2x YT-Medium	16 g/l Bacto Trypton 10 g/l Hefeextrakt 5 g/l NaCl in ddH ₂ O lösen und autoklavieren
2x YT-Agar	16 g/l Bacto Trypton 10 g/l Hefeextrakt 15 g/l Agarose 5 g/l NaCl in ddH ₂ O lösen und autoklavieren
Phagen Top Agar	10 g/l Bacto Trypton 10 g/l Bacto Agar 5 g/l NaCl in ddH ₂ O lösen und autoklavieren

2.6.4. Enzyme und Puffer

Enzym	Enzymaktivität	Hersteller
Restriktionsenzyme		
<i>SalI-HFTM</i>	20000 U/ml	NEB, Ipswich, UK
<i>NheI-HFTM</i>	20000 U/ml	NEB, Ipswich, UK
<i>NcoI</i>	10000 U/ml	NEB, Ipswich, UK
<i>MluI</i>	10000 U/ml	NEB, Ipswich, UK
DNA-Polymerase		
Phusion Hot Start II High Fidelity	2 U/µl	Fermentas, St. Leon-Rot, Deutschland
Ligase		
T4-DNA-Ligase	100 U/ml	Fermentas, St. Leon-Rot, Deutschland
Phosphatase		
FastAP TM Thermosensi- tive Alkalische Phospha- tase	1 U/µl	Fermentas, St. Leon-Rot, Deutschland
Reaktionspuffer		
Buffer 3		NEB, Ipswich, UK
Buffer 4		NEB, Ipswich, UK
GC-Buffer		Thermo Scientific, USA
HF-Buffer		Thermo Scientific, USA
T4 DNA Ligase Buffer		Fermentas, St. Leon-Rot, Deutschland
10x FastAP TM		Fermentas, St. Leon-Rot, Deutschland

2.6.5. Primer

Primer Name	5'-3' Sequenz	Annealing in °C
Vκ FW-Pool-SalI		
VK2N1-SalI-fw	CAAAGTCGACAGATGCT GTGTGAMCCAGCCTC	64
VK2N2-SalI-fw	CAAAGTCGACTCCCTCC AAGTTCACATCCTGAG	64
VK1-SalI-fw	CAAAGTCGACGACATCC RGDTGACCCAGTCTCC	64
VK246-SalI-fw	CAAAGTCGACGATATTG TGMTGACBCAGWCTCC	64
VK3-SalI-fw	CAAAGTCGACGAAATTG TRWTGACRCAGTCTCC	64
VK5-SalI-fw	CAAAGTCGACGAAACGA CACTCACGCAGTCTC	64
FB-Igκ-NheI-rv	CGCTAGCTAGCACACTCT CCCCTGTTGAAGCTCTT	71-72
VH-pool-NcoI-fw		
CG-VH1-NcoI	CATGCCATGGCGCAGGTC CAGCTKGTRCAGTCTGG	70-72
CG-VH157-NcoI	CATGCCATGGCGCAGGTG CAGCTGGTGSARTCTGG	70-72
CG-VH2-NcoI	CATGCCATGGCGCAGRTC ACCTTGAAGGAGTCTG	70-72
CG-VH3-NcoI	CATGCCATGGCGGAGGTG CAGCTGKTGGAGWCY	70-72
CG-VH4-NcoI	CATGCCATGGCGCAGGTG CAGCTGCAGGAGTCSG	70-72
CG-VH4-DP63-NcoI	CATGCCATGGCGCAG GTGCAGCTACAGCAGTGGG	70-72
CG-VH6-NcoI	CATGCCATGGCGCAGGTA CAGCTGCAGCAGTCA	
CG-VH3N-NcoI	CATGCCATGGCGTCAACA CAACGGTTCCCAGTTA	70-72
HC-IgG-hinge-2-rv	ACAGCTTTTGGGCTCAACT CTTGTCCACCTTGGTGTTC	75

Alle Primer wurden von der Firma Metabion International AG synthetisiert

2.6.6. Plasmide

Plasmid	Hersteller
Phagemid Vektor pFB-Fab	Friederike Braig, (Msc)

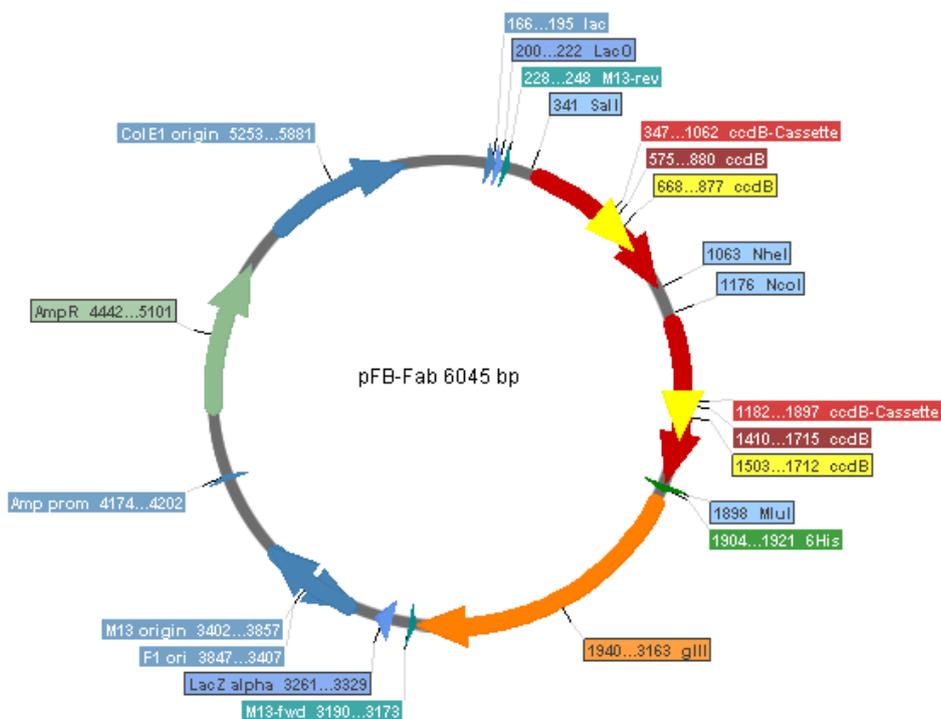


Abbildung 11: Schematische, zirkuläre Darstellung des Vektors pFB-Fab: Der Vektor ist 6045 Basenpaare lang und wird auch als Phagemid bezeichnet, da er einen Origin of Replication trägt, welcher eine einzelsträngige Replikation der M13-Phagen ermöglicht. Die *ccdB*-Gene sind sogenannte „Suizid-Gene“ und dienen als zusätzliches Selektionssystem. Das *gIII*-Gen ist für die Expression auf M13-Phagen notwendig. Zusätzlich trägt der Vektor ein Lac-Operon und ein 6His-Tag für die Expression und die affinitätschromatografische Aufreinigung. Darüber hinaus wird eine Ampicillin-Resistenz vermittelt.

2.6.7. Oligonucleotide

Oligonucleotid	Konzentration	Information
HC-IgG-Hinge-MluI-NcoI	35 ng/l	Amplifiziert von cDNA eines Myelompatienten
LC κ -SalI-NheI	28 ng/l	Amplifiziert von cDNA eines Myelompatienten

2.6.8. Antikörper und Proteine

Antikörper	Kopplung	Hersteller
Anti-fd	Biotin	Sigma-Aldrich, USA
Streptavidin	FITC	Invitrogen, Carlsbad, USA

3. Methoden

3.1. Molekularbiologische Methoden

3.1.1. Restriktionsverdau

Der Phagemidvektor pFB-Fab und die Antikörper-Amplikons der leichten Kette kappa und schweren Kette IgG werden in zwei aufeinanderfolgenden Klonierungen in den Vektor eingebracht. Dabei werden die *ccdB*-Kassetten durch die Restriktion herausgeschnitten und durch die Antikörpergene ersetzt. Die Enzyme dimerisieren und schneiden die DNA in einer für sie spezifischen palindromischen Erkennungssequenz mit einem 5'-Überhang, sogenannte kohäsive Enden. Per Definition verdaut man mit 1 U Restriktionsenzym 1 µg DNA in 1 h (Yuan, 1981).

Vektor pFB-Fab	
Vektor	20 µg
<i>MluI</i>	20 U
<i>NcoI</i>	20 U
Reaktionspuffer 3	1:10

Insert HC IgG	
Insert	1 µg
<i>MluI</i>	10 U
<i>NcoI</i>	10 U
Reaktionspuffer 3	1:10

pFB-Fab + HC IgG	
Vektor	20 µg
<i>NheI-HF</i>	20 U
<i>SalI-HF</i>	20 U
Reaktionspuffer 4	1:10
BSA	1:100

Insert LCκ	
Insert	1 µg
<i>NheI-HF</i>	10 U
<i>SalI-HF</i>	10 U
Reaktionspuffer 4	1:10
BSA	1:100

Da die Exonukleaseaktivität der Enzyme geringer ist als die Endonukleaseaktivität und die Antikörper-Amplikons am Ende verdaut werden, wurde die Konzentration des Enzyms, bezogen auf die maximale Glycerol Konzentration (10 % des Gesamtvolumens) im Reaktionsansatz, ausgereizt. Beide Reaktionsansätze inkubierten für 4 h bei 37 °C. Nach der Inkubation wurden die Restriktionsenzyme bei 65 °C für 20 min inaktiviert. Die Aufreinigung der verdauten Vektoren sowie der Antikörper-Inserts erfolgte über eine Agarosegelelektrophorese.

3.1.2. Dephosphorilieren von DNA-Fragmenten

Um einer möglichen Religation entgegenzuwirken wurde der Vektor nach beiden Restriktionen mit einer thermosensitiven alkalischen Phosphatase dephosphoriliert. Dies dient dazu den Hintergrund an nicht klonierten Vektoren zu minimieren und eine bessere Aussage über die Diversität der Antikörper-Phagenbanken machen zu können. Mit 1 U alkalischer Phosphatase wird 1 µg DNA dephosphoriliert. Da die Phosphatase in jedem Reaktionspuffer aktiv ist, gab man 1 µl direkt zu 1 µg verdauter DNA. Der Reaktionsansatz wurde zunächst für 10 min bei 37 °C inkubiert und das Enzym danach bei 75 °C für 5 min inaktiviert.

3.1.3. Ligation von DNA-Fragmenten

Die Ligase verknüpft kohäsive Enden oder Blunt-Enden von DNA-Fragmenten durch eine enzymatische Reaktion unter Verbrauch von ATP. Dabei werden Phosphodiesterbindungen zwischen der 5'-Hydroxygruppe und der 3'-Phosphatgruppe ausgebildet (Lehman *et al.*, 1974). Das molare Verhältnis beider Ligationen entsprach Phagemidvektor zu Antikörper-Insert 1:3.

Ligationsansatz für 40 µl

2,0 µl	T4 DNA Ligase
4,0 µl	10x T4 Ligase Puffer
1,0 µg	Vektor (verdaut, aufgereinigt und dephosphoriliert)
0,4 µg	Insert (LCκ o. HC IgG verdaut und aufgereinigt)
	auf 40 µl mit ddH ₂ O aufgefüllt

Bevor Ligase und Ligase-Puffer dazugegeben werden, wurde der Reaktionsansatz für 2 min bei 65 °C inkubiert, um gegebenenfalls angelagerte kohäsive Enden zu schmelzen. Der Ligationsansatz wurde 16 h bei 16 °C inkubiert

3.1.4. Polymerase-Kettenreaktion

Die Polymerase-Kettenreaktion beschreibt eine Methode, welche eine gezielte exponentielle Amplifikation von DNA-Fragmenten ermöglicht (Saiki *et al.*, 1988). Mit Hilfe der PCR können die Klonierungen der schweren und leichten Kette in den Phagemidvektor kontrolliert werden. Dabei wurden nach jeder Transformation jeweils zehn Bakterienkolonien gepickt und darauf untersucht, ob entsprechende Antikörpergene enthalten sind. Jede gepickte Kolonie wurde in 35 μl ddH₂O mit einer Pipettenspitze aspiriert und diente als Template für die Kolonie PCR.

Die Proben für die PCR enthielten folgende Reagenzien und wurden nach folgendem PCR-Programm inkubiert:

PCR-Ansatz: LC κ für 20 μl		PCR-Ansatz: HC IgG für 20 μl	
12,1 μl	ddH ₂ O	12,1 μl	ddH ₂ O
4,0 μl	5x HF-Buffer	4,0 μl	5x GC-Buffer
0,4 μl	dNTP's	0,4 μl	dNTP's
1,0 μl	V κ -pool-Sall-fw	1,0 μl	VH-Pool-NcoI-fw
1,0 μl	FB-IG κ -NheI-rv	1,0 μl	HC-IgG-hinge-2-rv
0,5 μl	Gepickte Kolonie	0,5 μl	Gepickte Kolonie
0,2 μl	DNA-Polymerase	0,2 μl	DNA-Polymerase
0,4 μl	DMSO optional	0,4 μl	DMSO optional

PCR-Programm

1. Denaturierung	30 sec	98,0°C
2. Denaturierung	10 sec	98,0°C
3. Annealing	30 sec	66,5°C
4. Elongation	22 sec	72,0°C
5. 30 Zyklen von 2 bis 4		
6. Final Extension	10 min	72,0°C
7. Kühlen bei 4,0°C		

Nach der Inkubation im PCR-Cycler wurden die Proben entnommen und in der Agarosegelelektrophorese analysiert.

3.1.5. Agarosegelelektrophorese

Die Agarosegelelektrophorese trennt Nukleinsäuren nach ihrer Größe auf, um sie ferner mit Nukleinsäuren bekannter Größe zu vergleichen. Es wurde eine Agarosekonzentration von 1 % in 1x TAE verwendet. Nach Zugabe von 10 µl Ethidiumbromid (1:1000 aufs Gelvolumen), welches in GC-Paare der DNA interkaliert, können DNA-Fragmente unter UV-Licht aufgrund der Abgabe von Fluoreszenzlicht sichtbar gemacht werden. Bevor die Probe auf das Gel geladen wurde, gab man 6x Ladebuffer dazu. Die DNA-Fragmente wurden aufgrund ihrer negativen Ladung bei 150 V in einem elektrischen Feld getrennt.

3.1.6. Aufreinigung von DNA

(a) Aufreinigung von DNA-Fragmenten aus einem Agarosegel

Diese Aufreinigung diente dazu die DNA-Fragmente aus dem verdauten Restriktionsansatz gezielt aufzureinigen. Nachdem der Ansatz über die Agarosegelelektrophorese entsprechend seiner Größe nach aufgetrennt worden war, wurde die entsprechende Bande mit einem sterilen Skalpell ausgeschnitten und mit dem Macherey-Nagel Nucleo-Spin Gel and PCR-Cleanup-Kit aufgereinigt. Es wurde das vom Hersteller mitgelieferte Protokoll verwendet.

(b) Plasmidaufreinigung einer E.coli-Kultur über Maxipräparation

Die Transformationsansätze wurden auf (30 x 30) cm² großen LB-Agar Petrischalen ausplattiert und über Nacht inkubiert. Die gewachsenen Kolonien konnten nach der Kolonie-PCR gezählt, mit 400 ml LB-Medium + Glukose + Ampicillin abgeschabt und für 1 h bei 37 °C und 180 rpm im Schüttelinkubator kultiviert werden. Die weitere Plasmid-Maxipräparation erfolgte über das QIAGEN Plasmidmaxikit. Es wurde das vom Hersteller mitgelieferte Protokoll verwendet.

(d) Plasmid-DNA-Aufreinigung über Ethanolpräzipitation

Die Ethanolpräzipitation diente dazu, den Ligationsansatz aufzureinigen und ferner eine Aufkonzentrierung zu erreichen. Durch die Zugabe von Natriumacetat und Ethanol fällt man die DNA in wässrigen Lösungen aus und nimmt sie später in einem geeigneten Puffer wieder auf (Sambrook *et al.*, 2001). Der Ligationsansatz wurde zu 1/10 des Ausgangsvolumens 3 M Natriumacetat (pH 5,8) und zum 2,5-fachen des Ausgangsvolumens mit eisgekühltem, absoluten Ethanol versetzt. Um die Präzipitation zu beschleunigen, wurde der Ansatz in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei 4 °C und 12000 rpm für 10 min zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das DNA-Pellet mit 70% Ethanol gewaschen, eingefroren und wie zuvor zentrifugiert. Nachdem das DNA-Pellet luftgetrocknet war, resuspendierte man es in 10 µl ddH₂O.

3.1.7. Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Durch die Messung der Absorption bei 260 nm und bei 280 nm mit einem Photometer, konnte die Konzentration der Nukleinsäuren ermittelt werden. Nukleinsäuren besitzen ein Absorptionsmaximum bei 260 nm, Proteine bei 280 nm. Folgende Angaben dienen zur Berechnung der Konzentration.

$OD_{260nm} = 1,0$ doppelsträngiger DNA entsprechen etwa 50 μg DNA / ml

$OD_{260nm} = 1,0$ einzelsträngiger DNA entsprechen etwa 33 μg DNA / ml

$OD_{260nm} = 1,0$ einzelsträngiger RNA entsprechen etwa 40 μg RNA / ml

Ermittelt man den Quotienten, so kann man eine Aussage über die Reinheit der DNA gemacht werden. Wenn $\frac{E_{260}}{E_{280}} = 1,8 - 2$, dann beträgt die Reinheit der DNA 75% bis 95%.

3.2. Mikrobiologische Methoden

3.2.1. Kultivierung von E.coli Bakterien

(a) Kultivierung von E.coli Bakterien in flüssigem Medium

Die Bakterienkolonien wurden entweder gepickt oder als Glycerol-Stock in Medium mit 2 % Glukose und -falls nötig- mit Antibiotika überführt und bei 37°C zwischen 180 und 220 rpm kultiviert.

(b) Kultivierung von E.coli Bakterien auf Agar-Petrischalen

Die Bakterien wurden entweder auf (30 x 30) cm² Platten oder auf handelsübliche Petrischalen mit Agar und Antibiotika -falls nötig- ausplattiert. Das Ausplattieren erfolgte mit sterilen Glaskugeln. Die Bakterienkolonien inkubierten bei 37 °C im Brutschrank.

(c) Aufbewahrung von E.coli Bakterien

Um *E.coli* Bakterien zu lagern, wurden diese entweder direkt aus der Flüssigkultur entnommen oder über eine Zentrifugation bei 10000 rpm für 10 min abgetrennt und in Glycerol mit einer Endkonzentration von 30 % gegeben. Die Bakterien lagerten bis zum Gebrauch bei -80 °C.

3.2.2. Bestimmung der Zelldichte von E.coli Bakterien

Die Zelldichte der Bakterienkulturen ließ sich durch Messen der optischen Dichte bei einer Wellenlänge von 600 nm im Photometer bestimmen.

3.2.3. Herstellen von elektrokompetenten Bakterien

Voraussetzung für eine erfolgreiche Transformation ist die Verwendung kompetenter Zellen. Die Transformation erfolgte über eine Elektroporation. Diese Methode wird aufgrund höherer Transformationseffizienzen genutzt. Diese sind für die Klonierung von Antikörper-Phagenbanken mit hohen Diversitäten notwendig. Zunächst müssen die Bakterien in einen Zustand überführt werden, der es ihnen ermöglicht, von außen zugeführte DNA (hier: der Ligationsansatz) in die Zelle aufzunehmen. Zunächst wurden die *E. coli* (DH10B, DB3.1 und TG1) Bakterien auf einer LB-Agar-Petrischale ohne Antibiotika ausgestrichen und über Nacht bei 37 °C im Brutschrank inkubiert. Am Nachmittag des folgenden Tages konnte eine Einzelkolonie gepickt werden, mit der die 125 ml LB-Medium Vorkultur angeimpft wurde. Die Vorkultur inkubierte im Thermoschüttler bei 37 °C für 18 h. Am Morgen des nächsten Tages wurde mit 1 ml der Vorkultur 1000 ml LB-Medium angeimpft und bis zu einer OD_{600nm} von 0,6 wachsen gelassen. Wichtig ist, dass sich die Zellen in ihrer exponentiellen Wachstumsphase befinden. Nach der Kultivierung wurden die Bakterien für 15 min auf Eis inkubiert. Ab diesem Zeitpunkt müssen die Zellen eisgekühlt bleiben. Nach der Inkubation zentrifugierte man die Zellen bei 4 °C und 4000 rpm für 10 min. Das Pellet wurde in 100 ml eiskaltem ddH₂O vorsichtig resuspendiert und wie zuvor zentrifugiert. Im nächsten Schritt resuspendierte man das Zellpellet in 500 ml 10 % Glycerol und zentrifugierte ein weiteres Mal. Nachdem mit 40 ml 10 % Glycerol das Bakterienpellet ein weiteres Mal resuspendiert und zentrifugiert wurde, konnte es mit 2 ml 10 % Glycerol resuspendiert und jeweils 50 µl in gekühlte Mikroreaktionsgefäße aliquotiert werden. Bevor die Zellen bei -80 °C gelagert werden konnten, müssten diese auf Trockeneis einfrieren.

3.2.4. Transformation von Bakterien mittels Elektroporation

Die Elektroporation beschreibt eine Transformationsmethode, die das Einbringen von DNA in Bakterien ermöglicht. Diese Methode übt für 5 ms einen elektrischen Impuls mit 1800 V , 200 Ω und 25 µF auf die Bakterien aus. Jener Impuls schwächt die Zellmembran und die von außen zugeführte DNA kann aufgenommen werden. 1 µg DNA wurde mit 50 µl elektrokompetente Zellen durchmischt, in eine gekühlte Genepulser-Küvette überführt und daraufhin wurde der Impuls ausgelöst. Anschließend wurde zügig 950 µl auf 37 °C temperiertes SOC-Medium in die Küvette gegeben, die Bakteriensuspension in ein 13 ml Kulturröhrchen überführt und für 1 h bei 37 °C und 180 rpm inkubiert (Dower *et al.*, 1988). Nach abgeschlossener Inkubation konnten unterschiedliche Verdünnungen auf LB-Agar + Ampicillin ausplattiert werden.

3.3. Zellbiologische Methoden

Da die Antikörper-Phagenbank ausschließlich auf Myelomzelllinien selektiert wurde, beziehen sich folgende Methoden nur auf Myelomzellen in Suspension. PBMC's wurden gezählt zur Verfügung gestellt.

3.3.1. Zellen auftauen

Die Zellen wurden dem -80 °C Gefrierschrank entnommen und 2 min in einem Wasserbad bei 37 °C aufgetaut. Die Zellsuspension wurde in eine 75 cm² Zellkulturflasche überführt und mit 37 °C temperiertem Medium versetzt.

3.3.2. Stammerhaltung

Es wurden Zellkultur-Flaschen mit einer hydrophoben Oberfläche für die Kultur verwendet. Der Brutschrank hielt eine konstante Temperatur von 37 °C bei einem CO₂-Gehalt von 5 %.

3.3.3. Passagieren von Zellen

Hatten die Zellen eine Konfluenz zwischen 80 bis 90 % erreicht, wurden diese gesplittet indem ein Bruchteil der Zellsuspension aus der Erhaltungskultur entnommen und in eine neue Zellkultur-Flasche überführt wurde. Anschließend wurde das entnommene Volumen in der neuen Flasche mit temperierten Medium versetzt.

3.3.4. Bestimmung der Zellzahlen

Trypanblau ist ein saurer Farbstoff, dessen Anion an Zellproteine bindet. Das Trypanblau dringt durch defekte Zellmembranen toter Zellen in das Cytosol ein und färbt die Zellen tiefblau. Lebende Zellen erscheinen unter dem Mikroskop leuchtend hell (Mosiman *et al.*, 1997). Mit einer Neubauer-Zählkammer konnte die Lebenszellzahl, der sich in Kultur befindenen Zellen bestimmt werden. 10 µl der Zellsuspension wurden mit 90 µl Trypan Blue Stain versetzt. Anschließend wurden 10 µl zwischen die zwei Glasplatten der Zählkammer gegeben und unter dem Lichtmikroskop ausgezählt. Mit folgender Gleichung konnte die Lebenszellzahl bestimmt werden.

$$C_x = M * F_{ZK} * F_T * V_K$$

Mit:

C_x = Gesamtzellzahl in Kulturvolumen

M = Arithmetisches Mittel der ausgezählten Quadranten

F_K = Verdünnungsfaktor der Zählkammer

F_T = Trypanblauverdünnung

V_K = Kulturvolumen

3.4. Phage-Display Methoden

3.4.1. Aufreinigung der Antikörper-Phagen über PEG/NaCl-Fällung

Die Aufreinigung der Antikörper-Phagen aus einer trüben Bakterienkultur erfolgte über eine PEG/NaCl-Fällung. Polyethylenglykol ist ein hydrophiles ungeladenes Polymer, welches mit proteinogenen Bakteriophagen in wässriger Lösung um das Hydratationswasser konkurriert. Die Zugabe von Polyethylenglycol führt zu einer schonenden und reversiblen Fällung der Bakteriophagen (Ingham, 1990). Die trübe Bakterienkultur wurde in ein Zentrifugenröhrchen überführt und bei 10000 rpm und 4 °C für 20 min zentrifugiert. Das Bakterienpellet wurde verworfen und der phagenhaltige Überstand in PEG/NaCl gegeben, durchmischt und bei 4 °C auf Eis für mindestens 1 h gefällt. Nach abgeschlossener Fällung folgte eine weitere Zentrifugation wie zuvor. Der Überstand wurde verworfen und die Phagenpellets trockneten während einer weiteren Zentrifugation für 5 min. Anschließend konnte der restliche Überstand mit einer Pipette abgenommen, die Antikörper-Phagen vorsichtig in 200 µl PBS resuspendiert und in ein 1,5 ml Mikroreaktionsgefäß überführt werden. Um die gesamten Bakterien und Bakteriendebris abzutrennen wurden die Phagen ein weiteres Mal bei 10000 rpm, 4 °C und 10 min zentrifugiert. Die reinen Phagenüberstände wurden in ein Mikroreaktionsgefäß überführt und bei 4 °C gelagert.

3.4.2. Helferphagen Präparation

Der Helferphage M13K07 dient dazu, Fab-Phagemid tragende *E.coli* Bakterien zu infizieren und somit Bakteriophagen zu produzieren, welche Fab-Fragmente auf ihrer Oberfläche exprimieren (Russel *et al.*, 1986). Zunächst wurde eine 1:10 Verdünnungsreihe (10^{-1} bis 10^{-11}) des M13K07-Stocks in PBS angefertigt. 4 ml auf 41 °C temperierter Phagen-Top-Agar, 200 µl *E.coli* TG1 ($OD_{600\text{ nm}} = 0,5 - 0,7$) und 100 µl verdünnte Phagen (10^{-5} bis 10^{-11}) wurden in einem Zentrifugenröhrchen durchmischt und auf einer 2x YT-Agar Petrischale ausplattiert. Die Platten inkubierten über Nacht bei 37 °C. Am darauffolgenden Tag konnte ein Volumen von 4 ml 2x YT-Medium + Kanamycin mit einem gepickten Plaque angeimpft werden. Mit 1 ml dieser Vorkultur wurde eine 50 ml 2x YT + Kanamycin Über-Nacht-Kultur angeimpft und weiter bei 37 °C kultiviert. Am Morgen des nächsten Tages wurde die Kultur bei 5000 rpm für 15 min zentrifugiert und das Bakterienpellet verworfen. Die sich im Überstand befindenden Bakteriophagen wurden mit PEG/NaCl für mindestens 1 h auf Eis gefällt. Mit einer Zentrifugation bei 10000 rpm für 10 min wurden die Phagen pelletiert und der Überstand verworfen. Die Phagenpellets trockneten für 5 - 10 min an der Luft und wurden anschließend in 500 µl PBS resuspendiert.

3.4.3. Titration des Helferphagen

Um den Titer der Helferphagen zu ermitteln wurde aus dem produzierten Stock zunächst eine 1:10 Verdünnungsreihe (10^{-1} bis 10^{-11}) in PBS vorbereitet. Dabei wurden 10 μ l aus dem Stock in 90 μ l PBS verdünnt. 100 μ l infektionsbereiter *E.coli* TG1 ($OD_{600\text{ nm}} = 0,5 - 0,7$) wurden zu den verdünnten Phagen gegeben (10^{-5} bis 10^{-11}), durchmischt und für 30 min bei RT inkubiert. Anschließend wurden 10 μ l der infizierten *E.coli* TG1 in einer Doppelbestimmung als Tropfen auf 2x YT-Agar + Kanamycin + Glukose gegeben. 10 μ l PBS und 10 μ l nicht-infizierter TG1 dienten als Negativkontrollen. Die Agar-Platten inkubierten über Nacht bei 37 °C. Am Morgen des nächsten Tages konnte der Titer anhand der gewachsenen Bakterienkolonien ermittelt werden.

$$\frac{\text{Phagen}}{\mu\text{l}} = CFU * F * V$$

Mit:

CFU = Anzahl der gezählten Kolonien

F = Verdünnungsfaktor

V = Volumen

3.4.4. Präparation der Antikörper-Phagenbank

Der klonierte und aufgereinigte Phagemid-Vektor wurde zunächst über eine Elektroporation in *E.coli* TG1 transformiert, auf (30 x 30) cm² LB-Agar + Ampicillin + Glukose Petrischalen ausplattiert und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Mit 200 μ l Glycerol-Stock der Antikörperbibliothek wurde 200 ml temperiertes 2x YT-Medium + Ampicillin + Glukose angeimpft und bis zu einer von $OD_{600\text{ nm}} = 0,5 - 0,7$ kultiviert. Die Kultur wurde auf vier 50 ml Zentrifugenröhrchen aufgeteilt und mit je $2,5 * 10^{12}$ Helferphagen M13K07 für 30 min bei 37 °C infiziert. Daraufhin zentrifugierte die Kultur bei 4000 rpm für 30 min bei RT. Anschließend wurde der Überstand verworfen und das Pellet in 200 ml vorgewärmtes 2x YT-Medium + Ampicillin + 0,1 % Glukose resuspendiert. Das weitere Vorgehen stimmt mit der Helferphagen-Präparation 3.4.2 überein.

3.4.5. Titration der Antikörper-Phagenbank

Die Titration der Antikörper-Phagenbank erfolgte nach der Beschreibung in 3.4.2, jedoch wurde Ampicillin statt Kanamycin als Selektionssystem und *E.coli* K12 ER2738 für die Infektion verwendet. Mit diesem Stamm können Kontaminationen durch eine vorhandene Tetrazyklinresistenz vermieden werden. Die Berechnung des Titers konnte mit der dort verwendeten Formel ermittelt werden.

3.5. Etablierung eines zellbasierten Selektionssystems

3.5.1. BRASIL-Verfahren

Das BRASIL-Verfahren (Biopanning and Rapid Analysis of Selective Interactive Ligands) stellt eine Methode dar, die es ermöglicht, zellgebundene Antikörper-Phagen von nicht gebundenen Antikörper-Phagen zu trennen. Sie basiert darauf, dass eine wässrige Phase durch eine lipophile Phase hoher Dichte zentrifugiert wird, wobei Zellen und gebundene Bakteriophagen aus der wässrigen in die dichte Phase übertreten können.

Alle nicht-zellgebundenen Bakteriophagen verbleiben in der wässrigen, weniger dichten Phase und können so über mehrere Selektionsrunden eliminiert werden. Anschließend können die Bakteriophagen in der hochdichten Phase durch die Infektion von Bakterien rückgewonnen, amplifiziert und für die nächste Selektionsrunde genutzt werden (Giordano *et al.*, 2001). Für jede Runde wurden $2 \cdot 10^6$ Zellen eingesetzt und mit einer 100 bis 1000-fach höheren Antikörper-Phagen-Anzahl in-

kubiert. Die Inkubation erfolgte in 1 ml 1 % BSA/PBS für 4 h auf einem Drehrad bei 4 °C. Nach der Inkubation wurde das Zell-Phagengemisch für 5 min bei 1500 rpm zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Zellpellet in 200 µl PBS resuspendiert. Anschließend wurden 200 µl des BRASIL-Öls mit 200 µl Zell-Phagensuspension in einem dünnen Mikroreaktionsgefäß überschichtet und für 10 min bei 10000 rpm und 4°C zentrifugiert. Darauffolgend musste die Zell-Phagensuspension für mindestens 1 h bei -80°C einfrieren. Danach konnte mit einem sterilen Skalpell die Spitze des Mikroreaktionsgefäßes oberhalb des Zellpellets abgeschnitten und durch mehrmaliges pipettieren in 500 µl infektionsbereiter *E. coli* K12 ER2738 resuspendiert werden. Die Infektion erfolgte für 30 min bei 37 °C. Die infizierten *E. coli* K12 ER2738 wurden in 1:100 und 1:1000 Verdünnungen auf 2x YT-Agar + Ampicillin Petrischalen ausplattiert. Am folgenden Tag konnte die Anreicherung anhand der gewachsenen Bakterienkolonien bestimmt werden.

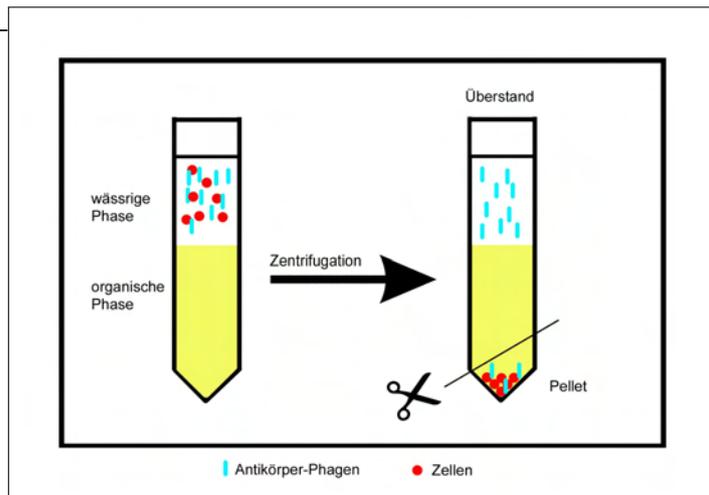


Abbildung 12: Schematische Übersicht des BRASIL-Verfahrens: Innerhalb der wässrigen Phase befinden sich die Zellen und Antikörper-Phagen. Die organische Phase besteht aus 90 % Dibutylphthalat und 10 % Cyclohexan (gelb) und wird von der wässrigen Phase vorsichtig überschichtet. Über eine Zentrifugation werden die Zellen mit gebundenen Antikörper-Phagen durch die organische Phase getrieben. Im Überstand befinden sich alle nicht gebundenen Antikörper-Phagen. Durch Abschneiden der Spitze des BRASIL-Röhrchens oberhalb des Pellets, können die Antikörper-Phagen gewonnen und für die Infektion von Bakterien genutzt werden. Bild: (Fabrice Viol, 2013)

3.5.2. Amplifikation der Antikörper-Phagen

10 ml 2x YT-Medium + Ampicillin wurden mit 500 µl infizierter *E. coli* K12 ER2738 aus der BRASIL-Zentrifugation angeimpft und für 3 h bei 200 rpm und 37 °C kultiviert. Im nächsten Schritt wurde die Kultur in ein 20 ml Zentrifugenröhrchen überführt und mit $2 * 10^{10}$ M13K07 Helferphagen für 30 min bei 37 °C superinfiziert. Anschließend zentrifugierte die infizierte Kultur bei 3000 rpm für 10 min. Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet in 10 ml 2x YT-Medium + Ampicillin + Kanamycin + 0,1 % Glukose resuspendiert. Die Amplifikation der Antikörper-Phagen erfolgte über Nacht bei 180 rpm und 30 °C.

3.5.3. Titration der selektierten Antikörper-Phagen

Die selektierten Antikörper-Phagen wurden ebenfalls nach der Beschreibung in 3.4.4 titriert. Mit den selektierten, reinen und titrierten Antikörper-Phagen konnte die nächste Selektionsrunde gestartet werden.

3.5.4. Bindungsassay gepickter Phageneinzelklone

Antikörper-Phagen, die sich an Myelomzellen angereichert haben, konnten in einem Einzelklonbindungsassay, welches dem BRASIL-Verfahren (Giordano *et al.*, 2001) angelehnt ist, näher untersucht werden. Die ausplattierten Bakterienkolonien nach der dritten Selektionsrunde wurden mit einer Pipettenspitze gepickt und 1 ml 2x YT-Medium + Ampicillin aspiriert. Die Phageneinzelklone inkubierten für 3 h bei 37 °C und 200 rpm im Schüttelinkubator. Die Kulturen wurden jeweils mit $2 * 10^8$ Helferphagen M13K07 für 30 min bei 37°C superinfiziert. Nachdem sie bei 3000 rpm für 10 min zentrifugiert wurden, kultivierte das resuspendierte Bakterienpellet in 10 ml 2x YT-Medium + Ampicillin + Kanamycin + 0,1 % Glukose über Nacht bei 30 °C und 180 rpm. Die weitere Aufreinigung erfolgte nach der Beschreibung in 3.5.3. Für das Bindungsassay wurden $2 * 10^6$ Zellen mit $2 * 10^8$ Phagen in 200 µl 1 % BSA/PBS für 10 min inkubiert. Anschließend überschichtete man 200 µl des BRASIL-Öls mit 200 µl der Zell-Phagensuspension. Als Kontrollzellen dienten PBMC's. Das weitere Vorgehen ist in 3.5.1 beschrieben

3.6. Etablierung eines Hochdurchsatz-Screenings zellselektiv bindender Phageneinzelklone

3.6.1. Hochdurchsatz-Amplifikation gepickter Phageneinzelklone

Für die Etablierung des Hochdurchsatz-Screenings wurde eine Amplifikation der Antikörper-Phagen im 96-Well-Format optimiert. Um ein erfolgreiches Screening bezüglich der Signalstärke des Fluoreszenz-Signals zu gewährleisten, ist ein hoher

Titer der Antikörper-Phagen äußerst wichtig. Für die Optimierung wurden entscheidende Parameter eines Standardprotokolls verändert und auf die Wirksamkeit hin getestet. Zunächst wurde eine Fab-Phagemid tragende *E. coli* K12 ER2738 Bakterienkolonie gepickt und in zehn Wells einer Mikrotiterplatte überführt, welche 200 µl LB-Medium + Ampicillin enthielt. Das letzte Well blieb als Kontrolle frei. Die Mikrotiterplatte wurde verschlossen und kultivierte über Nacht bei 37 °C und 200 rpm. Am darauffolgenden Tag wurde eine weitere Mikrotiterplatte mit jeweils 24 Wells 200 µl LB-Medium + Ampicillin vorbereitet. Mit jeweils 20 µl der Über-Nacht-Kulturen wurden die Wells angeimpft und für 3 h bei 37 °C und 200 rpm inkubiert. Nach der Inkubation wurde jeder Kultivierungsansatz mit $1 \cdot 10^9$ M13K07 Helferphagen für 30 min bei RT infiziert. Anschließend wurde die Platte verschlossen und 10 min bei 2500 rpm zentrifugiert. Nachdem der Überstand verworfen wurde, konnten folgende Kultivierungsbedingungen in einer Dreifach-Bestimmung angesetzt werden. (Schofield *et al.*, 2007).

Kultivierungsansätze im 96-Well-Format

	Standard	Optimiert	Volumen	Zeit	RPM	Medium	Glukose	O ₂
Volumen	200 µl	250 µl	250 µl	200 µl	200 µl	200 µl	200 µl	200 µl
Zeit	12 h	18 h	12 h	18 h	12 h	12 h	12 h	12 h
RPM	200	400	200	200	400	200	200	200
Medium	LB	2xYT	LB	LB	LB	2xYT	LB	LB
Glukose	0,1 %	0,5 %	0,1 %	0,1 %	0,1 %	0,1 %	0,5 %	0,1 %
O ₂	Nein	Ja	Nein	Nein	Nein	Nein	Nein	Ja

Tabelle 1: Kultivierungsbedingungen der 96-Well Phagenamplifikation: Jeder der sechs Kultivierungsansätze wurde mit einem veränderten Parameter angesetzt. Die Kultivierungsbedingungen wurden jeweils mit dem Standardprotokoll verglichen. Zusätzlich wurden alle veränderten Parameter in einem optimierten Kultivierungsansatz zusammengefasst und ebenfalls dem Standardprotokoll zum Vergleich entgegengehalten. Temperatur und Helferphagenkonzentration wurden nicht verändert, da Helferphagen stets im Überschuss dem Kultivierungsansatz hinzugegeben werden und 30 °C das Temperaturoptimum für die Expression der Phagen ist (Schofield *et al.*, 2007).

Alle Ansätze enthielten Ampicillin und Kanamycin, darüber hinaus diente in jeder Reihe ein Well mit LB-Medium als Kontrolle. Für die O₂-Kultivierungsansätze wurde ein kleines Loch in den Parafilm gestochen. Nach der Kultivierung wurde die Mikrotiterplatte für 10 min bei 2500 rpm zentrifugiert und die unreinen Phagenüberstände nach Beschreibung 3.4.4 titriert.

3.6.2. **Evaluierung des zellbasierten Fluoreszenz-ELISA**

Um Antikörper-Phageneinzelklone im Hochdurchsatz testen zu können, musste der zellbasierter ELISA zunächst bezüglich des Coatings der Zellen und der Inkubation mit den Phagen, evaluiert werden. Dabei wurden unterschiedliche Mengen an Zellen auf einer Mikrotiterplatte ausgesät und mit unterschiedlichen Konzentrationen an Phagen inkubiert. Da die Antikörper-Phagenbank an Myelomzellen angereichert wurde, musste eine Möglichkeit etabliert werden, um Suspensionszellen auf der Mikrotiterplatte zu coaten. Das Coating erfolgte über Poly-L-Lysin. Poly-L-Lysin ist ein synthetisches Molekül, das vor allem eingesetzt wird, um das Adhärenz verschiedener Zelltypen an Polystyrol-Oberflächen zu verbessern. Das negativ geladene, physikalisch behandelte Polystyrol erlangt durch die Beschichtung mit Poly-L-Lysin eine positive Ladung an der Oberfläche, wodurch viele Zelltypen, unter anderem auch Suspensionszellen, besser an dieser anheften können (Mazia *et al.*, 1975). 100 µl 0,01 % des Poly-L-Lysin wurde pro Well auf einer schwarzen 96-Well Mikrotiterplatte für 2 h bei RT inkubiert. Danach wurde die Platte ausgeklopft, für 10 min getrocknet und zweimal mit 1x PBS gewaschen. Ab diesem Zeitpunkt konnte die Platte bei 4 °C aufbewahrt werden. Für die Evaluierung wurden die Kontrollphagen TSMK3 als Positivphagen und R1 als Negativphagen eingesetzt. Als Positivzellen wurden CA46 eingesetzt und als Suspensionskontrollzellen Molp8. Alle Zellen wurden in Medium ohne Zusätze ausgesät und über Nacht bei 4 °C adhärenziert. Pro Well wurden $5 * 10^3$, $5 * 10^4$ und $5 * 10^5$ Zellen eingesetzt. Am nächsten Tag wurde die Mikrotiterplatte vorsichtig ausgeklopft und die Zellen mit Paraformaldehyd für 10 min fixiert. Kontrollphagen wurden in jeweils 10-, 100-, 1000-fach höheren Konzentration auf die Zellen gegeben und für 30 min inkubiert. Anschließend wurden die Wells zwei mal mit 1x PBS gewaschen. Für die Detektion kam ein biotinylierter Anti-fd-Antikörper und mit FITC konjugiertes Streptavidin zum Einsatz. Die Proben wurden mit einer Wellenlänge von 488 nm angeregt und die Emission bei 521 nm gemessen. Der Anti-fd-Antikörper bindet mit hoher Affinität an den Coat-Proteinen der M13-Phagen (ManualAntifdAntibody).

3.6.3. **Bindungsassay der Einzelklone mittels Fluoreszenz-ELISA**

Da der zellbasierte ELISA mit einem anderen Phagensystem evaluiert wurde, war es notwendig zusätzlich noch eventuell potenzielle Antikörper-Phagen zu screenen. Neun Antikörper-Phagen aus dem Einzelklonbindungassay wurden für die Wirksamkeit des zellbasierten ELISA's eingesetzt. Dabei wurden $5 * 10^5$ Myelomzellen ausgesät und mit $5 * 10^8$ Antikörper-Phagen inkubiert. Das weitere Vorgehen ist in 3.6.2 beschrieben.

4. Ergebnisse

4.1. Generierung Antikörper-Phagenbank

Die Generierung der Fab-Antikörper-Phagenbank erfolgte in einer sequenziellen Klonierung, welche einem besonderen Selektionssystem unterliegt. Diese Art von Klonierung verläuft unter Zuhilfenahme sogenannter „Suizid-Gene“. Das *ccdB*-Gen ist ein solches „Suizid-Gen“, dessen Genprodukt ein 101 Aminosäure langes Zytotoxin ist und mit der *E. coli* DNA-Gyrase interferiert (Bahassi *et al.*, 1995, Bernard *et al.*, 1993). Die Selektion basiert auf dem Austausch des *ccdB*-Gens gegen das einzubringende Gen (hier: Antikörper-Amplikons HC IgG und LC κ). Nur die Plasmide ohne *ccdB*-Gen oder mit der entsprechenden Resistenz können Kolonien bilden (Bernard *et al.*, 1994). Zunächst wurden die Antikörper-Amplikons HC IgG (CH1, VH) und LC κ (CL, VL) mit den Restriktionsenzymen *MluI*, *NcoI*, *NheI-HF* und *Sall-HF* verdaut. Simultan verdauten *MluI*, *NcoI* den Vektor pFB-Fab. Darauffolgend brachte man über eine Ligation das verdaute Antikörper-Amplikon HC IgG in den Vektor pFB-Fab ein. Dieser Ligationsansatz wurde über eine Elektroporation in *E. coli* DB3.1 transformiert und mittels einer Maxipräparation isoliert. Durch eine weitere Restriktion des Vektors mit *NheI-HF* und *Sall-HF* konnte das schon vorher verdaute Antikörper-Amplikon LC κ in den isolierten Vektor pFB-Fab + HC IgG ligiert und in *E. coli* DH10B transformiert werden. *E. coli* DH10B ist ein *ccdB*-sensitiver Bakterienstamm, welcher keine Bakterienkolonien zu bilden vermag, wenn dieser ein Plasmid mit einem *ccdB*-aktivem Gen enthält. *E. coli* DB3.1 ist dagegen ein *ccdB*-resistenter Bakterienstamm, der auf seinem Genom das Gen *gyrA462* trägt, exprimiert und die Resistenz vermittelt. (Bahassi *et al.*, 1999, CompetentCells).

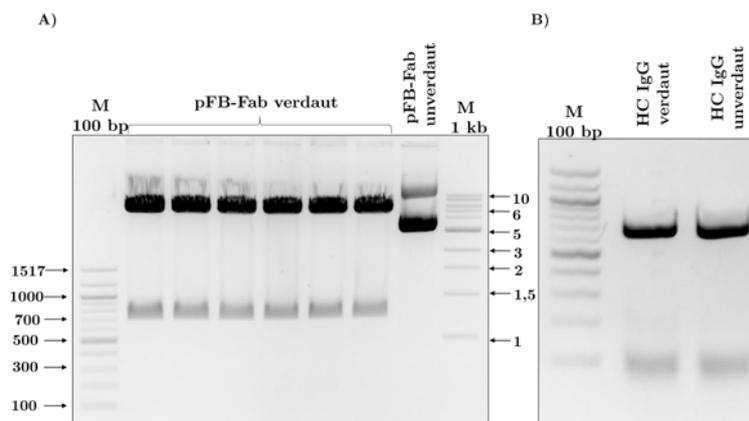


Abbildung 13: Agarosegelelektrophorese der verdauten DNA-Fragmente pFB-Fab und HC IgG: Es wurde eine Agarosekonzentration von 1 % in 1x TAE Puffer mit 1:1000 verdünntem Ethidiumbromid verwendet. **A)** Restriktionsverdau des Vektors pFB-Fab mit den Restriktionsenzymen *MluI* und *NcoI*: 20 μ g des Vektors wurden verdaut. Die siebte Tasche zeigt den unverdauten Vektor in drei Konformationen. Bei ca. 700 bp ist das herausgeschnittene *ccdB*-Gen zu erkennen. **B)** Restriktionsverdau des Antikörper-Amplikons HC IgG: 1 μ g des Inserts wurde ebenfalls mit *MluI* und *NcoI* verdaut und elektrophoretisch aufgetrennt. Das verdaute, sowie das unverdaute Insert, zeigen eine Bande bei ca. 700 bp.

Nachdem der Vektor bevor und nach der ersten Klonierung verdaut, dephosphoryliert und auf das Agarosegel geladen wurde, ließ sich etwas über den Erfolg der Restriktion aussagen. In Abbildung 13 ist die Restriktion der ersten Klonierung von pFB-Fab und HC IgG dargestellt. Der Unterschied zwischen verdaulichem und unverdaulichem Vektor ist deutlich zu erkennen. In jeder Laufbahn des verdaulichem Vektors ist, neben einer Bande bei ca. 5300 bp, ist eine weitere Bande bei 700 bp zu erkennen. Letztere ist das herausgeschnittene *ccdB*-Gen. Das unverdaute Plasmid zeigt drei Banden bei über 10 kb, bei ca. 6 kb und bei ca. 5 kb. Das Antikörper-Insert, welches auf gleiche Weise verdaulich wurde, zeigt im verdaulichem sowie unverdaulichem Zustand eine Bande bei ca. 700 bp. Nach erfolgreicher Restriktion wurden die verdaulichen DNA-Fragmente mit einem sterilen Skalpell herausgeschnitten und aufgereinigt.

$$c_{\text{pFB-Fab}} = 132,8 \text{ ng}/\mu\text{l}$$

$$c_{\text{pFB-Fab} + \text{HC IgG}} = 98,8 \text{ ng}/\mu\text{l}$$

$$c_{\text{HC IgG}} = 18,5 \text{ ng}/\mu\text{l}$$

$$c_{\text{LC}\kappa} = 15,4 \text{ ng}/\mu\text{l}$$

Die Darstellungen der Agarosegelelektrophorese der Restriktion des Vektors pFB-Fab + HC IgG und des Inserts LC κ sind in A.1 aufgeführt. Nach jeder Transformation wurden 10 Bakterienkolonien mit einer Kolonie-PCR auf den Erfolg der Klonierung überprüft.

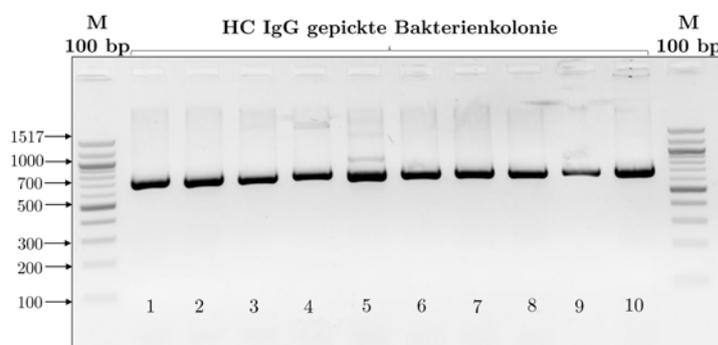


Abbildung 14: Kolonie-PCR des klonierten Antikörper-Inserts HC IgG: Es wurde eine Agarosekonzentration von 1 % in 1x TAE Puffer mit 1:1000 verdünntem Ethidiumbromid verwendet. 15 μl der amplifizierten PCR-Produkte wurden auf das Gel beladen. Die Kolonie-PCR erfolgte mit Pools degenerierter familien-spezifischer HC IgG-Primern. Es wurde ein 100 bp Marker verwendet.

In Abbildung 14 ist die Agarosegelelektrophorese der PCR-Produkte aus der Kolonie-PCR nach der ersten Klonierung und Transformation in *E. coli* DB3.1 dargestellt. Auf dem Gel sind zehn Banden bei ca. 700 bp zu erkennen. Diese Kolonie-PCR zeigt, dass alle gepickten Bakterienkolonien über einen erfolgreich klonierten Vektor verfügen. Zehn von zehn Bakterienkolonien sind positiv und tragen somit das Antikörper-Insert HC IgG. In Abbildung 15 ist die Agarosegelelektrophorese der

PCR-Produkte aus der Kolonie-PCR nach der letzten Klonierung und Transformation in *E.coli* DH10B dargestellt. Auf beiden Gelen sind sieben Banden bei ca. 700 bp zu erkennen und zusätzliche Banden bei ca. 80 bp, welche Primerdimere aus der PCR sind. Die Proben 2, 5 und 10 zeigen keine Bande bei 700 bp. Die gepickten Bakterienkolonien zeigen in sieben von zehn Fällen bezüglich der klonierten Antikörper-Inserts HC IgG und LC κ positive Ergebnisse. Dabei tragen die Bakterienkolonien entweder einen vollkommen erfolgreich klonierten Vektor oder einen ohne Antikörper-Inserts.

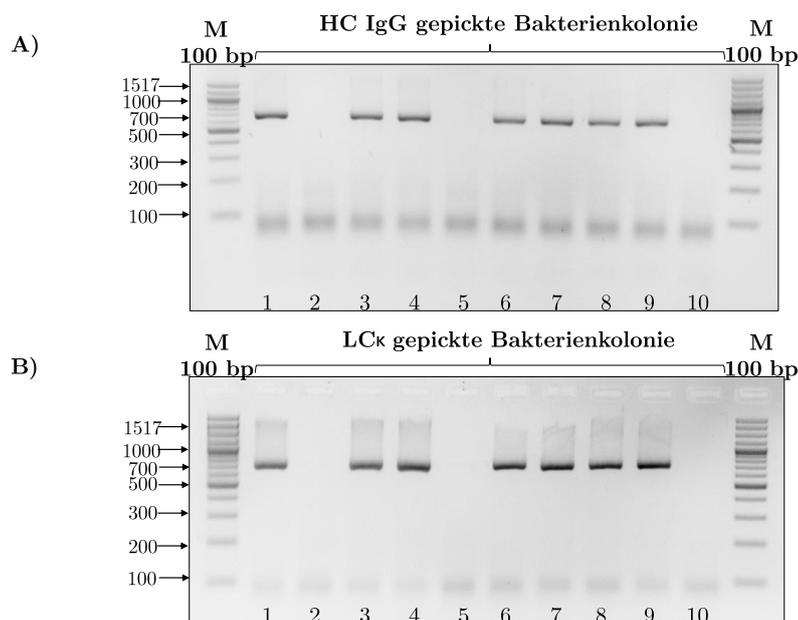


Abbildung 15: Kolonie-PCR der klonierten Antikörper-Inserts HC IgG und LC κ : Es wurde eine Agarosekonzentration von 1 % in 1x TAE Puffer mit 1:1000 verdünntem Ethidiumbromid verwendet. 15 μ l der amplifizierten PCR-Produkte wurden auf das Gel beladen. **A)** Kolonie-PCR gepickter Bakterienkolonien mit Pools degenerierter familien-spezifischer HC IgG-Primern. Es wurde ein 100 bp Marker verwendet. **B)** Kolonie-PCR gepickter Bakterienkolonien mit Pools degenerierter familien-spezifischer LC κ -Primern. Es wurde ein 100 bp Marker verwendet.

Nach jeder erfolgreichen Kolonie-PCR wurden die Bakterienkolonien gezählt und die Diversität bestimmt, indem die Transformanten pro μ g DNA berechnet werden. Zusätzlich ligierte und transformierte man einen verdauten, dephosphorilierten Vektor ohne Antikörper-Insert als Kontrolle und zur Abschätzung des Hintergrunds an nicht klonierten, religierten Vektoren (Schirrmann und Hust, 2010).

Diversitäten Antikörper-Phagenbank

	Diversität in CFU/ μ g DNA	Hintergrund in %
1. Klonierung	$1 * 10^5$	1
2. Klonierung	$4 * 10^4$	0,1

4.2. Etablierung eines zellbasierten Selektionssystems

4.2.1. Anreicherung selektierter Antikörper-Phagen an Myelomzellen

Die erfolgreich klonierte Antikörper-Phagenbank dient als Grundlage zur Etablierung des zellbasierten Selektionsverfahrens. Dabei wurden die Antikörper-Phagen über drei Selektionsrunden an unterschiedlichen Myelomzellen angereichert. Zur Anreicherung dienten die Myelomzelllinien: U266, KMS, RPMI und AMO1. Ab der zweiten Selektionsrunde wurden PBMC's als Kontrolle hinzugezogen, um eine Aussage über die myelomspezifische Anreicherung machen zu können (Baskar *et al.*, 2009). Phageninput, Phagenoutput und Titer nach Amplifikation sind tabellarisch in A.2.1 dargestellt.

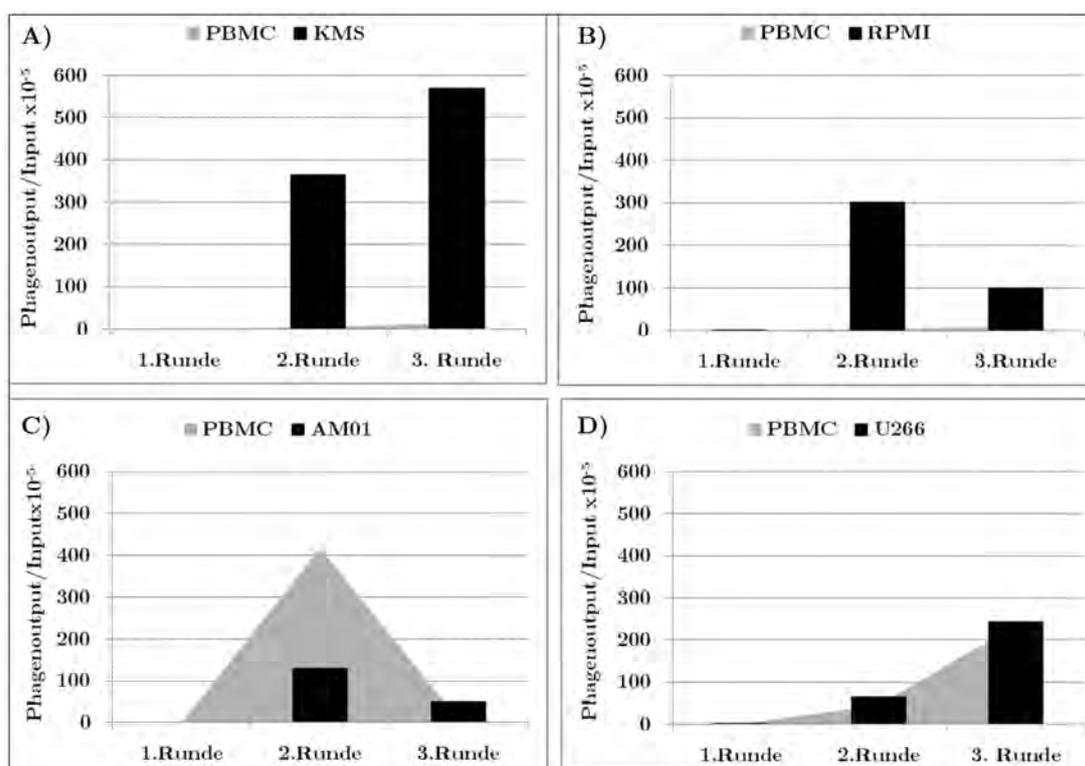


Abbildung 16: Anreicherung der Antikörper-Phagen an Myelomzelllinien über drei Selektionsrunden: Das Verhältnis von Phagenoutput zu Input ist über drei Selektionsrunden aufgetragen. Die infizierten Bakterien wurden in einer 1:100 und 1:1000 Verdünnung ausplattiert und anhand der gewachsenen Bakterienkolonien konnte der Output berechnet werden. In allen Selektionen wurde ab der zweiten Runde zusätzlich auf PBMC'S selektiert. **A)** Anreicherung der Antikörper-Phagen an KMS über drei Selektionsrunden. **B)** Anreicherung der Antikörper-Phagen an RPMI über drei Selektionsrunden. **C)** Anreicherung der Antikörper-Phagen an AMO1 über drei Selektionsrunden. **D)** Anreicherung der Antikörper-Phagen an U266 über drei Selektionsrunden.

In zwei von vier Fällen konnte eine Anreicherung der Antikörper-Phagen an den Myelomzelllinien erreicht werden, dabei zeigt die Selektion auf KMS eine eindeutige Anreicherung. Darüber hinaus konnten auch Antikörper-Phagen an den Zellen U266 selektiert werden, jedoch ist das Verhältnis von Phageninput zu Phagenoutput im Gegensatz zu KMS deutlich geringer. Bei den Selektionen der Myelomzelli-

nen AMO1 und RPMI sind deutliche Reduzierungen in der dritten Selektionsrunde hinsichtlich der Anreicherung zu erkennen. Ab der zweiten Selektionsrunde wurde bei allen Selektionen noch zusätzlich auf PBMC's selektiert. Dabei zeigen die angereicherten Antikörper-Phagen der Selektionen auf KMS und RPMI eine kaum messbare Reaktivität. Bei U266 dagegen ähnelt die Selektion auf PBMC's die der Myelomzelllinien. Die Reaktivität der selektierten Phagen mit dem PBMC's aus der AMO1-Selektion zeigt bei der zweiten Runde eine deutliche Anreicherung. Es reicherten sich in diesem Fall doppelt so viel Antikörper-Phagen an den PBMC's als an den Myelomzellen an. Da bei der Selektion der Antikörper-Phagenbank auf KMS die besten Ergebnisse erreicht worden waren und in diesem Fall auch eine myelomspezifische Anreicherung zu erkennen war, wurden Einzelklone nach der dritten Runde dieser Selektion gepickt und ihr Bindungsverhalten näher untersucht.

4.2.2. Bindungsassay gepickter Antikörper-Phageneinzelklone

Um die jeweilige Bindungscharakteristik der selektierten Antikörper-Phagen zu untersuchen, wurden 20 Klone nach der dritten Selektionsrunde auf KMS gepickt, amplifiziert und titriert. Diese Klone wurden auf ihre Bindungsaffinität gegenüber KMS näher untersucht. $2 \cdot 10^6$ Zellen wurden mit $2 \cdot 10^8$ Antikörper-Phageneinzelklonen inkubiert und alle nicht zellgebundenen Antikörper-Phagen über das BRAZIL-Verfahren eliminiert. Zusätzlich wurde das Bindungsverhalten der Klone auf PBMC's analysiert. Darüber hinaus wurde ein Antikörper-Phage aus der unselektierten Antikörper-Phagenbank ebenfalls mit KMS und PBMC's inkubiert.

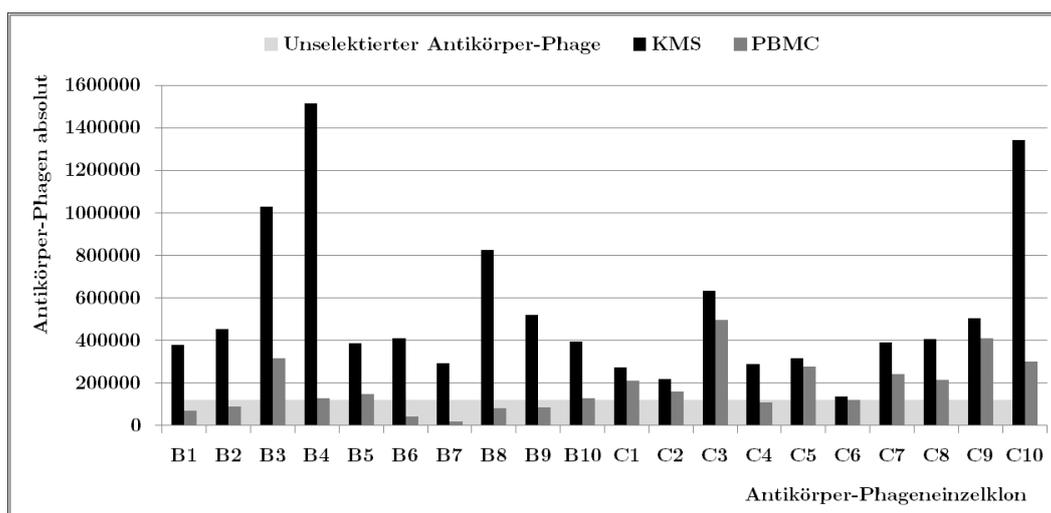


Abbildung 17: Einzelklonbindungsassay gepickter Antikörper-Phageneinzelklone nach der dritten Selektionsrunde auf KMS: $5 \cdot 10^5$ Zellen wurden jeweils mit $5 \cdot 10^8$ Phagen inkubiert. Der Phagenoutput wurde anhand der gewachsenen Bakterienkolonien nach der Brazil-Zentrifugation und Infektion von *E.coli* K12 ER2738 ermittelt. Schwarz dargestellt sind die gepickten Antikörper-Phagen aus der dritten Selektionsrunde auf KMS. In dunkelgrau ist die Inkubation der Antikörper-Phagen mit den PBMC's dargestellt. Der Antikörper-Phage aus der unselektierten Antikörper-Phagenbank zeigt sich als hellgrauer Hintergrund.

Es ist deutlich zu erkennen, dass die angereicherten Antikörper-Phagen eine höhere Reaktivität mit KMS im Vergleich zu den PBMC's zeigen. Dabei stechen die Klone B3, B4, B8 und C10 hervor. Werden die unselektierten Antikörper-Phagen mit den selektierten verglichen, wird erkenntlich, dass alle Klone bis auf C6 eine höhere Bindungseigenschaft besitzen. Diese Beobachtung spricht in erster Linie für eine erfolgreiche Selektion der Antikörper-Phagen auf den Myelomzellen. Den Phageoutput von KMS den PBMC's gegenübergestellt, kann in einigen Fällen eine myelomspezifische Bindung der Antikörper-Phagen beobachtet werden. Die Titer der Antikörper-Phageneinzelklone nach der Amplifikation sind in A.2.2 dargestellt.

4.3. Etablierung eines Hochdurchsatz-Screenings zellselektiv bindender Phageneinzelklone

4.3.1. Phagentiter nach der Hochdurchsatz-Amplifikation

Um Antikörper-Phagen nach abgeschlossener Selektionsrunde effektiv und im Hochdurchsatz screenen zu können, ist die Amplifizierung der Phageneinzelklone von großer Bedeutung. Denn für ein starkes Fluoreszenz-Signal müssen dementsprechend hohe Konzentrationen an Phagen eingesetzt werden. Aufgrund möglicher Unterschiede in der Expressionseffektivität der Phagen, wurde für die Optimierung in jedem Well der identische Antikörper-Phage eingesetzt.

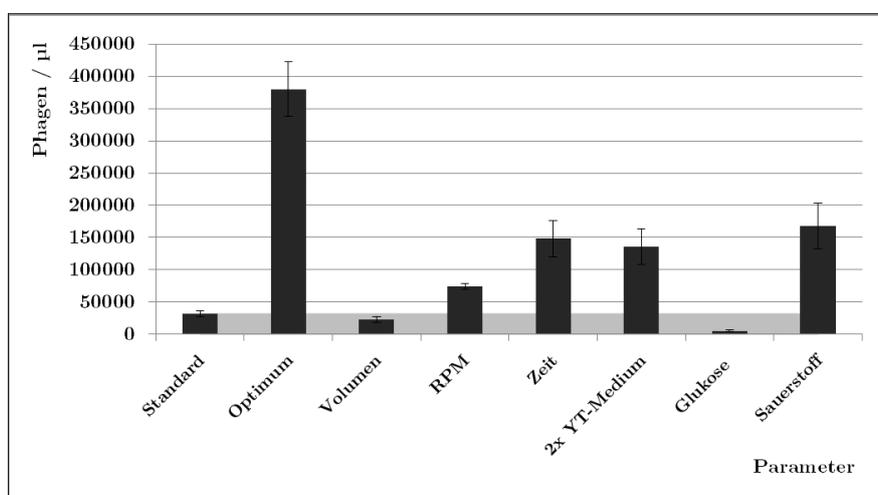


Abbildung 18: Optimierung der Hochdurchsatz-Amplifikation der Antikörper-Phagen: Dargestellt ist der Phagentiter pro µl der jeweils veränderten Parameter. In jedem Fall wurden die infektiösen *E. coli* K12 in den Wells mit 1×10^9 M13K07 Helferphagen infiziert und bei 30 °C amplifiziert. Die Optimierung bezog sich dabei auf die Veränderung des Volumens, der Drehzahl, der Zeit, dem Medium, der Glukosekonzentration und der Zufuhr von Sauerstoff. Der graue Hintergrund ist der zu erreichende Phagentiter nach Standardprotokoll. Der Phagentiter wurde in einer Dreifach-Bestimmung über eine Titration bestimmt.

Bei der Betrachtung der einzelnen Parameter im Hinblick auf das Standardprotokoll, so wird ersichtlich, dass die Drehzahl, die Zeit, das Medium und der Sauerstoff eine wesentliche Rolle bei der Amplifizierung der Phagen spielt. Es ist zu erkennen, dass die Zufuhr von Sauerstoff in dem Well einen großen Einfluss auf das Wachstum der Zellen ausübt. Darüber hinaus zeigt das Experiment, dass auch die Wahl eines geeigneten Mediums für die Phagenproduktion von großer Bedeutung ist. Verlängert man die Amplifizierung, entspricht dies der Vermutung einer höheren Ausbeute. Vergleicht man die Drehzahl mit dem Standardprotokoll, so zeigt sich, dass auch diese einen Einfluss auf den Kultivierungserfolg ausübt. Wird die Glukosekonzentration im Kultivierungsansatz geändert, führt dies zu einer Verminderung des Phagentiters. Die Erhöhung des Volumens wirkt sich prima facie nicht auf die Konzentration der Phagen aus. Durch die Zusammenfassung aller veränderten Kultivierungsbedingungen in einem Optimum, ist eine deutliche Steigerung des Phagentiters möglich.

4.3.2. Evaluierung des zellbasierten Fluoreszenz-ELISA

Um ein erfolgreiches Auslesen mit geeigneter Intensität des Fluoreszenz-Signals zu gewährleisten, wurde der zellbasierte Fluoreszenz-ELISA zunächst mit Kontrollphagen evaluiert. Der spezifische Phage TSMK3 als Positivkontrolle entstammt einer randomisierten X12 Peptidphagenbank der Firma NEB. Dieser wurde auf der Burkitt Lymphomzelllinie CA46 selektiert und bindet mit hoher Affinität am B-Zell-Rezeptor auf der Oberfläche dieser Zellen. Der Phage R1 entstammt ebenfalls einer randomisierten Peptidphagenbank, wurde aber nicht selektiert und dient somit als Negativkontrolle. Beide Phagen wurden für die Evaluierung zur Verfügung gestellt. Das Coaten der Suspensionzellen auf den schwarzen Mikrotiterplatten erfolgte über 0,01 % Poly-L-Lysin in einem Arbeitsvolumen von 100 μ l.

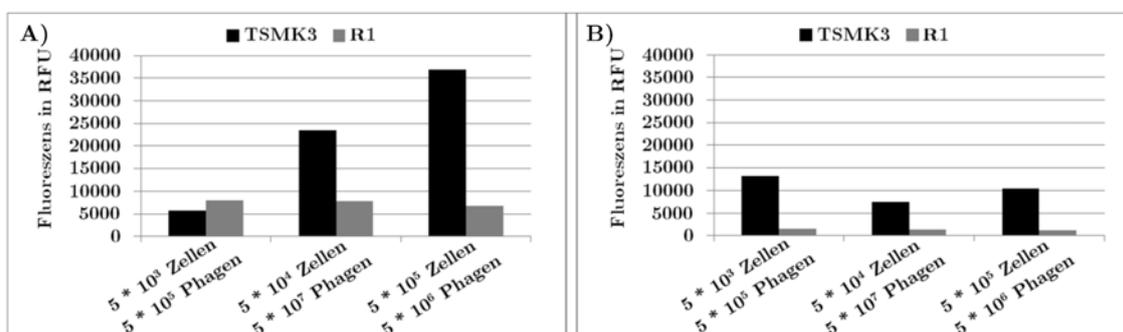


Abbildung 19: Evaluierung des zellbasierten Fluoreszenz-ELISA mit Kontrollphagen TSMK3 und R1: Es wurden jeweils $5 \cdot 10^3$, $5 \cdot 10^4$ und $5 \cdot 10^5$ Zellen ausgesät und mit $5 \cdot 10^6$, $5 \cdot 10^7$ und $5 \cdot 10^8$ Phagen inkubiert. Die Detektion der gebundenen Phagen an den Zellen erfolgte über einen 1:1000 verdünnten, biotinylierten Anti-fd-Antikörper und mit FITC gelabeltem Streptavidin. Die Proben wurden mit einer Wellenlänge von 488 nm angeregt und die Emission bei 521 nm in Relative Fluorescence Units gemessen. **A)** Inkubation der Kontrollphagen TSMK3 und R1 auf der Burkitt Lymphomzelllinie CA46. **B)** Inkubation der Kontrollphagen TSMK3 und R1 auf der Myelomzelllinie Molp8 als Suspensionskontrollzellen.

In Abbildung 19 A) ist die Inkubation der Phagen auf der CA46-Zelllinie dargestellt, welche zur Ermittlung geeigneter Konditionen und Verhältnisse bezüglich der Konzentration der Zellen und Phagen dient. Das Fluoreszenz-Signal des spezifisch bindenden TSMK3-Phagen besitzt in Abhängigkeit zur eingesetzten Zell- und Phagenkonzentration einen positiv linearen Verlauf. Je mehr Phagen man auf gecoateten Zellen inkubiert, desto höher ist das Signal der gemessenen Emission. Der R1-Phage als Negativkontrolle zeigt über jede eingesetzte Konzentration ein vergleichbar geringes Fluoreszenz-Signal. Aus dem Experiment geht eindeutig hervor, dass ab einer Zellzahl von $5 \cdot 10^5$ und einer Phagenanzahl von $5 \cdot 10^8$ ein erkennbar differenziertes Signal zwischen Bindung des Phagen an den Zellen und keine, beziehungsweise nur eine schwache Bindung zu messen ist. Auf den Suspensionskontrollzellen Molp8 in Abbildung 19 B) kann der R1-Phage, unabhängig von den Konzentrationen, kaum noch detektiert werden. Das Fluoreszenz-Signal des TSMK3-Phagen ist höher, aber hinsichtlich der eingesetzten Konzentrationen vergleichbar konstant und gering.

4.3.3. Bindungsassay der Einzelklone mittels Fluoreszenz-ELISA

Die vorausgegangene Evaluierung des Fluoreszenz-ELISA mit den Peptidphagen TSMK3 und R1 bildet ausschließlich eine Grundlage für die Etablierung des Fluoreszenz-ELISA zum Screening von zellselektiv bindenden Antikörper-Phagen. X12 Peptidphagen exprimieren ein aus 12 zufällig kombinierten Aminosäuren bestehendes Peptid auf ihrer Oberfläche (Binder *et al.*, 2006). Fab-Antikörper-Phagen dagegen exprimieren das Fab-Fragment eines Antikörpers auf ihrer Oberfläche (Schirrmann *et al.*, 2011). Es ist zu vermuten, dass sich die Bindungseigenschaft zwischen den unterschiedlichen Formaten der Phagen unterscheidet und es nicht möglich ist, Ergebnisse zu übertragen. Aus diesem Grund und um die Wirksamkeit des ELISA's testen zu können, wurden noch zusätzlich potentielle zellbindende Antikörper-Phagen aus dem Einzelklonbindungsassay mit dieser Methode gescreent. $5 \cdot 10^5$ KMS und PBMC's wurden mit $5 \cdot 10^8$ Antikörper-Phagen inkubiert. Zusätzlich wurden $5 \cdot 10^8$ der Peptidphagen TSMK3 und R1 mit $5 \cdot 10^5$ CA46 Zellen als Kontrollen inkubiert.

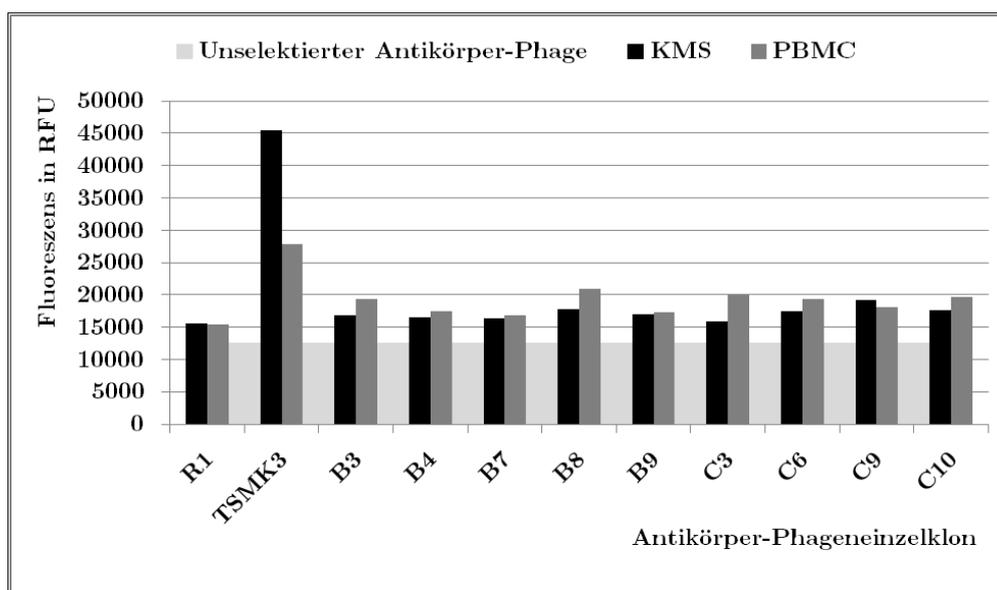


Abbildung 20: Fluoreszenz-ELISA der Antikörper-Phagen auf KMS und PBMC's: Es wurden jeweils $5 \cdot 10^5$ Zellen der Linien KMS und CA46 ausgesät und mit $5 \cdot 10^8$ Phagen inkubiert. Zusätzlich wurden die Antikörper-Phagen auf PBMC's inkubiert. Darüber hinaus ist ein unselektierter Antikörper-Phage auf den Zellen KMS gescreent worden. Die Detektion der gebundenen Phagen an den Zellen erfolgte über einen 1:1000 verdünnten, biotinylierten Anti-fd-Antikörper und mit FITC gelabeltem Streptavidin. Die Proben wurden mit einer Wellenlänge von 488 nm angeregt und die Emission bei 521 nm in Relative Fluorescence Units gemessen. .

Aus dem Screening der selektierten Antikörper-Phageneinzelklone in Abbildung 20) geht kein eindeutiges Ergebnis hervor. Die Bindungscharakteristik der einzelnen Antikörper-Phagen unterscheidet sich nicht in ihrer Intensität. Sie werden alle ungefähr im gleichen Maß detektiert. Auch die potentiellen Binder B3, B4, B8 und C10 aus dem Einzelklonbindungsassay in 4.2.2 unterscheiden sich nicht in ihrer Bindung

zu den anderen gescreenten Antikörper-Phagen. Darüber hinaus werden in allen Fällen mehr Antikörper-Phagen auf den PBMC's detektiert. Auch der unselektierte Antikörper-Phage, der als hellgrauer Hintergrund dargestellt ist, zeigt ein vergleichbar ähnliches Fluoreszenz-Signal. Der spezifische Peptidphage TSMK3 zeigt die höchste Fluoreszenz-Intensität auf CA46 und bestätigt das Ergebnis aus 4.3.2. Das Fluoreszenz-Signal des R1-Phagen besitzt ungefähr die gleiche Intensität wie die der selektierten Antikörper-Phagen.

5. Diskussion

5.1. Generierung Antikörper-Phagenbank

Die Generierung einer Antikörper-Phagenbank, die das B-Zell-Antikörperrepertoire als Fab-Fragment auf der Oberfläche von Bakteriophagen exprimieren, ist in erster Linie eine äußerst innovative Technologie, die es ermöglicht einen Antikörper gegen fast jedes Target zu generieren. Dabei spielt es keine Rolle, ob das Target als lösliches Protein vorkommt oder auf der Oberfläche von Zellen exprimiert wird (Smith und Petrenko, 1997, Pande *et al.*, 2010). Für die Generierung solcher Fab-Antikörper-Phagenbanken, muss jedoch ein gesteigerter Klonierungsaufwand betrieben werden, da zwei ca. 700 bp lange Antikörpergene unabhängig voneinander in den Phagemid-Vektor kloniert werden müssen. Das Ziel einer solchen schrittweisen Generierung ist eine sehr hohe Diversität der Bibliothek. Da jedoch die Klonierungen, speziell die Restriktionen der Antikörpergene, oft mit Problemen verbunden ist, kann die maximale Diversität der Antikörper-Phagenbank nicht erreicht werden. Die Diversität der generierten Antikörper-Phagenbank von $4 * 10^4$ Transformanten/ μg DNA ist vergleichbar gering. (Wu *et al.*, 2001), (Baskar *et al.*, 2009), (Schirrmann und Hust, 2010) und (Schmiedl und Dübel, 2004) erreichen Diversitäten im Bereich von 10^6 bis 10^8 Transformanten/ μg DNA. Wie schon erwähnt, können die Restriktionen der Antikörpergene problematisch sein, da die Gene exonukleatisch verdaut werden und der Erfolg dieser Restriktion nur schwer abschätzbar ist. Weitere Schwierigkeiten können während der Restriktion des Vektors auftreten. Es ist äußerst wichtig, dass die Vektoren in der anschließenden Aufreinigung über eine lange Zeit im elektrischen Feld wandern. Dabei ist zu beachten, dass als Kontrolle bei unverdauten Vektoren die entspannt zirkuläre, die superspiralisierte und die Konformation des Einzelstrangbruchs zu erkennen ist. Das erleichtert das Erkennen und Ausschneiden des vollständig verdauten Vektors. In beiden Restriktionen kann von einem erfolgreichen Verdau des Vektors gesprochen werden. Ein weiterer Grund für eine verminderte Diversität könnte das Ausgangsmaterial der synthetisierten cDNA sein. Für die Antikörper-Phagenbank wurden aus Blut isolierte PBMC's verwendet. Die mRNA dieser PBMC's wurde in cDNA umgeschrieben. IgG-

Antikörpergene wurden mit degenerierten familien-spezifischen IgG-Primern amplifiziert und um die Restriktionsschnittstellen elongiert. Da die spezialisierten, reifen IgG-sezernierenden B-Zellen hauptsächlich im Lymphsystem lokalisiert sind, die verwendeten B-Zellen jedoch aus den PBMC's des Vollbluts der Patienten gewonnen wurden, könnte dies eine mögliche Ursache für eine reduzierte Diversität der IgG-Antikörpergene sein. Darüber hinaus lassen sich die Antikörpergene mit den Pools an Primern unterschiedlich erfolgreich amplifizieren. Um eine genaue Aussage über die zu erreichende Diversität der klonierten Antikörper-Phagenbank zu machen, könnte das Next-Generation-Sequencing eine mögliche Methode darstellen. Dabei müsste die synthetisierte cDNA mit ausreichender Tiefensequenzierung sequenziert werden, was eine Aussage über die Gendiversität des Gedächtnis- und Plasmazell Antikörperrepertoires ermöglicht (Shyr und Liu, 2013, Guan *et al.*, 2012). Ferner wäre eine Optimierung des Selektionssystems sinnvoll, da die *ccdB*-Gene in etwa die gleiche Größe, wie die zu klonierenden Fab-Antikörper-Gene haben. Daraus resultiert eine aufwändige Überprüfung (Kolonie-PCR), ob entsprechende Antikörper-Gene im Vektor enthalten sind. Wären die „Suizid-Gene“ deutlich von den Antikörper-Genen in ihrer Größe zu unterscheiden, würde eine schnellere und weniger aufwändigere Restriktionsanalyse in Frage kommen. Ein Selektionssystem, welches sich das *Barnase*-Gen (Yazynin *et al.*, 1996) zu Nutze macht, könnte an dieser Stelle eine geeignete Lösung darstellen. Für die Etablierung des Hochdurchsatzverfahrens reicht die klonierte Antikörper-Phagenbank mit entsprechender Diversität jedoch aus.

5.2. Etablierung eines zellbasierten Selektionssystems

Das verwendete BRASIL-Verfahren für die Etablierung der zellbasierten Selektion, stellt eine äußerst elegante Möglichkeit dar, zellgebundene Phagen von nicht gebundenen Phagen zu trennen. Die BRASIL-Methode eignet sich vor allem für das sogenannte „Whole-Cell-Panning“, bei der die Phagen auf extrazelluläre Membranproteine selektiert werden. (Siva *et al.*, 2008) Diese Membranproteine können einerseits tumorassoziiert sein, das heißt sie tragen zur Funktion, z.B der Proliferation, der Tumorzelle bei (Huber *et al.*, 2008, Engert. *et al.*, 2007) und andererseits können sie ein natives Membranprotein, welches eine physiologische Funktion der Zelle übernimmt, sein. In den Experimenten konnte gezeigt werden, dass mit dieser Methode eine myelomspezifische Anreicherung der Antikörper-Phagen zu erreichen ist. Dabei können die Antikörper-Phagen als polyklonales Gemisch selektiert oder als Einzelklone, zur Untersuchung der Bindungscharakteristik, verwendet werden. Die Anreicherung der Antikörper-Phagen an den unterschiedlichen Myelomzelllinien erfolgte über drei Runden, wobei ab der zweiten Runde PBMC's hinzugezogen wurden. In drei von vier Fällen ist eine deutlich höhere Reaktivität der Antikörper-Phagen an den Mye-

lomzelllinien als an den PBMC's zu erkennen. Da die Antikörper-Phagenbank aus der mRNA isolierter PBMC's eines Myelompatienten generiert wurde und dieser im Laufe seiner Krebserkrankung eine mögliche Anti-Myelom-Immunantwort entwickelt haben könnte, ist die Wahrscheinlichkeit sehr hoch, dass innerhalb des Antikörperrepertoires der Antikörper-Phagenbank spezifisch Myelomzellen bindende Fab-Antikörper enthalten sind. Dies ist ein Grund, weshalb die Reaktivität der Antikörper-Phagen mit den Myelomzellen wesentlich höher ist, als die der PBMC's. In Abbildung 16 C) und D) ist auch eine eindeutige Anreicherung der PBMC's zu erkennen, die in Abbildung 16 C) ab der dritten Runde wieder abfällt, in Abbildung 16 D) jedoch steigt. Während der Vorbereitung der PBMC's, speziell nach der Zentrifugation und Resuspendierung in 1 % BSA/PBS, konnte oft eine Koagulation der Zellen beobachtet werden. Dieser Fall war zumeist mit einem höheren Output an gebundenen Antikörper-Phagen auf den PBMC's assoziiert. In Abbildung 16 B) und C) sinkt der Output der Antikörper-Phagen in der dritten Selektionsrunde. Ein mögliche Ursache könnte das BRASIL-Öl sein, welches aus den toxischen Komponenten Dibutylphthalat und Cyclohexan besteht. Es musste sehr genau darauf geachtet werden, dass beim Abschneiden des Pellets kein Öl zurückfließt, durch welches das Pellet kontaminiert worden wäre und somit die Antikörper-Phagen zerstört. Nach erfolgreichen Anreicherungen, konnten Antikörper-Phageneinzelklone gepickt und amplifiziert werden. Die Bindungseigenschaften dieser 20 Einzelklone konnten ebenfalls mit dem BRASIL-Verfahren untereinander verglichen werden. Um eine Aussage über eine myelomspezifische Bindung machen zu können, wurde in diesem Fall ebenfalls die Bindung der Antikörper-Phagen auf den PBMC's untersucht. In den meisten Fällen war die Bindung der Phagen auf den Myelomzellen höher, dabei sind die Antikörper-Phageneinzelklone B3, B4, B8 und C10 mit einer deutlich höheren Reaktivität hervorzuheben.

Anreicherung der Antikörper-Phagen in %

	B3	B4	B8	C10
KMS	0,52	0,76	0,41	0,67
PBMC's	0,044	0,065	0,041	0,15

Tabelle 2: Prozentualer Anteil des Antikörper-Phagenoutputs am Phageninput: Gegenüber gestellt sind die Antikörper-Phagen B3, B4, B8 und C10 aus dem Einzelklonbindungsassay bezüglich ihrer Anreicherung auf KMS und PBMC's. $2 \cdot 10^8$ Phagen wurden mit den Zellen inkubiert und der prozentuale Anteil des Phagenoutput vom Phageninput berechnet.

Wird der prozentuale Anteil der gebundenen Phagen an den Zellen vom Phageninput berechnet, ist dieser in keinem Fall höher als 1 %. Das bedeutet, dass ca. 99 % der eingebrachten Antikörper-Phagen nicht an den Zellen binden. Jedoch ist ein Unterschied zwischen der prozentualen Anreicherung der Antikörper-Phagen auf

KMS zu den PBMC's zu erkennen. Mögliche Gründe für das Ergebnis könnte eine unglückliche Auswahl der Phageneinzelklone sein. Daher sollten weitere Selektionsrunden in Erwägung gezogen werden, sodass mehr selektive Phagen vorhanden sind. Ferner könnte auch in diesem Fall das BRASIL-Öl beim Abscheiden des Pellets seine toxische Wirkung auf die Phagen ausgeübt haben.

5.3. Etablierung eines Hochdurchsatz-Screenings zellselektiv bindender Phageneinzelklone

Das Hochdurchsatz-Screening zellselektiv bindender Phageneinzelklone konnte nur teilweise erfolgreich etabliert werden. Die Optimierung der Hochdurchsatz-Amplifikation der Antikörper-Phagen ist jedoch effektiv verbessert worden. Durch die Veränderung einiger Kultivierungsbedingungen konnten die Titer der Antikörper-Phagen um ca. das sechsfache gesteigert werden. Dabei sind folgende Parameter hervorzuheben: Durch Zufuhr von Sauerstoff in das Well ist der Wachstumsertrag der Bakterien deutlich gestiegen und die Expression der Phagen wurde somit verbessert. Im Standardprotokoll wurde die 96-Well-Mikrotiterplatte verschlossen und die Zellen wurden dadurch mit weniger Sauerstoff versorgt. Verlängert man die Kultivierung um sechs Stunden, übt sich dies ebenfalls positiv auf den Ertrag der Phagen aus. Die Kultivierungsdauer ist jedoch begrenzt, da durch die Limitierung des Substrats die sehr proteinogenen Phagen als Energiequelle für die Bakterien dienen können. Wird die Drehzahl erhöht, kommt es zur einer besseren Durchmischung des Substrats und des gelösten Sauerstoff. Zusätzlich hat die Wahl des Mediums einen entscheidenden Einfluss auf den Phagentiter. 2x YT-Medium ist doppelt konzentriertes Bakterienvollmedium, welches einen hohen Anteil an Aminosäuren, Vitaminen und Nukleotiden enthält, weshalb die Bakterien es nicht selbst synthetisieren müssen. Das ermöglicht einen hohen Ertrag an Bakteriophagen ohne massive Zerstörung der Bakterien. Auch die Erhöhung des Volumens steigert die Menge an Phagen. In Abbildung 18) ist die Konzentration der Phagen pro μl angegeben. Vergleicht man die Phagen absolut bei höherem Volumen, stellt sich auch dieses als doppelt so hoch wie der Standardvolumen heraus. Wird die Glukosekonzentration jedoch erhöht, kommt es zu einer Reduzierung des Titors. Da die Expression der Phagen, speziell die Antikörpergene und das Coat-Protein, vom Lac-Promotor gesteuert werden, kommt es bei erhöhter Anwesenheit von Glukose zu einer Hemmung der Expression (Inada *et al.*, 1996). Fasst man alle optimierten Kultivierungsbedingungen zusammen, kann eine erhebliche Steigerung des Phagen-Titors erreicht werden.

Die Etablierung des zellbasierten Fluoreszenz-ELISA war nur teilweise erfolgreich, da Antikörper-Phagen im Screening nicht detektiert werden konnten. Zunächst ist die Evaluierung mit den spezifischen Peptidphagen nur teilweise auf die Antikörper-Phagen übertragbar und diente deshalb in erster Linie zur Evaluierung des Coatings

der Suspensionszellen. Da die Suspensionzellen nicht auf Oberflächen adhären, mussten sie zunächst mit Poly-L-Lysin an die Oberfläche der Mikrotiterplatte coated werden. Dabei wurde festgestellt, dass hohe Zellzahlen mit einer besseren Detektion der Peptidphagen einhergingen. Das Coating der Zellen war problematisch, da schwarze Mikrotiterplatten verwendet werden mussten und diese es nicht ermöglichen, einen Monolayer an Zellen zu erkennen. Da durch das Waschen der Zellen der Monolayer aufgebrochen werden kann, wäre es an dieser Stelle sinnvoll eine Mikrotiterplatte zu verwenden, die es ermöglicht die Zellen unter einem Lichtmikroskop zu beobachten. Darüber hinaus sollten Kontrollphagen verwendet werden, die dem Konstrukt der Fab-Antikörper-Phagen gleich sind. Dazu könnte man die CH1- und VH-Regionen der schweren Kette und die CL- und VL-Regionen der leichten Kette eines therapeutischen Antikörpers in den Phagemidvektor pFB-Fab klonieren und in M13-Phagen verpacken. Der therapeutische Antikörper Cetuximab und eine EGFR-positive Zelllinie könnten an dieser Stelle eine geeignete Lösung darstellen (Humblet, 2004). Die selektierten Antikörper-Phagen konnten in dem zellbasierten Fluoreszenz-ELISA kaum detektiert werden. Das könnte einerseits an ihrer geringen Bindungsaffinität gegenüber den Zellen (5.2) begründet liegen oder andererseits an der Sensitivität des Systems, da auch der spezifische Phage TSMK3 vergleichbar gering detektiert wird. Europium gelabelte Detektions-Antikörper weisen eine äußerst hohe Detektionssensitivität auf. Eine direkte Detektion durch einen Europium gelabelten Anti-M13-Antikörper könnte einen gewünschten Erfolg bringen. Aufgrund der erhöhten Problematik, stellen die Ergebnisse nur einen Ansatz für das Hochdurchsatz-Screening dar.

6. Zusammenfassung

Die Phage-Display-Technologie ist eine äußerst innovative technische Methode, um Fab-Antikörper (oder scFv, dsFv) exprimierende Bakteriophagen gegen fast jedes Target zu isolieren. Dabei können die Antikörper-Phagen direkt gegen ein Antigen selektiert werden oder auf Targets, welche auf der Oberfläche von Zellen exprimiert werden. Für die Etablierung des Hochdurchsatzverfahrens zum zellbasierten Screening von Antikörper-Phagenbanken wurden zunächst die CH1 und VH-Regionen der schweren Kette IgG und die CL und VL-Regionen der leichten Kette κ verdaut und in einer sequenziellen Klonierung in den Phagemidvektor pFB-Fab eingebracht. Dabei spielt die Diversität des Antikörperrepertoires der Phagenbank eine wesentliche Rolle. War die Klonierung erfolgreich, wurde der Fab-Phagemidvektor in *E. coli* TG1 transformiert. Um das Fab-Fragment auf der Oberfläche der Phagen zu exprimieren, wurden diese mit dem Helferphagen M13K07 infiziert, amplifiziert, aufgereinigt und titriert. Anschließend wurde die präparierte Antikörper-Phagenbank über drei Runden an unterschiedlichen Myelomzelllinien angereichert. Aus der besten Selektion wurden 20 Antikörper-Phageneinzelklone gepickt, amplifiziert, titriert und ihre Bindungscharakteristik näher untersucht. Antikörper-Phagen, die als potenzielle Binder aus dem Assay hervorgegangen sind, dienten ferner der Etablierung des zellbasierten Fluoreszenz-ELISA. Mit diesem können eine hohe Anzahl an selektierten Antikörper-Phagen gescreent werden. Für das Screening musste zunächst die Amplifikation der Antikörper-Phageneinzelklone im 96-Well-Format optimiert werden. Für diese Optimierung wurden entscheidende Kultivierungsbedingungen verändert. Ferner wurden diese in einem optimiertem Ansatz zusammengefasst und die erreichten Titer dem Standardprotokoll zum Vergleich entgegengehalten. Dabei konnte der Titer der Antikörper-Phagen um das sechsfache gesteigert werden. Für die Bestimmung der geeigneten Screening-Konditionen wurden mit Hilfe evaluierter X12 Peptidphagen unterschiedliche Zellzahlen mit unterschiedlichen Mengen an Phagen inkubiert und gescreent. Dabei mussten die Suspensionzellen vorerst mit 0,01 % Poly-L-Lysin auf einer Mikrotiterplatte gecoatet werden. Mit diesen ermittelten Konditionen wurden noch zusätzlich potenzielle Antikörper-Phagen aus dem Einzelklonbindungsassay gescreent.

Diese Bachelor Thesis stellt einen Ansatz dar, der es ermöglicht, Antikörper-Phagenbanken, die aus der mRNA isolierter PBMC's von Myelompatienten generiert werden, im Hochdurchsatz zu screenen. Dabei kann die etablierte, technische Methode die Grundlage für die Isolierung eines therapeutischen Antikörpers gegen das Multiple Myelom und vergleichbare, bösartige Erkrankungen bilden.

Literaturverzeichnis

- [ManualAntifdAntibody] *Anti-fd Bacteriophage Developed in Rabbit IgG Fraction of Antiserum*
- [CompetentCells] *Library Efficiency DB3.1 Competent Cells*
- [Abbas 2005] ABBAS, A. K. ; SAUNDERS, W. (Hrsg.): *Cellular and Molecular Immunology*. 5. W.B. Saunders Company, 2005
- [Bahassi et al. 1999] BAHASSI, E. M. ; O'DEA, M. H. ; ALLALI, N. ; MESSENS, J. ; GELLERT, M. ; COUTURIER, M.: Interactions of CcdB with DNA gyrase. Inactivation of Gyra, poisoning of the gyrase-DNA complex, and the antidote action of CcdA. In: *J Biol Chem* 274 (1999), Apr, Nr. 16, S. 10936–10944
- [Bahassi et al. 1995] BAHASSI, E. M. ; SALMON, M. A. ; MELDEREN, L. V. ; BERNARD, P. ; COUTURIER, M.: F plasmid CcdB killer protein: ccdB gene mutants coding for non-cytotoxic proteins which retain their regulatory functions. In: *Mol Microbiol* 15 (1995), Mar, Nr. 6, S. 1031–1037
- [Baskar et al. 2009] BASKAR, S. ; SUSCHAK, J. M. ; SAMIJA, I. ; SRINIVASAN, R. ; CHILDS, R. W. ; PAVLETIC, S. Z. ; BISHOP, M. R. ; RADER, C.: A human monoclonal antibody drug and target discovery platform for B-cell chronic lymphocytic leukemia based on allogeneic hematopoietic stem cell transplantation and phage display. In: *Blood* 114 (2009), Nov, Nr. 20, S. 4494–4502
- [Bernard et al. 1994] BERNARD, P. ; GABANT, P. ; BAHASSI, E. M. ; COUTURIER, M.: Positive-selection vectors using the F plasmid ccdB killer gene. In: *Gene* 148 (1994), Oct, Nr. 1, S. 71–74
- [Bernard et al. 1993] BERNARD, P. ; KEZDY, K. E. ; MELDEREN, L. V. ; STEYAERT, J. ; WYNS, L. ; PATO, M. L. ; HIGGINS, P. N. ; COUTURIER, M.: The F plasmid CcdB protein induces efficient ATP-dependent DNA cleavage by gyrase. In: *J Mol Biol* 234 (1993), Dec, Nr. 3, S. 534–541
- [Binder et al. 2006] BINDER, M. ; OTTO, F. ; MERTELSMANN, R. ; VEELKEN, H. ; TREPPEL, M.: The epitope recognized by rituximab. In: *Blood* 108 (2006), Sep, Nr. 6, S. 1975–1978
- [Bladé et al. 1998] BLADÉ, J. ; SAMSON, D. ; REECE, D. ; APPERLEY, J. ; BJÖRKSTRAND, B. ; GAHRTON, G. ; GERTZ, M. ; GIRALT, S. ; JAGANNATH, S. ; VESOLE, D.: Criteria for evaluating disease response and progression in patients with multiple myeloma treated by high-dose therapy and haemopoietic stem cell transplantation. Myeloma Subcommittee of the EBMT. European Group for

- Blood and Marrow Transplant. In: *Br J Haematol* 102 (1998), Sep, Nr. 5, S. 1115–1123
- [Breitling *et al.* 1991] BREITLING, F. ; DÜBEL, S. ; SEEHAUS, T. ; KLEWINGHAUS, I. ; LITTLE, M.: A surface expression vector for antibody screening. In: *Gene* 104 (1991), Aug, Nr. 2, S. 147–153
- [Briney und Jr 2013] BRINEY, B. S. ; JR, J. E. C.: Secondary mechanisms of diversification in the human antibody repertoire. In: *Front Immunol* 4 (2013), S. 42
- [Dower *et al.* 1988] DOWER, W. J. ; MILLER, J. F. ; RAGSDALE, C. W.: High efficiency transformation of *E. coli* by high voltage electroporation. In: *Nucleic Acids Res* 16 (1988), Jul, Nr. 13, S. 6127–6145
- [Duebel 2007] DUEBEL, S.: Recombinant therapeutic antibodies. In: *Appl Microbiol Biotechnol* 74 (2007), Mar, Nr. 4, S. 723–729
- [Edelman *et al.* 1968] EDELMAN, G. M. ; GALL, W. ; WAXDAL, M. ; KONIGSBERG, W.: The covalent structure of a human gamma G-immunoglobulin. I. Isolation and characterization of the whole molecule, the polypeptide chains, and the tryptic fragments. In: *Biochemistry* (1968), May, S. 7(5):1950–8.
- [Engert. *et al.* 2007] ENGERT., A. ; DREGER, P. ; HAFERLACH, T. ; HAFERLACH, T. (Hrsg.): *Antikörpertherapien in der Hämatologie und Onkologie*. 2. Uni-Med-Verlag, 2007
- [Giordano *et al.* 2001] GIORDANO, R. J. ; CARD-VILA, M. ; LAHDENRANTA, J. ; PASQUALINI, R. ; ARAP, W.: Biopanning and rapid analysis of selective interactive ligands. In: *Nat Med* 7 (2001), Nov, Nr. 11, S. 1249–1253
- [Guan *et al.* 2012] GUAN, Y.-F. ; LI, G.-R. ; WANG, R.-J. ; YI, Y.-T. ; YANG, L. ; JIANG, D. ; ZHANG, X.-P. ; PENG, Y.: Application of next-generation sequencing in clinical oncology to advance personalized treatment of cancer. In: *Chin J Cancer* 31 (2012), Oct, Nr. 10, S. 463–470
- [Haq *et al.* 2012] HAQ, I. U. ; CHAUDHRY, W. N. ; AKHTAR, M. N. ; ANDLEEB, S. ; QADRI, I.: Bacteriophages and their implications on future biotechnology: a review. In: *Virology* 9 (2012), S. 9
- [Hess *et al.* 2012] HESS, G. T. ; CRAGNOLINI, J. J. ; POPP, M. W. ; ALLEN, M. A. ; DOUGAN, S. K. ; SPOONER, E. ; PLOEGH, H. L. ; BELCHER, A. M. ; GUIMARAES, C. P.: M13 bacteriophage display framework that allows sortase-mediated modification of surface-accessible phage proteins. In: *Bioconjug Chem* 23 (2012), Jul, Nr. 7, S. 1478–1487

- [Huber *et al.* 2008] HUBER, C. ; RAMMENSEE, H. ; WÖLFEL, T. ; BRITTEN, C. ; HUBER, C. (Hrsg.): *Krebsimmuntherapien*. 5. Deutscher Ärzte-Verlag, 2008
- [Humblet 2004] HUMBLET, Y.: Cetuximab: an IgG(1) monoclonal antibody for the treatment of epidermal growth factor receptor-expressing tumours. In: *Expert Opin Pharmacother* 5 (2004), Jul, Nr. 7, S. 1621–1633
- [Huse *et al.* 1989] HUSE, W. D. ; SASTRY, L. ; IVERSON, S. A. ; KANG, A. S. ; ALTING-MEES, M. ; BURTON, D. R. ; BENKOVIC, S. J. ; LERNER, R. A.: Generation of a large combinatorial library of the immunoglobulin repertoire in phage lambda. In: *Science* 246 (1989), Dec, Nr. 4935, S. 1275–1281
- [Inada *et al.* 1996] INADA, T. ; KIMATA, K. ; AIBA, H.: Mechanism responsible for glucose-lactose diauxie in *Escherichia coli*: challenge to the cAMP model. In: *Genes Cells* 1 (1996), Mar, Nr. 3, S. 293–301
- [Ingham 1990] INGHAM, K. C.: Precipitation of proteins with polyethylene glycol. In: *Methods Enzymol* 182 (1990), S. 301–306
- [Janeway und Travers 2008] JANEWAY, C. A. ; TRAVERS, P. ; MURPHY, K. (Hrsg.): *Immunology*. 8. Spektrum Akademischer Verlag, 2008. – 800 S
- [Koehler und Milstein 1975] KOEHLER, G. ; MILSTEIN, C.: Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. In: *Nature* 256 (1975), Aug, Nr. 5517, S. 495–497
- [Konthur und Cramer 2003] KONTHUR, Z. ; CRAMERI, R.: High-throughput applications of phage display in proteomic analyses. In: *Targets* 2 (2003)
- [Lehman *et al.* 1974] LEHMAN, I. *et al.*: DNA ligase: structure, mechanism, and function. In: *Science (New York, NY)* 186 (1974), Nr. 4166, S. 790
- [Maneewannakul *et al.* 1993] MANEEWANNAKUL, K. ; MANEEWANNAKUL, S. ; IPPEN-IHLER, K.: Synthesis of F pilin. In: *J Bacteriol* 175 (1993), Mar, Nr. 5, S. 1384–1391
- [Manier *et al.* 2012] MANIER, S. ; SACCO, A. ; LELEU, X. ; GHOBRIAL, I. M. ; ROCCARO, A. M.: Bone marrow microenvironment in multiple myeloma progression. In: *J Biomed Biotechnol* 2012 (2012), S. 157496
- [Mazia *et al.* 1975] MAZIA, D. ; SCHATTE, G. ; SALE, W.: Adhesion of cells to surfaces coated with polylysine. In: *Journal of Cell Biology* 66 (1975), Nr. 11, S. 198–200

- [McCafferty *et al.* 1990] MCCAFFERTY, J. ; GRIFFITHS, A. D. ; WINTER, G. ; CHISWELL, D. J.: Phage antibodies: filamentous phage displaying antibody variable domains. In: *Nature* 348 (1990), Dec, Nr. 6301, S. 552–554
- [Mosiman *et al.* 1997] MOSIMAN, V. L. ; PATTERSON, B. K. ; CANTERERO, L. ; GOOLSBY, C. L.: Reducing cellular autofluorescence in flow cytometry: an in situ method. In: *Cytometry* 30 (1997), Jun, Nr. 3, S. 151–156
- [Pande *et al.* 2010] PANDE, J. ; SZEWCZYK, M. M. ; GROVER, A. K.: Phage display: concept, innovations, applications and future. In: *Biotechnol Adv* 28 (2010), Nr. 6, S. 849–858
- [Renner 2012] RENNER, K.: Der Erkältung den Kampf ansagen. In: *Die PTA in der Apotheke* (2012)
- [Russel *et al.* 1986] RUSSEL, M. ; KIDD, S. ; KELLEY, M. R.: An improved filamentous helper phage for generating single-stranded plasmid DNA. In: *Gene* 45 (1986), Nr. 3, S. 333–338
- [Saiki *et al.* 1988] SAIKI, R. K. ; GELFAND, D. H. ; STOFFEL, S. ; SCHARF, S. J. ; HIGUCHI, R. ; HORN, G. T. ; MULLIS, K. B. ; ERLICH, H. A.: Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. In: *Science* 239 (1988), Jan, Nr. 4839, S. 487–491
- [Sambrook *et al.* 2001] SAMBROOK, J. ; MANIATIS, T. ; RUSSEL, D. W.: Molecular cloning a laboratory manual. In: *a laboratory manual* (2001)
- [Schirrmann und Hust 2010] SCHIRRMANN, T. ; HUST, M.: Construction of human antibody gene libraries and selection of antibodies by phage display. In: *Methods Mol Biol* 651 (2010), S. 177–209
- [Schirrmann *et al.* 2011] SCHIRRMANN, T. ; MEYER, T. ; SCHÜTTE, M. ; FRENZEL, A. ; HUST, M.: Phage display for the generation of antibodies for proteome research, diagnostics and therapy. In: *Molecules* 16 (2011), Nr. 1, S. 412–426
- [Schmiedl und Dübel 2004] SCHMIEDL, A. ; DÜBEL, S. ; WINK, M. (Hrsg.): *Rekombinante Antikörper und Phagen-Display*. 5. Molekulare Biotechnologie Wiley-VCH, 2004
- [Schofield *et al.* 2007] SCHOFIELD, D. J. ; POPE, A. R. ; CLEMENTEL, V. ; BUCKELL, J. ; CHAPPLE, S. D. ; CLARKE, K. F. ; CONQUER, J. S. ; CROFTS, A. M. ; CROWTHER, S. R. E. ; DYSON, M. R. ; FLACK, G. ; GRIFFIN, G. J. ; HOOKS, Y. ; HOWAT, W. J. ; KOLB-KOKOCINSKI, A. ; KUNZE, S. ; MARTIN, C. D. ; MASLEN, G. L. ; MITCHELL, J. N. ; O’SULLIVAN, M. ; PERERA, R. L. ;

- ROAKE, W. ; SHADBOLT, S. P. ; VINCENT, K. J. ; WARFORD, A. ; WILSON, W. E. ; XIE, J. ; YOUNG, J. L. ; MCCAFFERTY, J.: Application of phage display to high throughput antibody generation and characterization. In: *Genome Biol* 8 (2007), Nr. 11, S. R254
- [Shyr und Liu 2013] SHYR, D. ; LIU, Q.: Next generation sequencing in cancer research and clinical application. In: *Biol Proced Online* 15 (2013), Nr. 1, S. 4
- [Sidhu 2000] SIDHU, S. S.: Phage display in pharmaceutical biotechnology. In: *Curr Opin Biotechnol* 11 (2000), Dec, Nr. 6, S. 610–616
- [Siva *et al.* 2008] SIVA, A. C. ; KIRKLAND, R. E. ; LIN, B. ; MARUYAMA, T. ; MCWHIRTER, J. ; YANTIRI-WERNIMONT, F. ; BOWDISH, K. S. ; XIN, H.: Selection of anti-cancer antibodies from combinatorial libraries by whole-cell panning and stringent subtraction with human blood cells. In: *J Immunol Methods* 330 (2008), Jan, Nr. 1-2, S. 109–119
- [Smith 1985] SMITH, G. P.: Filamentous fusion phage: novel expression vectors that display cloned antigens on the virion surface. In: *Science* 228 (1985), Jun, Nr. 4705, S. 1315–1317
- [Smith und Petrenko 1997] SMITH, G. P. ; PETRENKO, V. A.: Phage Display. In: *Chem Rev* 97 (1997), Apr, Nr. 2, S. 391–410
- [Steingroewera *et al.* 2007] STEINGROEWERA, J. ; BERGEMANN, T. B. and Christian ; BOSCHKEA, E.: Biomagnetic separation of *Salmonella Typhimurium* with high affine and specific ligand peptides isolated by phage display technique. In: *Journal of Magnetism and Magnetic Materials* 311 (2007), S. 295–299
- [Suzuki 2013] SUZUKI, K.: Current therapeutic strategy for multiple myeloma. In: *Jpn J Clin Oncol* 43 (2013), Feb, Nr. 2, S. 116–124
- [Taussig 1988] TAUSSIG, M. J.: Molecular genetics of immunoglobulins. In: *Immunol Suppl* 1 (1988), S. 7–15
- [Tikunova und Morozova 2009] TIKUNOVA, N. V. ; MORZOVA, V. V.: Phage display on the base of filamentous bacteriophages: application for recombinant antibodies selection. In: *Acta Naturae* 1 (2009), Oct, Nr. 3, S. 20–28
- [Tonegawa *et al.* 1978] TONEGAWA, S. ; BRACK, C. ; HOZUMI, N. ; PIRROTTA, V.: Organization of immunoglobulin genes. In: *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 42 Pt 2 (1978), S. 921–931

- [Trepel *et al.* 2012] TREPPEL, M. ; MARTENS, V. ; DOLL, C. ; RAHLFF, J. ; GÖSCH, B. ; LOGES, S. ; BINDER, M.: Phenotypic detection of clonotypic B cells in multiple myeloma by specific immunoglobulin ligands reveals their rarity in multiple myeloma. In: *PLoS One* 7 (2012), Nr. 2, S. e31998
- [Wu *et al.* 2001] WU, B. P. ; XIAO, B. ; WAN, T. M. ; ZHANG, Y. L. ; ZHANG, Z. S. ; ZHOU, D. Y. ; LAI, Z. S. ; GAO, C. F.: Construction and selection of the natural immune Fab antibody phage display library from patients with colorectal cancer. In: *World J Gastroenterol* 7 (2001), Dec, Nr. 6, S. 811–815
- [Yazynin *et al.* 1996] YAZYNNIN, S. A. ; DEYEV, S. M. ; JUCOVIC, M. ; HARTLEY, R. W.: A plasmid vector with positive selection and directional cloning based on a conditionally lethal gene. In: *Gene* 169 (1996), Feb, Nr. 1, S. 131–132
- [Yuan 1981] YUAN, R.: Structure and mechanism of multifunctional restriction endonucleases. In: *Annu Rev Biochem* 50 (1981), S. 285–319

Abbildungsverzeichnis

1.	Schematische Übersicht der humanen Immunantwort (Renner, 2012)	2
2.	Schematische Übersicht eines IgG-Antikörpers und anderer Antikörperformate (Schmiedl und Dübel, 2004)	3
3.	Schematisch dargestellter Genlocus der schweren Kette und der leichten Kette κ und λ (Janeway und Travers, 2008)	5
4.	Schematische Übersicht des M13-Phagen (Hess <i>et al.</i> , 2012)	6
5.	Skizzierte Übersicht des Lebenszyklus eines M13-Phagen	7
6.	Schema eines Phage-Display Selektionsprozesses (Steingroewera <i>et al.</i> , 2007)	8
7.	Amplifizierungsstrategie der leichten Kette zur Generierung eines Fab-Fragments	9
8.	Amplifizierungsstrategie der schweren Kette zur Generierung eines Fab-Fragments	10
9.	Schematisches Flussschema zur Konstruktion von Antikörper-Phagenbanken (Tikunova und Morozova, 2009)	11
10.	Schematisch dargestelltes Arbeitsprogramm der Bachelor Thesis (Konthur und Cramer, 2003)	12
11.	Schematische, zirkuläre Darstellung des Vektors pFB-Fab:	23
12.	Schematische Übersicht des BRASIL-Verfahrens (Fabrice Viol, 2013)	33
13.	Agarosegelelektrophorese der verdauten DNA-Fragmente pFB-Fab und HC IgG	37
14.	Kolonie-PCR der klonierten Antikörper-Inserts HC IgG	38
15.	Kolonie-PCR der klonierten Antikörper-Inserts HC IgG und LC κ	39
16.	Anreicherung der Antikörper-Phagen an Myelomzelllinien über drei Selektionsrunden	40
17.	Einzelklonbindungsassay gepickter Antikörper-Phageneinzelklone nach der dritten Selektionsrunde auf KMS	41
18.	Optimierung der Hochdurchsatz-Amplifikation der Antikörper-Phagen	43
19.	Evaluierung des zellbasierten Fluoreszenz-ELISA mit Kontrollphagen TSMK3 und R1	44
20.	Fluoreszenz-ELISA der Antikörper-Phagen auf KMS und PBMC's	45
21.	Agarosegelelektrophorese der verdauten DNA-Fragmente pFB-Fab + HC IgG und LC κ	i

Tabellenverzeichnis

1.	Kultivierungsbedingungen der 96-Well Phagenamplifikation	35
2.	Prozentualer Anteil des Antikörper-Phagenouputs am Phageninput	48

3.	Phageninput, Phagenoutput und Titer in den Selektionsrunden auf unterschiedlichen Myelomzelllinien und PBMC's	ii
4.	Titer der Antikörper-Phageneinzelklone nach der Amplifikation in <i>E.coli</i> K12 ER2738	iii

A. Anhang

A.1. Restriktionsverdau der zweiten Klonierung pFB-Fab + HC IgG und LC κ

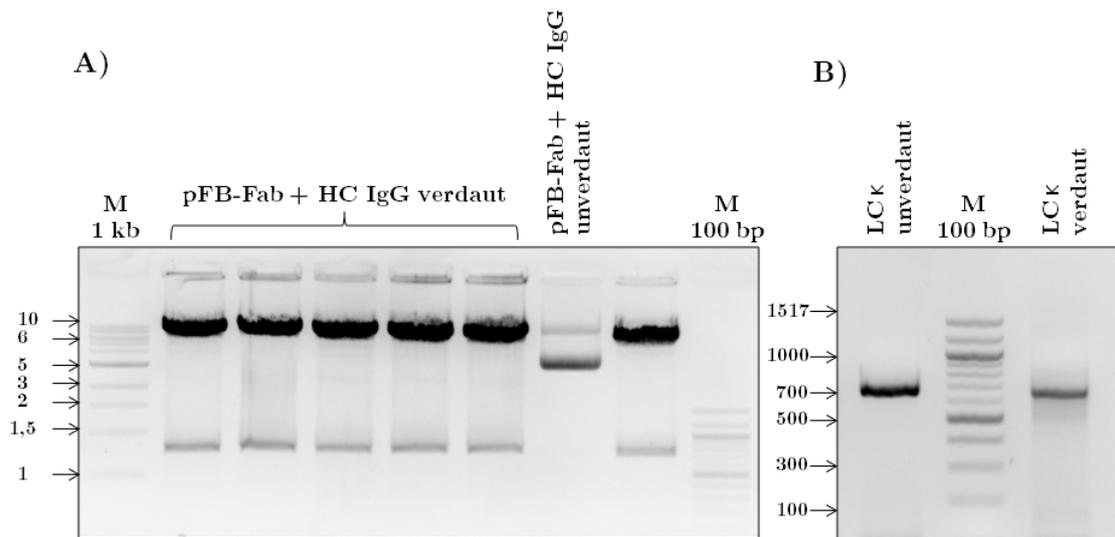


Abbildung 21: Agarosegelelektrophorese der verdauten DNA-Fragmente pFB-Fab + HC IgG und LC κ : Es wurde eine Agarosekonzentration von 1 % in 1x TAE Puffer mit 1:1000 verdünntem Ethidiumbromid verwendet. **A)** Restriktionsverdau des Vektors pFB-Fab + HC IgG mit den Restriktionsenzymen *Sall-HF* und *NheI-HF*: 20 μ g des Vektors wurden verdaut und auf sechs Taschen des Agarosegels verteilt. Die sechste Tasche zeigt den unverdauten Vektor in zwei Konformationen. Nach diesem ist erneut ein verdauter Vektor zu sehen. Bei ca. 700 bp ist das herausgeschnittene *ccdB*-Gen zu erkennen. **B)** Restriktionsverdau des Antikörper-Amplikon LC κ : 1 μ g des Inserts wurde ebenfalls mit *Sall-HF* und *NheI-HF* verdaut und elektrophoretisch aufgetrennt. Das verdaute, sowie das unverdaute Insert, zeigen eine Bande bei ca. 700 bp.

A.2. Übersicht der Antikörper-Phagentiter

A.2.1. Phageninput, Phagenoutput und Titer in den Selektionsrunden

Die präparierte Antikörper-Phagenbank nach der Titration besitzt einen Titer von $2 * 10^8$ Phagen / μl

Zelllinie	1. Runde			2. Runde			3. Runde		
	Phageninput	Phagenoutput	Titer pro μl	Phageninput	Phagenoutput	Titer pro μl	Phageninput	Phagenoutput	Phagenoutput
U266	$4 * 10^9$	$1,5 * 10^3$	$5,1 * 10^6$	$6 * 10^7$	$3,93 * 10^4$	$3,6 * 10^6$	$4 * 10^8$	$9,76 * 10^5$	$9,76 * 10^5$
PBMC	–	–	–	$6 * 10^7$	$2,7 * 10^4$	–	$4 * 10^8$	$9,45 * 10^5$	$9,45 * 10^5$
KMS	$2 * 10^9$	$4 * 10^2$	$2 * 10^6$	$1 * 10^7$	$3,67 * 10^4$	$3,75 * 10^7$	$2 * 10^8$	$1,14 * 10^6$	$1,14 * 10^6$
PBMC	–	–	–	$1 * 10^7$	$5,25 * 10^2$	–	$2 * 10^8$	$2,77 * 10^4$	$2,77 * 10^4$
RPMI	$2 * 10^9$	$4,3 * 10^3$	$3,4 * 10^6$	$2 * 10^7$	$6,06 * 10^4$	$3 * 10^7$	$2 * 10^8$	$2,01 * 10^5$	$2,01 * 10^5$
PBMC	–	–	–	$2 * 10^7$	$7,65 * 10^3$	–	$2 * 10^8$	$1,58 * 10^4$	$1,58 * 10^4$
AMO1	$2 * 10^9$	$1,37 * 10^4$	$3,2 * 10^6$	$2 * 10^7$	$2,61 * 10^4$	$4,35 * 10^7$	$1 * 10^8$	$5,16 * 10^4$	$5,16 * 10^4$
PBMC	–	–	–	$2 * 10^7$	$8,35 * 10^4$	–	$1 * 10^8$	$7,8 * 10^3$	$7,8 * 10^3$

Tabelle 3: Phageninput, Phagenoutput und Titer in den Selektionsrunden auf unterschiedlichen Myelomzelllinien und PBMC's: Für die Selektionen wurden $2 * 10^6$ mit einer definierten Menge an Phagen inkubiert. Für die Anreicherung sind die Myelomzelllinien U266, KMS, RPMI und AMO1 verwendet worden. Das Biopanning verlief über drei Runden. Nach der ersten und zweiten Selektionsrunde wurden die Antikörper-Phagen in *E.coli* K12 ER2738 amplifiziert und nach der Beschreibung in 3.4.3 titriert. Ab der zweiten Runde wurden bei jeder Selektion noch zusätzlich PBMC's hinzugezogen.

A.2.2. Titer und Phagenoutput der Antikörper-Phageneinzelklone

Antikörper-Phageneinzelklon	Titer nach Amplifikation pro μl
B1	$3,28 * 10^7$
B2	$2,75 * 10^7$
B3	$1,33 * 10^7$
B4	$1,15 * 10^7$
B5	$3,10 * 10^7$
B6	$2,10 * 10^7$
B7	$2,78 * 10^7$
B8	$1,70 * 10^7$
B9	$1,70 * 10^7$
B10	$1,40 * 10^7$
C1	$2,38 * 10^7$
C2	$3,08 * 10^7$
C3	$1,90 * 10^7$
C4	$4,70 * 10^7$
C5	$3,15 * 10^7$
C6	$3,30 * 10^7$
C7	$1,63 * 10^7$
C8	$2,25 * 10^7$
C9	$2,55 * 10^7$
C10	$1,70 * 10^7$

Tabelle 4: Titer der Antikörper-Phageneinzelklone nach der Amplifikation in *E.coli* K12 ER2738:

Nach der Amplifikation der Antikörper-Phageneinzelklone wurden diese wie in 3.4.3 titriert und zunächst bei 4 °C gelagert.

A.3. Eidesstattliche Erklärung

Ich versichere an Eides statt durch meine eigene Unterschrift, dass ich die vorstehende Arbeit selbständig und ohne fremde Hilfe angefertigt und alle Stellen, die wörtlich oder annähernd wörtlich aus Veröffentlichungen genommen sind, als solche kenntlich gemacht habe. Die Versicherung bezieht sich auch auf in der Arbeit gelieferte Zeichnungen, Skizzen, bildliche Darstellungen und dergleichen.

23.04.2013

Fabrice Viol

A.4. Sequenz des Vektors pFB-Fab

taacgagttcataagatttcaaaagcggccaatacgcgaaccgctctccccgcggttgccgattcattaatgcagct
ggcagcagcaggtttcccgaactggaaagcgggcagtgagcgaacgcaattaatgtgagttagctcactcattaggcacc
accaggctttacactttatgcttccggctcgatgttgggtggaattgtgagcggataacaatttcacacaggaaacagct
atgacatgattacgccaagcttaaggagacagtcacatgtgaaacaaagcactattgcactggcactctaccgttactg
ttaccctgtgacaaaaggcggctgactatgctatgaagcagcgtattacagtgacagttgacagcagcagctatcagttg
ctcaaggcatatatgatgtcaatatctccggtctggtaagcacaacatgcagaatgaagcccgtcgtctgcgtgccgaa
cgctggaaagcggaaaatcaggaaggatggctgaggtcggccggtttattgaaatgaacggctcttttctgacgagaa
caggggctgggaaatgcagtttaaggtttacacctataaaagagagagccgttatcgtctgtttgtggatgtacagagt
gatattattgacacgcccgggcagcggatggatccccctggccagtgacagctcgtcgtcagataaagtctcccgtga
actttaccggtgggtgcataatcggggatgaaagctggcgcagatgaccaccgatatggccagtggtccggtctccgtta
tcggggaagaagtggctgatctcagccaccgcgaaaatgacatcaaaaacgccattaacctgatgttctggggaatata
aatgtcaggtcccttatacacagccagctcgcaggtcgatacagtagaaattacagaaactttatcacgtttagtaagta
tagaggctgaaaatccagatgaagccgaacgacttgaagagaaaagtataagagttgtgaaattgttcttgatgcagat
gattttcaggactatgacactagctagctaaactgagtaaaagcttcatgcaaatctatttcaaggagacagtcataatg
aaatacctattgcctacggcagccgctggattgttattactcggccagccggccatggatgctatgaagcagcgtat
ttacagtgacagttgacagcagcagctatcagttgctcaaggcatatatgatgtcaatatctccggtctggtaagcaca
ccatgcagaatgaagcccgtcgtctgcgtgccgaacgctggaaagcggaaaatcaggaaggatggctgaggtcggccg
gtttattgaaatgaacggctcttttctgacgagaaacaggggctgggaaatgcagtttaaggtttacacctataaaagag
agagccgttatcgtctgtttgtggatgtacagagtatattattgacacgcccgggcagcggatggatccccctggcc
agtgcagctcgtcgtcagataaagtctcccgtgaactttaccggtgggtgcataatcggggatgaaagctggcgcagat
gaccaccgatatggccagtggtccggtctccgttatcggggaagaagtggctgatctcagccaccgcgaaaatgacatca
aaaacgccattaacctgatgttctggggaatataaatgtcaggtcccttatacacagccagctcgcaggtcgatacagt
agaaattacagaaactttatcacgtttagtaagtagaggtgaaaatccagatgaagccgaacgacttgaagagaa
aagtataagagttgtgaaattgttcttgatgcagatgattttcaggactatgacactaacgcgtcatcaccaccatcacca
ctagggatccaaagatatcagagctgaaactgtgaaagttgtttagcaaaatccatacagaaaattcatttactaacg
tctggaaagacgacaaaactttagatcgttacgtaactatgagggctgtctgtggaatgctacaggcgttgtagttgt
actgggtgacgaaactcagtggttacggtacatgggttctattgggttctatccctgaaaatgaggggtgggtcctga
gggtggcgggtctgaggggtggcgggtctgaggggtggcggtaactaaacctctgagtagcgggtgatacacctattccgggt
atacttatatacaacctctcagcggcacttatccgctggtaactgagcaaaaccccgtaactcctaactcttctcttgag
gagttcagcctcttaactttcatgtttcagaataataggttccgaaataggcagggggcattaactgtttatacggg
cactgttactcaaggcactgaccccgtaaaacttattaccagtagactcctgtatcatcaaaagccatgtatgacgctt
actggaacggtaaaatcagagactgcgctttccattctggctttaatgaggatttattgtttgtgaatatcaaggccaa
tcgtctgacctgcctcaacctctgtcaatgctggcggcggtctgggtgggttctgggtggcggctctgaggggtgggtg
ctctgaggggtggcgggtctgaggggtggcggctctgagggagggcgggtccgggtgggtctggttccgggtgattttgatt
atgaaaagatggcaaacgtaataagggggctatgaccgaaaatgccgatgaaaacgcgctacagctcagcgttaaaggc
aaacttgattctgtcgtactgattacgggtcgtcgtatcgatgggttccattgggtgacgtttccggccttgtaaatgggtgt
taatgggtgactgggtgattttgctggcttaattcccaaatggctcaagtccgtgacgggtgataattcacctttaatgaata
attccgtaatatattaccttcttgcctcagtcgggtgaaatgtcgccttatgtctttggcgtggtaaacatataat

