

Aus dem Institut für Pathologie
der Universität zu Lübeck
Direktor: Prof. Dr. med. A. C. Feller

**Etablierung immunhistochemischer Methoden zur Generierung
und dem Nachweis von Phage-Antikörpern im Gewebe am
Beispiel des Mantelzelllymphoms**

Inauguraldissertation

zur

Erlangung der Doktorwürde
der Universität zu Lübeck

- Aus der medizinischen Fakultät –



vorgelegt von
Cora Nickels
aus München

Lübeck 2008

1. Berichterstatter: Herr Prof. Dr. med. Hartmut Merz

2. Berichterstatter: Herr Priv.-Doz. Dr. med. S. Görg

Tag der mündlichen Prüfung: 19.11.2008

Zum Druck genehmigt. Lübeck, den 19.11.2008

Abkürzungsverzeichnis	3
1. Einleitung	5
1.1. Antikörper	5
1.2. Einsatz von Antikörpern – Histopathologie und Immunhistochemie	7
1.3. Vor- und Nachteile monoklonaler und polyklonaler Antikörper	8
1.4. Gewinnung von Antikörpern mittels Phage-Display	9
1.5. Mantelzelllymphom und Lymphomdiagnostik	10
1.6. Fragestellung	11
2. Material und Methoden	13
2.1. Chemikalien.....	13
2.1.1. Bakterienkultur	13
2.1.2. Immunhistochemie	13
2.1.3. Zellkultur	14
2.1.4. Immunopräzipitation und Westernblot	14
2.2. Antikörper	15
2.3. Lösungen und Puffer	16
2.4. Geräte und Gebrauchsgegenstände.....	16
2.5. Antikörperexpression in E.coli	18
2.5.1. Anzucht der Bakterien und Induktion der Expression	18
2.5.2. Lysierung der Bakterien	19
2.6. Immunhistochemische Färbungen	19
2.6.1. Tissue-Microarray	19
2.6.2. Färbemethode.....	19
2.7. Zellkulturen.....	20
2.7.1. Verwendete Zelllinien und Kultivierung.....	20
2.7.2. Präparation der Zelllysate (denaturierend)	21
2.7.3. Präparation der Zelllysate (nativ)	21
2.8. Immunopräzipitation.....	21
2.9. SDS-PAGE.....	22
2.10. Westernblot	22
2.11. Elektrospray-Ionisations-Massenspektrometrie	23
3. Ergebnisse	24
3.1. Subtraktives Phage-Display an Mantelzelllymphom-Gewebe	24
3.2. Etablierung der Immunhistochemie mit E. coli-Lysaten	24
3.3. Bestimmung der optimalen Antikörperkonzentration mittels Titrierung.....	25

3.4. Etablierung des Tissue-Microarray-Screenings.....	26
3.5. Mikroskopische Auswertung der Tissue-Microarrays.....	27
3.6. Proteinisolierung und Analyse.....	29
3.7. Vergleich der Vimentin-Expression in verschiedenen Zelllinien.....	30
4. Diskussion.....	33
4.1. Antikörper – Verwendung und Herstellung.....	34
4.2. Etablierung des Einsatzes von FFPE-Gewebe im Phage-Display.....	37
4.3. Etablierung der High-Throughput-Testmethoden	39
4.4. Vimentin	41
4.5. Ausblick	43
5. Zusammenfassung	45
Literaturverzeichnis	47
Foto-Anhang	53
Danksagung.....	61
Lebenslauf	62
Publikationen	63

Abkürzungsverzeichnis

2YT	Yeast- (= Hefe) Trypton
ABC	(Strept)Avidin-Biotin-Enzymkomplex
AK	Antikörper
APAAP	Alkalische Phosphatase – Anti-Alkalische Phosphatase
Aqua dest.	Aqua destillata
BCA	Bicinchoninsäure
BSA	Bovine Serum Albumin
CAM	Chloramphenicol
C _H	Constant Heavy (=schwere Immunglobulinkette, konstanter Anteil)
C _L	Constant Light (= leichte Immunglobulinkette, konstanter Anteil)
DAB	3,3'-Diaminobenzidin-Tertahydrochlorid
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
E. coli	Escherichia coli
EDTA	Ethylendiamintetraacetat (Ethylendiamintetraessigsäure)
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay
ESI-MS	Elektrospray-Ionisations-Massenspektrometrie
FACS	Fluorescence-activated cell sorting
FCS	Fetal Calf Serum (= Fetales Kälber Serum)
FFPE	Formalin-fixed paraffin-embedded
H-Kette	H = Heavy (= schwere Immunglobulinkette)
HRP	Horseradish Peroxidase (Meerrettich-Peroxidase)
HuCAL [®]	Human Combinatorial Antibody Library (MorphoSys, München, D)
IPTG	Isopropylthiogalactopyranosid
IVIG	Intravenous Immunoglobulin
L-Kette	L = Light (= leichte Immunglobulinkette)
Mab	Monoklonaler Antikörper
MCL	Mantle Cell Lymphoma = Mantelzelllymphom
mM	Millimol beziehungsweise millimolar
NHL	Non-Hodgkin-Lymphom
Pab	Polyklonaler Antikörper
PAP	Peroxidase - Anti-Peroxidase

PIT	Protease Inhibitor Cocktail Tablette
PVDF	Polyvinylidendifluorid
RIA	Radio-Immuno-Assay
scFv	Single chain Fragment variable
SDS-PAGE	Sodium- (=Natrium) dodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
UpM → U/min	Umdrehungen pro Minute
V _H	Variable Heavy (=schwere Immunglobulinkette, variabler Anteil)
V _L	Variable Light (= leichte Immunglobulinkette, variabler Anteil)

1. Einleitung

1.1. Antikörper

Antikörper sind Proteine des humoralen adaptiven Immunsystems und werden auch als Immunglobuline bezeichnet. Sie kommen als Oberflächenmoleküle auf den B-Lymphozyten vor und werden in ihrer löslichen Form von Plasmazellen produziert und sezerniert.

Die charakteristische Struktur eines Antikörpermoleküls wird als Y beschrieben. Es besteht aus etwa drei gleich großen Teilen, die in der sogenannten Hinge-Region flexibel miteinander verbunden sind. Antikörper sind aus je zwei identischen leichten (L-) und zwei identischen schweren (H-) Polypeptidketten aufgebaut, die untereinander durch Disulfidbrücken kovalent miteinander verknüpft sind. Eine leichte Kette enthält zwei Anteile, einen variablen (V_L) und einen konstanten (C_L), während die schweren Ketten aus vier Anteilen bestehen, einem variablen (V_H) und drei konstanten ($C_{H1}, 2, 3$).

Die Arme des Y werden von je einer L- und einer H-Kette gebildet und enthalten die variablen Regionen (V_L und V_H) und eine konstante Region (C_L und C_{H1}). Die variablen Regionen zusammen bilden die Antigenbindungsstelle eines Antikörpers. Dieser Anteil des Antikörpers wird auch als Fab Fragment bezeichnet (Fragment antigen binding). Ein Antikörper besitzt zwei Antigenbindungsstellen und ist damit bivalent. Der Stamm des Y wird von den konstanten Regionen der zwei schweren Ketten gebildet (C_{H2} und C_{H3}) und als Fc Fragment bezeichnet (Fragment crystallizable). Hier findet die Interaktion des Antikörpers mit Effektorzellen bzw. -molekülen des Immunsystems statt (siehe Abb.1).

Bei den Leichtketten unterscheidet man weiter zwischen κ - und λ -Ketten. Jedes Immunglobulin enthält jeweils zwei L-Ketten vom gleichen Typ, entweder vom κ - oder vom λ -Typ. Sie kommen im menschlichen Immunsystem im Verhältnis $\kappa:\lambda$ wie 2-3:1 vor. Die schweren Ketten werden in fünf Isotypen unterteilt – IgM, IgG, IgA, IgD und IgE. Damit werden fünf Immunglobulinklassen mit unterschiedlichen Funktionen determiniert. Hierunter ist IgG (mit den Untergruppen IgG1, 2, 3, und 4) das am häufigsten vertretene Immunglobulin des Menschen (Janeway et al., 2005).

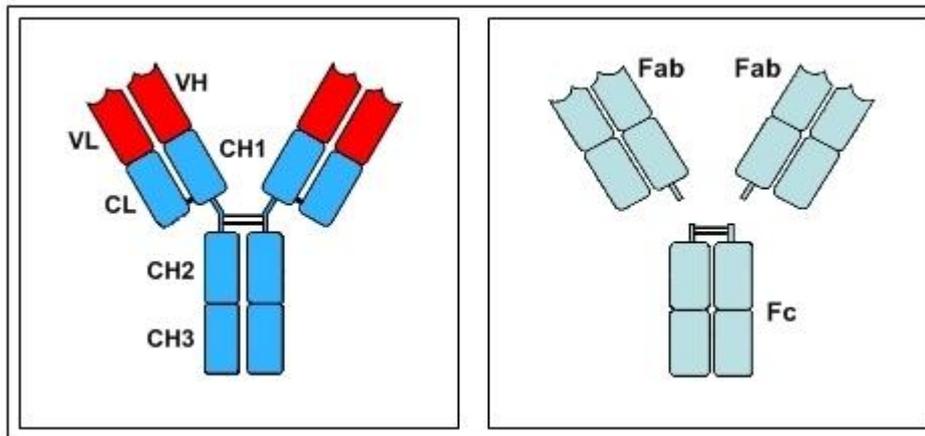


Abb.1: Aufbau eines Antikörpermoleküls (umgezeichnet nach Janeway et al., Immunobiology, 2005).

Antikörper besitzen eine hohe Spezifität für ihr jeweiliges Antigen. Deswegen ist es für eine adäquate Immunreaktion wichtig, eine große Anzahl verschiedener Antikörper zu produzieren und bereit zu stellen. Tatsächlich findet man auch mehrere Millionen verschiedener Antikörpermoleküle innerhalb eines Individuums. Diese große Diversität kommt durch reguliertes DNA-Rearrangement durch nicht-homologe Rekombination von DNA-Enden (non-homologous end joining – NHEJ) bei der Reifung der B-Lymphozyten zustande.

In der DNA einer unreifen B-Zelle existieren für die leichte Kette, jeweils für den κ - und den λ -Subtyp, ungefähr 100 variable Segmente (V_L), fünf sogenannte joining Segmente (J_L) und ein Segment für die konstante Region (C_L). Jeweils ein V- und ein J-Segment werden durch zufälliges Rearrangement mit dem C-Segment zusammengefügt während die restlichen Segmente durch Deletion verloren gehen. Durch eine zusätzlich bestehende Ungenauigkeit bei dem Rearrangement in der variablen Region, welche später die Antigenbindungsstelle bildet, wird die Diversität nochmals erhöht. Es kommt hierbei teilweise zu Verlusten von Basenpaaren und daraus resultierenden Veränderungen in der Aminosäuresequenz.

Zwischen 100 V_H -Segmenten und 6 J_H -Segmenten der schweren Kette liegen 30 D_H -Segmente. Auch hier wird von jedem Segment jeweils eines zufällig zusammengesetzt und auch hier besteht bei der Zusammenfügung eine gewisse Ungenauigkeit zur weiteren Erhöhung der Diversität. Somit reifen B-Zellen heran, die später einen für sie und ein bestimmtes Antigen spezifischen Antikörper produzieren (Lodish et al., 2004; Janeway et al., 2005).

1.2. Einsatz von Antikörpern – Histopathologie und Immunhistochemie

Die Eigenschaft der Antikörper, ein ganz spezifisches Epitop zu binden, hat über die Jahre zur deren vielfältigen Verwendung in weiten Bereichen der Forschung und klinischen Anwendung geführt. Diese Anwendungen beinhalten qualitative und quantitative Analysen eines vorhandenen Antigens in Lösungen, Zellen, Gewebe oder innerhalb eines Organismus mit deren Einsatz in Westernblots, ELISA, Immunfluoreszenz sowie Immunhistochemie. Ebenso werden sie zur Aufreinigung von Antigen, Antigen-assoziierten Molekülen oder Antigen-produzierenden Zellen eingesetzt wie in der Immunoprecipitation und in der Durchflusszytometrie (sogenanntem FACS).

Darüber hinaus finden sie immer breitere Verwendung in der Klinik. Einige Antikörper finden als Immuntherapeutika in der Tumorthherapie (Rituximab, Trastuzumab), der Therapie chronischer und autoimmuner Erkrankungen (Anti-TNF- α -AK), zur Immunmodulation (IVIG), aber auch als Antitoxine (Diphtherie-Antitoxin) bereits Verwendung (Plosker und Figgitt, 2003; Lipman et al., 2005).

Die Histopathologie ist wesentlicher Bestandteil der anatomischen Pathologie zur Diagnosestellung von Tumoren und Erkrankungen. Hierbei werden Gewebeschnitte von Biopsien, OP- oder Sektionspräparaten nach deren Aufbereitung mikroskopisch untersucht. Zur Erhaltung der Gewebemorphologie bzw. zur Verhinderung der Autolyse wird das Gewebe üblicherweise in Formalin, einer wässrigen Formaldehydlösung, fixiert. Zur Herstellung mikroskopischer Präparate wird das Gewebe zusätzlich entwässert und in Paraffin eingebettet, um am Mikrotom circa 1 μm dicke Schnittpräparate herzustellen. Zur konventionellen Färbung der Präparate stehen in der klassischen Histopathologie verschiedene Farbstoffe zur Verfügung, die je nach Beschaffenheit und physikalisch/chemischen Eigenschaften der zellulären und extrazellulären Strukturen wie beispielsweise pH-Wert, Hydrophilie und anderen, deponiert werden und zu einem relativ unspezifischen Färbemuster führen.

In der Immunhistochemie kommen Antikörper zum Einsatz, um die Expression spezifischer Antigene beziehungsweise Epitope im Gewebeverband (in-situ) nachzuweisen. Durch Konjugation der Antikörper an ein Enzym wie zum Beispiel HRP (horseradish peroxidase), welches durch ein geeignetes Chromogen eine sichtbare Farbreaktion produziert, können direkt oder indirekt über einen zweiten sogenannten Brückenantikörper oder über Drei- und Mehrschritttechniken (ABC, PAP, APAAP; Boenisch, 2003), die meist sensitiver sind, die gebundenen, gegen das Zielantigen

gerichteten Primärantikörper nachgewiesen werden. Die Immunhistochemie ist bereits länger etablierter Bestandteil in der Pathologie (Beginn Mitte des 20. Jahrhunderts) und hat wesentlich zur immer differenzierteren Diagnosestellung und Klassifizierung vor allem von malignen Tumoren beigetragen. Durch immer besseres Verständnis der Vorgänge auf molekularer Ebene und der Entschlüsselung der Rolle von Regulatorproteinen werden jetzt und zukünftig immer mehr Antikörper zur Identifizierung und Quantifizierung prognostischer Marker eingesetzt (Taylor und Levenson, 2006).

1.3. Vor- und Nachteile monoklonaler und polyklonaler Antikörper

Um zwischen dem Einsatz monoklonaler oder polyklonaler Antikörper eine Entscheidung treffen zu können, muss unter anderem auch deren angestrebte Verwendung beachtet werden, denn es bestehen einige generelle Unterschiede. Während die Produktion polyklonaler Antikörper (PAb) durch Immunisierung von Tieren einen Vorteil hinsichtlich zeitlicher, finanzieller und technischer Voraussetzungen bietet, ist die Herstellung monoklonaler Antikörper (MAb) in der Regel über die Immunisierung von Mäusen (zuletzt auch Kaninchen) und nachfolgend über die Generierung von Hybridomazellen deutlich aufwendiger. Sind solche Hybridomazellen allerdings einmal hergestellt, stellen sie eine konstante und reproduzierbare Quelle zur Produktion homogener und beständiger MAb's mit hoher Chargenkonstanz dar, wohingegen zur wiederholten Produktion von PAb's eine erneute Immunisierung vorgenommen werden muss. Für die großtechnische Produktion werden oft Seren mehrerer immunisierter Tiere gepoolt. PAb's sind dadurch heterogen und gleichzeitig in ihrer Quantität variabel. Außerdem erhält man bei dem Verfahren zur Herstellung eines polyklonalen Serums ein heterogenes Gemisch von Antikörpern mit unterschiedlichen Affinitäten und Spezifitäten gegen verschiedene Epitope eines multivalenten Antigens. Diese Heterogenität beinhaltet aber auch den Vorteil, dass PAb's eventuell unempfindlicher sind gegenüber bestimmten Veränderungen in der Konformation eines Antigens. Sie sind damit in gewisser Weise auch „stabiler“ gegenüber äußeren Einflüssen wie pH-Wert-Änderungen und Schwankungen der Ionenkonzentration. Es besteht eine höhere Chance im polyklonalen Setting auch Formalinresistente Epitope abzudecken, während dies im monoklonalen Verfahren nur selten, bisher nicht vorhersagbar und somit meist zufällig gelingt. MAb's sind wiederum wesentlich störanfälliger gegenüber äußeren Einflüssen, haben dafür den Vorteil, dass sie in höherer Konzentration und größerer Reinheit vorliegen und zudem leichter zu charakterisieren

sind. Man sollte allerdings vor Einsatz der Antikörper bedenken, dass die Testmethoden zur Auswahl geeigneter Antikörper und zu deren Qualitätskontrolle identisch sind mit den Verwendungsmethoden (Lipman et al., 2005).

1.4. Gewinnung von Antikörpern mittels Phage-Display

Phage-Display bezeichnet die Expression von Proteinen wie beispielsweise Antikörper oder Antikörperfragmente auf der Oberfläche von Phagen. Dies wird dadurch bewerkstelligt, dass die Nukleotidsequenz, die für das Antikörpermolekül codiert, in die Phagen-DNA oder über einen Phagemid-Vektor in die Phagen eingebracht wird. Hierbei ist die Sequenz für den Antikörper mit einem Gen fusioniert, welches für ein Oberflächenprotein des Phagen codiert. Damit wird der Antikörper auf der Phagenoberfläche präsentiert (Willats, 2002). Durch die Analyse der primären Aminosäuresequenz der häufigsten Antikörpermoleküle konnten Phagen-Antikörper-Bibliotheken durch das Einbringen entsprechender DNA-Sequenzen in die Phagen hergestellt werden. Hierbei wurde eine enorm hohe Diversität verschiedener AK-Moleküle erreicht (Knappik et al., 2000). Die Phage-Display-Technologie wird bereits vielseitig zur Analyse von Proteinen, zur Aufklärung von Zell-Vorgängen auf molekularer Ebene, vor allem aber auch zur Generierung rekombinanter Antikörper gegen Zielantigene eingesetzt. Das Prinzip des Phage-Displays beinhaltet nun zwei Schritte, das Panning und das Screening. Für das Panning wird zuerst die Antikörperbibliothek mit dem gewünschten Antigen inkubiert. Während die nicht gebundenen Phagen abgewaschen und verworfen werden, können die gebundenen Phagen eluiert und durch Infektion von E.coli Bakterien amplifiziert werden. Nach der Amplifikation kann in Wiederholungen dieses ersten Schrittes der Anteil spezifischer Binder in der Phagenpopulation weiter angereichert werden. Im anschließenden Screening wird eine zufällige Auswahl der Antikörperbindenden Phagenklone der jeweiligen Selektionsrunde auf Affinität zur Zielstruktur untersucht, zum Beispiel durch ELISA. Dazu können auch die codierenden Antikörpersequenzen der Phagenpopulation einer Selektionsrunde in Proteinexpressionsvektoren für E.coli kloniert und als rekombinante Antikörper exprimiert werden (Kretzschmar und von Rüden, 2002).

1.5. Mantelzelllymphom und Lymphomdiagnostik

Das Mantelzelllymphom (MCL) ist ein sogenanntes niedrig malignes Non-Hodgkin-Lymphom (NHL) der B-Zell-Reihe und macht durchschnittlich einen Anteil von 5% aller NHL aus. Es tritt vorwiegend im höheren Lebensalter auf mit einem Altersgipfel zwischen dem 60. und 70. Lebensjahr und unter den Betroffenen überwiegt leicht das männliche Geschlecht (2:1).

Das MCL, auch als zentrozytisches Lymphom bezeichnet, nimmt seinen Ursprung nicht wie zuerst angenommen von den Zentrozyten des Keimzentrums eines Lymphfollikels, sonder vielmehr von einer kleinen Subpopulation von Zellen in der Mantelzone.

In seiner Morphologie zeigt das MCL charakteristischerweise ein monomorphes Zellbild kleiner bis mittelgroßer lymphoider Zellen mit irregulären, teils gekerbten Kernen, groben Chromatinstrukturen und schmalem Zytoplasmasaum. Zwischen den Tumorzellen werden eingestreute Histiozyten, ein loses Netzwerk dendritischer Zellen sowie hyaline Ablagerungen um kleine Blutgefäße herum gefunden. Die Tumorzellen präsentieren auf ihrer Oberfläche IgM- und IgD-Moleküle sowie normale B-Zell-Antigene CD19, CD20 und CD22. Charakteristisch ist allerdings immunhistochemisch eine Positivität für CD5 und eine Negativität für CD23. Auch wenn hiervon aberrante Immunphänotypen auftreten (CD5 negativ und CD23 positiv), unterscheidet sich das MCL dadurch von den meisten anderen malignen B-Zell-Lymphomen (Wohlschläger et al., 2003). Typischerweise zeigt das MCL eine Translokation t(11;14)(q13;q32) die einem Rearrangement des bcl-1 Genlocus auf Chromosom 11 an den Immunglobulin-Schwerkettenlocus auf Chromosom 14 entspricht und zu einer Überexpression des Cyclin-D1-Proteins führt, welchem eine wesentliche Rolle in der Regulation des Zellzyklus zukommt. Als Proliferationsmarker gelten die Mitoserate und der Ki-67-Index.

Man kann das MCL nach zytomorphologischen Kriterien und nach Wachstumsmuster weiter unterteilen. Hierbei unterscheidet man einen klassischen von den weniger häufig vorkommenden kleinzelligen, pleomorphen und blastischen Subtypen, bzw. Lymphome mit einem nodulären, einem diffusen und einem sogenannten Mantelzonen-Ausbreitungsmuster. Die noduläre Form zeigt gelegentlich zusätzlich das Ausbreitungsmuster in der Mantelzone, d. h. ein perifollikuläres Wachstum um reaktive Keimzentren bzw. um deren Reste. In Untersuchungen zur prognostischen Signifikanz histopathologischer Kriterien konnte gezeigt werden, dass ein nodulärer Subtyp mit einer geringfügig besseren Prognose, während das Vorkommen hoher Proliferationsraten (hohe

Mitoserate und starke Ki67-Expression) mit einer kürzeren Überlebenszeit einhergeht (Tiemann et al., 2005).

Das MCL gehört zu den primär nodal auftretenden NHL, da es sich meist in Lymphknoten manifestiert. Aber auch die Milz und das Knochenmark sind häufig betroffen. Als extranodale Lokalisation ist mit relativer Häufigkeit auch der Magen-Darm-Trakt involviert. Klinisch tritt es meist erst im Stadium III oder IV in Erscheinung mit Lymphadenopathie, deutlicher Hepatosplenomegalie und eventuell vorhandener B-Symptomatik. Obwohl es formal zu den niedrig malignen NHL zählt, hat das MCL doch eine insgesamt schlechte Prognose. So liegt die mittlere Überlebenszeit lediglich bei 3-5 Jahren, was zum einen an dem bislang unzureichenden Ansprechen auf Standardtherapien und zum anderen an dem meist schon fortgeschrittenen Stadium bei Diagnosestellung liegt (Cotran et al., 1999; Jaffe et al., 2001; Feller und Diebold, 2004).

1.6. Fragestellung

In der Histologie und Histopathologie ist für die Aufarbeitung sowie die Archivierung von Geweben die Fixierung in Formalin und die Einbettung in Paraffin lange schon praktiziertes Standardverfahren. Für die Immunhistochemie an solchen FFPE-Gewebeschnitten benötigt man daher eine Reihe verschiedener Antikörper, die ihr Epitop auch an fixiertem Gewebe erkennen, in welchem die Proteine durch Fixierungsvorgänge eventuellen Veränderungen wie Denaturierung und Quervernetzung unterliegen. Obwohl Untersuchungen zu den molekularen Vorgängen bei der Fixierung angestellt wurden (Sompuram et al., 2004, 2006 a, b), sind diese nach wie vor nicht vollständig verstanden. Und auch wenn einige Methoden des sogenannten Antigen-Retrieval wie die Behandlung mit verschiedenen Puffern in Kombination mit Hitzebehandlung angewandt werden (Shi et al. 1997, 2001), existiert bislang nur eine vergleichsweise geringe Menge Antikörper, die ihre Reaktivität am fixierten Gewebe behalten.

Mit der Phage-Display-Technologie, einem *in vitro* Verfahren zur Generierung monoklonaler Antikörper gelang bereits die Herstellung einer Vielfalt verschiedener Antikörper. Dabei wurden nicht nur nativ vorliegende Proteine als Antigene eingesetzt, sondern auch komplexe Antigenstrukturen wie Zellsuspensionen (Palmer et al., 1997) und Gewebeproben (Tanaka et al., 2002). Auch der Einsatz fixierten Normalgewebes und gleichzeitig gerichtete Selektion gegen Zell-Subpopulationen durch Subtraktion an Zellsuspension führte zum Erfolg (Van Ewijk et al., 1997).

In der vorliegenden Arbeit sollte versucht werden, FFPE-Gewebe zur Generierung spezifischer Antikörper im Phage-Display erfolgreich einzusetzen. Hierzu wurde die HuCAL GOLD[®], eine voll synthetische Phage-Antikörper-Bibliothek (Kretzschmar und von Rüden, 2002), für die direkte Selektion an malignem lymphatischem Gewebe mit Subtraktion an Normalgewebe eingesetzt. Als Beispielgewebe dienten Proben eines Mantelzelllymphoms für die positive Selektion und korrespondierend normales lymphatisches Tonsillengewebe zur Subtraktion unspezifischer Binder.

Eine Untersuchung der Binder aus dem Panning konnte nicht an aufgereinigtem Protein im Rahmen eines standardisierten Verfahrens wie zum Beispiel einem ELISA erfolgen, da es sich um eine Selektion gegen unbekannte Proteine handelte. Deshalb sollte ein Hochdurchsatzverfahren für das Screening der gewonnenen Antikörper direkt an FFPE-Gewebeschnitten etabliert werden.

2. Material und Methoden

2.1. Chemikalien

Standardchemikalien wurden von Sigma, Deisenhofen, Deutschland bezogen.

2.1.1. Bakterienkultur

2-YT-Medium:	1000 ml; pH = 7.0	
	16g Bacto-Trypton	
	10g Bacto-Yeast (Hefeextrakt)	
	5g NaCl	
BugBuster (primary amine free)		Novagen US. & Canada
Chloramphenicol	Verdünnung 1:1000	Sigma, Deisenhofen, D
Glucose 40%ig	1%	
	0,1%	
IPTG		Sigma, Deisenhofen, D
PIT (Complete Mini EDTA-free)		Roche Diagnostik GmbH Mannheim, D

2.1.2. Immunhistochemie

Alkohole:	Isopropylalkohol 100 %
	Ethanol 96 %
	Ethanol 70%
Borg Decloaker RTU pH = 9,5	Biocare Medical, Concord, CA, USA
ChemMate Antibody Diluent	Dako, Glostrup, DK
Hämatoxylin	Klinikapotheke der Universität zu Lübeck
HRP-Substrate-Buffer + DAB (= Chromogen)	Dako, Glostrup, DK
Peroxidase-Blocking-Solution H2O2	Dako, Glostrup, DK
Power Block (Universal Blocking Reagent)	BioGenex, San Ramon, USA
Verdünnung 1:10 mit Aqua dest.	

Streptavidin-Peroxidase (HRP)	Dako, Glostrup, DK
Tris	Sigma, Deisenhofen, D
Tween	Merck, Darmstadt, D
Xylol	Klinikapotheke der Universität zu Lübeck

2.1.3. Zellkultur

Accutase	PAA Laboratories GmbH, Linz, A
Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)	Invitrogen, Leek, NL
FCS (Fetal Calf Serum - Fetales Kälber Serum)	PAA Laboratories GmbH, Linz, A
RPMI Medium	PAA Laboratories GmbH, Linz, A
Tert-HME Medium	Clontech-Takara Bio Europe, Saint-Germain-en-Laye, F
Trypsin	PAA Laboratories GmbH, Linz, A

2.1.4. Immunopräzipitation und Westernblot

Acrylamid (30%)	Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe, D
Amidoschwarz	Merck, Darmstadt, D
Ammoniumpersulfat (APS)	Invitrogen, Leek, NL
BCA Protein Assay Kit	Pierce, Rockford, IL, USA
Bromphenol Blau (BPB)	Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg, D
Chemilumineszenz	Pierce, Rockford, IL, USA
Coomassie-Blau	Sigma, Deisenhofen, D
Dynabeads M450 Epoxy	Invitrogen, Leek, NL
Essigsäure	Merck, Darmstadt, D
Glycerin	Merck, Darmstadt, D
Glycin	Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg, D
Isopropanol	Merck, Darmstadt, D
KCl	Merck, Darmstadt, D

KH ₂ PO ₄	Merck, Darmstadt, D
Luziferase Assay Kit	Promega, Madison, WI, USA
Mercapto-Ethanol	Merck, Darmstadt, D
Methanol	Merck, Darmstadt, D
Milchpulver	Fluka Chemie GmbH, Buchs, CH
Na ₂ HPO ₄	Merck, Darmstadt, D
NaCl	Merck, Darmstadt, D
PIT – (Complete Mini)	Roche Diagnostik GmbH Mannheim, D
PVDF- Membran	Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA
SDS	Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg, D
TEMED	Merck, Darmstadt, D
Tris	Sigma, Deisenhofen, D
Tween 20	Merck, Darmstadt, D

2.2. Antikörper

Primärantikörper	Klonalität, Herkunft	Hersteller
AbyD02701-AK	Rekombinanter bivalenter Phage-AK	MorphoSys, München, D
AbyD03517	Rekombinanter bivalenter Phage-AK	MorphoSys, München, D
Anti-CK8-AK	Phage-AK	
Anti CK8-AK (35βH11)	Monoklonal, Maus	Dako, Glostrup, DK
Anti-Histidin-Tag-AK (13/45/31)	Monoklonal, Maus	Dianova, Hamburg, D
Anti-Human-IgG-HRP	Monoklonal, Ziege	Sigma, Deisenhofen, D
Anti-Tubulin-AK	Monoklonal, Maus	Sigma, Deisenhofen, D
Anti-Vimentin-AK (3B4)	Monoklonal, Maus	Dako, Glostrup, DK
Biotinylierter Anti-Maus- / Anti-Kaninchen-AK	Polyklonal, Ziege	Dako, Glostrup, DK

2.3. Lösungen und Puffer

Amidoschwarz-Entfärbelösung	10% Isopropanol, 10% Essigsäure in Wasser
Amidoschwarz-Färbelösung	0,1% Amidoschwarz, 45% Methanol, 10% Essigsäure
Antibody-Diluent	Dako, Glostrup, DK
Antikörperpuffer	1% Milchpulver in 1 x TBS/ 0,2% Tween
Block-Puffer	5% Milchpulver in 1 x TBS/ 0,2% Tween
Elektrophorese-Laufpuffer	25mM Tris, 192mM Glycin, 0,1% SDS
Lämmli-Puffer	8% SDS, 30% Glycerin, 125mM Tris, pH = 6,8
PBS	136mM NaCl, 2,7mM KCl, 10mM Na ₂ HPO ₄ , 1,8mM KH ₂ PO ₄ , pH = 7,4
Sammelgel	3,47 ml H ₂ O, 1,42 ml Sammelgelpuffer, 0,75 ml Acrylamid, 45 µl APS (10% in Wasser), 4,5 µl TEMED
Sammelgelpuffer	125mM Tris, 0,1% SDS, pH = 6,8
TBS	25mM Tris, 140mM NaCl, 2,7mM KCl, pH = 7,4
TNEC	50 mM Tris HCl, pH = 8,0, 150 mM NaCl, 1% Igepal, 2 mM EDTA, 1Tablette/ 10 ml complete mini protease inhibitor
Transferpuffer	25mM Tris, 192mM Glycin, 0,1% SDS, 20% Methanol
Trenngelpuffer	375mM Tris, 0,1% SDS, pH = 8,8
Trenngel 12,5%	3,15 ml H ₂ O, 2,25 ml Trenngelpuffer, 3,6 ml Acrylamid, 75 µl APS (10% in Wasser), 7,5 µl TEMED

2.4. Geräte und Gebrauchsgegenstände

1,5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäß	Eppendorf, Hamburg, D
24-Loch-Polystyren-Platten	Greiner Labortechnik, Solingen, D

8-Kanal-Pipette	Eppendorf, Hamburg, D
96-Loch-Mikrotiterplatten	Greiner Labortechnik, Solingen, D
Beckmann Avanti-30-Centrifuge	Beckmann
Dako Pen	Dako, Glostrup, DK
Deckgläschen	Menzel-Gläser, Braunschweig, D
Eppendorf-Tischzentrifuge	Eppendorf Vertrieb Deutschland GmbH, Köln, D
Färbekammern	
Färberahmen (Fast Frame Multi Slide Plate)	Schleicher & Schuell/ Whatman, Brentford, UK
Filmfolien	Amersham Pharmacia, UK
Gewebekulturschale 100 x 20 mm	Sarstedt Inc., Newton, NC, USA
Gewebekulturschale 150 x 20 mm	Sarstedt Inc., Newton, NC, USA
Heraeus Biofuge 15	Heraeus Instruments GmbH, Hanau, D
Heraeus Laborfuge 400	Heraeus Instruments GmbH, Hanau, D
Heraeus Varifuge 3.0R	Heraeus Instruments GmbH, Hanau, D
Lucy3-Luminometer	Anthos Analytical Apparatus, Inc., Durham, NC, USA
Lucy-Soft Software	Anthos Analytical Apparatus, Inc., Durham, NC, USA
Magnetständer für 1,5 ml Gefäße	Invitrogen, Leek, NL
Manual Tissue Arrayer	Beecher Instruments, Sun Prairie, WI, USA
Mikroskop	Zeiss, Hamburg, D
Multi Gourmet Dampfgarer	Braun, Kronberg, D
Nassblotapparatur	Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA
Neubauer-Zählkammer	Blau Brand, D
Objektträger (Superfrost Plus)	Menzel-Gläser, Braunschweig, D
Objektträger-Eindeckautomat	Medite GmbH, Burgdorf, D
Pipettenspitzen	Sarstedt Inc., Newton, NC, USA
Reagenz- & Zentrifugenröhrchen 15 ml	Sarstedt Inc., Newton, NC, USA
Reagenz- & Zentrifugenröhrchen 50 ml	Greiner Labortechnik, Solingen, D
Schlittenmikrotom	Leica, Solms, D
Schüttler	Heidolph, Schwabach, D

SDS-PAGE-Kammer	PHASE, Lübeck, D
Thermoblock	Biometra, Göttingen, D
Wasserbad	Gesellschaft für Labortechnik mbH, Burgwedel, D

2.5. Antikörperexpression in E.coli

2.5.1. Anzucht der Bakterien und Induktion der Expression

Zur Anzuchtung der E.coli-Bakterien (TG1F) wurde 2YT-Medium mit einer Glucosekonzentration von 1% und Chloramphenicol in einer Konzentration von 0,001% verwendet. Eine 96-Loch-Mikrotiterplatte wurde mit jeweils 200 µl 2YT-Medium befüllt. Die in einer sogenannten 96-Loch-Master-Stock-Platte in Glycerinmedium bei 80°C gelagerten Bakterienklone sind mit Hilfe einer 8-Kanal-Pipette durch Eintauchen der Pipettenspitze auf die jeweils gleichen Positionen in die mit flüssigem 2YT-Medium vorbereiteten 96-Loch-Mikrotiterplatte übertragen worden. Jeweils zwei Vertiefungen einer 96er Platte wurden nicht transferiert, sondern eine davon mit einem bekannten, rekombinant Anti-CK8 Antikörper produzierenden Bakterienklon als Positiv-Kontrolle und die andere nur mit Medium als Negativ-Kontrolle beschickt. Die Platte wurde anschließend für 18 (+/- 2) Stunden in den Wärmeschüttler bei 30°C und 200 UpM gestellt (Übernachtskultur).

Der komplette Ansatz wurde anschließend auf eine neue 96-Loch-Mikrotiterplatte übertragen, die mit 2YT-Medium mit 0,001% Chloramphenicol und einer jetzt niedrigeren Glucosekonzentration von 0,1% bestückt war. In zwei Schritten wurde eine Verdünnung von 1:200 erreicht (das entspricht einmal 10µl in 90µl, daraus wiederum 10µl in 190µl). Die Platte wurde für weitere drei Stunden im Wärmeschüttler belassen (Expressionskultur).

Um die Antikörperproduktion in den E.coli-Bakterien zu induzieren, wurden pro Vertiefung IPTG in einer Endkonzentration von 1mM hinzugefügt. Die Platte wurde anschließend erneut für 20 (+/- 2) Stunden in den Wärmeschüttler bei 30°C und 200 UpM gestellt.

2.5.2. Lysierung der Bakterien

Für die Ernte wurden die Expressionsplatten bei 3000 UpM für 20 Minuten zentrifugiert und der Überstand verworfen. Jeweils 20 µl Bug Buster Lysisreagenz mit Protease-Inhibitor-Zusatz (eine Tablette Protease Inhibitor Cocktail pro 10 ml Bug Buster) wurde pro Vertiefung zum Resuspendieren des Pellets und gleichzeitigen Lysis der Zellen benutzt. Nach 20 Minuten Inkubationszeit bei Raumtemperatur wurde die Platte wieder für 20 Minuten bei 3000 UpM zentrifugiert. Der Überstand, in dem die lösliche Proteinfraction vorlag, wurde in neue 96-Loch-Mikrotiterplatten überführt und entweder direkt weiterverwendet oder bei -20°C zur Aufbewahrung eingefroren.

2.6. Immunhistochemische Färbungen

2.6.1. Tissue-Microarray

Alle Gewebeproben entstammen dem Lymphknotenregister des Instituts für Pathologie der Universität zu Lübeck. Für die Zusammenstellung des Tissue-Microarrays wurden Gewebe mit der Diagnose eines Mantelzelllymphoms sowie Normalgewebe von Pankreas und Tonsille ausgesucht. Aus diesen Gewebeblöcken wurde mittels eines Manual-Tissue-Arrayers (Beecher Instruments, USA) Gewebeproben als Stanzen entnommen und in einem neuen Block angeordnet. In diesem neuen Block waren die Stanzen in Gruppen angeordnet. Eine Gruppe bestand jeweils aus zwei Proben eines Mantelzelllymphoms sowie zwei Proben des Tonsillengewebes und einer Probe von Pankreasnormalgewebe. Pro Block konnten vier dieser Gruppen zusammengestellt werden. Von diesem Block wurden 5 µm dicke Schnitte angefertigt und auf Objektträger aufgezogen, so dass pro Objektträger jeweils vier Arrays zur Färbung zur Verfügung standen.

2.6.2. Färbemethode

Die Schnitte wurden zunächst für 3 x 10 Minuten in Xylol entparaffiniert und anschließend in einer absteigende Alkoholreihe mit 2 x 100%igen Isopropylalkohol, 96%igen Ethanol, 70%igen Ethanol und Aqua dest. rehydriert. Im weiteren Schritt der Antigendemaskierung wurden die Schnitte in Borg Decloaker (Biocare Medical, Concord, CA, USA) bei einem pH-Wert von 9,5 für 45 Minuten in einem Dampfgerät inkubiert. Vor dem Färbvorgang wurden die Arrays für jeweils 10 Minuten mit Universal Blocking Reagent (BioGenex,

San Ramon, USA) geblockt. Als Primärantikörper wurden direkt die Bakterienlysate in Antibody Diluent verdünnt eingesetzt und die Schnitte für je 30 Minuten damit inkubiert. Zur Detektion des Primärantikörpers wurde ein Anti-Histidin Tag-Antikörper eingesetzt und für 15 Minuten inkubiert. Die Amplifikation und Detektion des Brückenantikörpers erfolgte mit dem LSAB-Färbekit nach Angaben des Herstellers (Dako): Inkubation mit dem biotinyliertem Antikörper, blocken der endogenen Peroxidase Aktivität mit H₂O₂ und Inkubation mit Peroxidase-gekoppelten Streptavidin.

Die Visualisierung erfolgte mit dem Chromogen DAB für 8 Minuten und anschließender Gegenfärbung mit Hämatoxylin und Bläuen in Wasser für jeweils 3 Minuten.

2.7. Zellkulturen

2.7.1. Verwendete Zelllinien und Kultivierung

Als adhärent wachsende Zellen wurden Hela (Zervixkarzinom), MCF-7 (Adenokarzinom der Mamma), T47D (duktales Mammakarzinom), Tert-HME (immortalisierte Brustdrüsenepithelzellen), U2OS (Osteosarkom) und Capan-2 (Adenokarzinom des Pankreas) verwendet.

Als in Suspension wachsende GRANTA-519 (Mantelzelllymphom), HL60 (AML), L82 (anaplastisches großzelliges T-Zell-Lymphom), U-937 (Histiozytisches Lymphom), SU-DHL (B-Zell-Lymphom), DOHH-2 (Immunoblastisches Lymphom), HEC (Adenokarzinom des Endometriums), Karpas 299 (anaplastisches großzelliges T-Zell-Lymphom), sowie normale B-Lymphozyten. L82 ist eine etablierte Zelllinie der eigenen Arbeitsgruppe (Merz et al., 2002). Tert-HME wurden von Clontech-Takara Bio Europe, Frankreich, alle anderen Zelllinien von ATCC, Manassas, VA, bezogen.

Adhärenente Zelllinien wurden in 10 cm Kulturschalen in DMEM mit 10% FCS im Inkubator bei 37°C wasserdampfgesättigt und 5% CO₂ kultiviert. Suspensionszelllinien wurden entsprechend in RPMI mit 10% FCS kultiviert. Tert-HME Zellen wurden in Tert-HME-Medium kultiviert. Die Zellen wurden alle zwei bis drei Tage passagiert. Zum Ablösen der adhärenenten Zellen wurde Trypsin verwendet. Zum Ablösen der Tert-HME Zellen diente Accutase.

2.7.2. Präparation der Zellysate (denaturierend)

Suspensionszellen wurden von der Kulturschale in ein 50 ml Zentrifugenröhrchen überführt, zentrifugiert und das Medium abgesaugt. Anschließend wurde das Zell-Pellet zwei Mal mit PBS gewaschen, zentrifugiert und der Überstand an PBS gründlich abgesaugt. Das verbliebene Pellet wurde in 100 µl 4%iges Lämmli resuspendiert, in ein 1,5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt, bei 95°C für fünf Minuten erhitzt und abschließend für 15 Minuten bei 14.000 UpM zentrifugiert.

Bei adhärennten Zelllinien wurde das Medium von der Kulturschale abgesaugt, die Schalen zwei Mal mit PBS gewaschen und das PBS gründlich abgesaugt. Dann wurden 100 µl 4%iger Lämmli-Puffer direkt auf die Kulturschale gegeben, mit einem Gummispatel verteilt und das Lysat in einem 1,5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäß aufgefangen. Auch hier wurden die Lysate auf 95°C erhitzt und zentrifugiert.

2.7.3. Präparation der Zellysate (nativ)

Die im Hinblick auf die ESI-MS-Analyse verwendeten GRANTA-Zellen wurden zwei Mal mit PBS gewaschen und zentrifugiert. Das Zell-Pellet mit TNEC-Puffer vorsichtig resuspendiert und auf Eis gelagert für 30 Minuten inkubiert. Das Lysat anschließend für weitere 30 Minuten bei 4°C zentrifugiert und der Überstand für die Immunopräzipitation eingesetzt.

2.8. Immunopräzipitation

Als erster Schritt wurden die rekombinanten Antikörper kovalent an die magnetischen M-450 Epoxy Beads gekoppelt. Dazu wurden 300 µl Beads zwei Mal mit PBS gewaschen. Die Beads wurden mit Antikörperlösung entsprechend 100 µg Antikörper resuspendiert und mit PBS auf ein Endvolumen von 350 µl gebracht. Für die Kopplungsreaktion wurden die Beads anschließend für 16 – 20 Stunden auf einem Rotator bei Raumtemperatur inkubiert.

Die Beads wurden dann drei Mal gründlich mit PBS gewaschen und mit 700 µl 3% BSA in PBS für 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert.

Im Anschluss wurden sie noch ein Mal mit PBS gewaschen und mit 300 µl TNEC-Puffer resuspendiert.

Anschließend wurden die Antikörper-gekoppelten Beads mit dem Überstand des nativen TNEC-Lysats für ein bis zwei Stunden bei 4°C inkubiert, anschließend für eine halbe Stunde fünf Mal mit TNEC-Puffer und abschließend ein Mal mit PBS gewaschen.

Das verbliebene Pellet wurde in 30 µl SDS-Puffer aus 4%igem Lämmli und 10%igem β-Mercaptoethanol resuspendiert. Für fünf Minuten bei 95°C erhitzt und im Anschluss zentrifugiert.

2.9. SDS-PAGE

Der Proteingehalt der mittels Lämmli extrahierten Lysate wurde vor der Gelelektrophorese mittels eines standardisierten Kits nach der BCA-Methode (Pierce, Rockford, IL, USA) gemessen. Für die Elektrophorese wurde dann pro Probe 50 µg Gesamtproteingehalt eingesetzt.

Zur Proteinauftrennung der Proben wurde die diskontinuierliche Gelelektrophorese verwendet mit einem 4%igen Sammelgel und einem 12,5%igen Trenngel. Die Proben zum Einlaufen die ersten 60 Minuten bei 63 Volt und für die Auftrennung im Trenngel für weitere 120 Minuten bei 130 Volt in einer Elektrophoresekammer separiert.

Die Probe des GRANTA-Zellysats aus der Immunopräzipitation wurde in zwei Fraktionen aufgeteilt. Eine Probe wurde zur weiteren Analyse mittels Elektrospray-Ionisations-Massenspektrometrie und die zweite für den Westernblot verwendet.

2.10. Westernblot

Die aufgetrennten Proteine wurden für vier Stunden bei 300 mA in einer Blotkammer auf eine PVDF-Membran übertragen. Die Membranen wurden in Blockpuffer über Nacht bei 4°C und leichtem Schütteln geblockt, die Gele mit Coomassie-Blau gefärbt, um die Transfereffizienz zu beurteilen.

Zum Detektieren der Proteine wurde zum einen der rekombinante Antikörper AbyD02701 als Primär- und ein HRP-gekoppelter Anti-Human-Fab-Antikörper als Sekundärantikörper, zum anderen Vimentin- und Tubulin-Antikörper als Primär- und ein HRP-gekoppelter Anti-Maus-IgG-Antikörper als Sekundärantikörper eingesetzt.

Die Membranen wurden anschließend für jeweils 60 Minuten mit dem Primär- und Sekundärantikörper inkubiert und zwischen den Inkubationen in 10 minütigen Intervallen insgesamt 60 Minuten gewaschen. Nach erneutem einstündigem Waschvorgang mit TBS-

Tween wurden die Membranen für fünf Minuten mit dem Chemilumineszenz-Substrat (Pierce, Rockford, IL, USA) inkubiert und im Anschluss für einige Sekunden bis Minuten Filmfolien belichtet.

Die Membranen wurden nach der Filmentwicklung für fünf Minuten mit Amidoschwarz gefärbt, bis die Proteinbanden sichtbar wurden.

2.11. Elektrospray-Ionisations-Massenspektrometrie

Zur weiteren Untersuchung des noch unbekanntes Proteins wurde die mit Coomassie angefärbte Bande unter sterilen Bedingungen aus dem Elektrophoresegel ausgeschnitten und in ein Reaktionsgefäß transferiert. Diese Probe wurde an die Proteome Factory AG in Berlin zur Untersuchung mittels ESI-MS gesandt. Nach Andauung der Gel-Probe mit Trypsin, Anreicherung und Entsalzung der Peptide in einer Säule, werden diese aus der flüssigen Phase unter atmosphärischem Druck in einem elektrischen Feld in die Gasphase überführt. Die positiv geladenen Teilchen werden zur Kathode hin beschleunigt und dort deren Masse-Ladungs-Verhältnis im Massenspektrometer gemessen. Die Ergebnisse wurden mit der Mascot Datenbank (Matrix Science, London, UK) abgeglichen.

3. Ergebnisse

3.1. Subtraktives Phage-Display an Mantelzelllymphom-Gewebe

Die HuCAL GOLD[®] Phage-Antikörper-Bibliothek wurde im Panning mit FFPE-Gewebeproben eines Mantelzelllymphoms in 6 konsekutiven Panning-Runden eingesetzt. In der ersten Panningrunde wurden lediglich entparaffinierte Gewebefragmente des Lymphoms mit der Antikörper-Bibliothek inkubiert, die gebundenen Antikörper eluiert und amplifiziert. In jeder weiteren Runde wurde eine vorhergehende Negativ-Selektion durch Prä-Adsorption mit Tonsillennormalgewebe durchgeführt. Jeweils nach der 4., 5. und 6. Runde wurden die gefundenen Binder in E.coli-Expressionsvektoren kloniert, wodurch keine kompletten Phagen, sondern nur die Antikörperfragmente als bivalente Mini-Antikörper im Periplasma der Bakterien produziert wurden. Insgesamt sollten somit aus der 4. bis 6. Runde 216 zufällig ausgewählte Klone getestet werden (Jarutat et al., 2007).

3.2. Etablierung der Immunhistochemie mit E. coli-Lysaten

Vor Anzucht der Bakterienklone des Phage-Displays erfolgte die Optimierung des Protokolls zur Antikörperexpression mit einem E. coli Klon in kleinem Maßstab, der einen bereits etablierten rekombinanten Anti-CK8-Antikörper im dHLX-Format produziert (AbyD03517 aus einem Kundenprojekt der AbyD-MorphoSys, München; Ergebnisse nicht publiziert).

Zunächst wurden die Bakterien in 2YT Medium angezchtet. Nach Erreichen der lag-Phase im Bakterienwachstum wurden die 5 ml fassenden Vertiefungen einer 24-Loch-Expressionsplatte mit einer Verdünnung der Bakteriensuspension von 1:200 beimpft, bevor die Antikörperproduktion durch Zusatz von IPTG induziert wurde.

Die Ernte der Antikörper durch Lyse der Zellen mittels Bug Buster wurde sowohl mit Einsatz eines Protease Inhibitor Cocktails, als auch ohne diesen als Zusatz ausgetestet und die gewonnenen Lysate an verschiedenen vorbehandelten Pankreas-Gewebeschnitten ausgetestet. Hier wurde die Qualität im Vergleich mit dem zu erwartenden, typischen Färbemusters durch den etablierten, murinen Anti-CK8-Antikörper (35 β H11, Dako, Glostrup, DK) im Sinne einer Markierung von Pankreasausführungsgangepithelien beurteilt.

Wir haben uns für die Beibehaltung des Einsatzes des Protease Inhibitor Cocktails für alle weiteren Anzüchtungsschritte entschieden, obwohl lediglich ein minimaler Unterschied im Färbemuster auszumachen war.

Die erste Anzucht der Bakterienklone der 5. Phage-Display-Runde erfolgte zunächst auch nach dem Schema in den 24-Loch-Expressionsplatten. Die Menge des gewonnenen Lysats betrug bei diesem Protokoll 370 µl. Aufgrund des Vorteils der geringen Menge benötigter Antikörper beim Einsatz in den immunhistochemischen Färbungen konnte die Antikörpergewinnung weiter optimiert werden. Das Protokoll konnte für die weitere Anzucht in 96-Loch-Mikrotiterplatten hochskaliert werden. Die Verdünnung der Bakteriensuspension von 1:200 vor der Induktion der Antikörperproduktion sowie die Lyse mittels Bug Buster und dem Einsatz eines Protease Inhibitor Cocktails wurde dabei beibehalten.

3.3. Bestimmung der optimalen Antikörperkonzentration mittels Titrierung

Vor der Austestung der unbekanntenen Antikörper wurden mit dem rekombinanten CK8-Antikörper (AbyD03517, MorphoSys, München, D) verschiedene Verdünnungsstufen ausgetitriert und Pankreasnormalgewebe gefärbt, um die optimale einzusetzende Antikörperkonzentration zu ermitteln. Die Antikörper zeigten bei einer Verdünnungsstufe von 1:400 eine gute Reaktivität bei einem guten Signal-Rausch-Verhältnis (siehe Tabelle 1). Diese Verdünnung wurde für die folgenden Färbeexperimente benutzt.

Verdünnungsstufe	Anfärbung der Ausführungsgänge	Anfärbung der Azinuszellen	Anfärbung der Inselzellen	Anfärbung sonstiger Strukturen
1:50	++	++	++	1,2,3
1:100	++	++	++	1,2,3,4
1:200	+	++	+	1,2,3
1:400	+	+	(+)	(1,3)
1:500	(+)	+	(+)	(1,3)
1:1000	(+)	(+)	-	-

Legende:			
++	Starke Anfärbung	1	Endothel
+	Gute Anfärbung	2	Myozyten
(+)	Schwache Anfärbung	3	Fibrozyten
-	Keine Anfärbung	4	Adipozyten

Tabelle 1: Zusammenfassung der Auswertung einzelner Verdünnungsstufen.

3.4. Etablierung des Tissue-Microarray-Screenings

Die Gewebeproben für die immunhistochemischen Färbungen stammen aus dem Lymphknotenregister des Instituts für Pathologie der Universität zu Lübeck. Für die Austestung der Phage-Antikörper wurden verschiedene Arrays aus Stenzen der jeweiligen Gewebeproben zusammengestellt, wobei auf jedem Array eine Zusammenstellung von Mantelzelllymphomgewebe und Normalgewebe von Tonsille und Pankreas vorhanden war. Das Tonsillengewebe diente hier zum Vergleich, welche Art lymphatischer Zellen durch den jeweiligen Antikörper eventuell am Mantelzelllymphomgewebe angefärbt werden, da es auch schon zur Negativ-Selektion bei der Gewinnung der Antikörper im Phage-Display eingesetzt wurde. Das Pankreasgewebe wurde einerseits ausgewählt als Vergleichsmöglichkeit der immunhistochemischen Färbungen der unbekannt Antikörper mit einem nicht-lymphatischen Normalgewebe, andererseits als Möglichkeit zur Kontrolle mit dem bereits etablierten Anti-CK8-Antikörper.

Anfangs wurde zur Etablierung und Überprüfung des Anzuchtergebnisses für jeweils einen Array ein einzelner Phage-Antikörper mit guten Ergebnissen für die Färbungen eingesetzt. Um jedoch die Testung einer größeren Anzahl unbekannter Antikörper effizienter zu gestalten, wurden zwei unterschiedliche Verfahren im weiteren Verlauf eingesetzt.

Zum einen erfolgte eine gepoolte Austestung der Phage-Antikörper. Das heißt ein Array wurde mit einem Primärantikörpermisch inkubiert, das bei insgesamt gleich bleibendem eingesetztem Volumen pro Array jeweils zu gleichen Teilen Lysat von vier verschiedenen Klonen enthielt. Zeigte sich in der folgenden Auswertung der Arrays ein positives Färbeergebnis, so wurde jeder der vier Antikörper erneut auf einem Array separat getestet. Diese Methode stellte sich als besonders günstig für die Testung der Antikörper der 4. Phage-Display-Runde dar, da in dieser Runde die Anzahl der Antikörper mit positivem Färbeergebnis relativ gering war im Vergleich zu den beiden folgenden Phage-Display-Runden.

Ein weiterer Ansatz war die Variation der Arrays, die mit dem Manual Tissue Arrayer hergestellt wurden. Der erste Array enthielt pro Objektträger noch jeweils acht Stenzen eines Mantelzelllymphomgewebes, sowie jeweils vier Stenzen von Tonsillen- und Pankreasnormalgewebe. Die Anzahl der Gewebestenzen pro Array wurde reduziert auf jeweils zwei Lymphom- und Tonsillengewebeproben, sowie eine Pankreasgewebeprobe. Somit entstand eine Kombination aus je fünf Gewebestenzen. Dafür wurde diese Zusammenstellung in vierfacher Ausführung auf einen Objektträger aufgebracht. Die

Abstände zwischen den einzelnen Stanzen und den gruppierten Gewebestanden wurden so gewählt, dass sich die so entstandenen Arrays genau in die Aussparungen des Spanngitters des Fast[®] Frame Färberahmen (Schleicher & Schuell / Whatman, Brentford, UK) einpassten, sodass isolierte, kompartimentierte Subarrays entstanden. Somit konnten auch mit dieser Methode jeweils vier Phage-Antikörper pro Objektträger gleichzeitig getestet werden (siehe Abb.2).

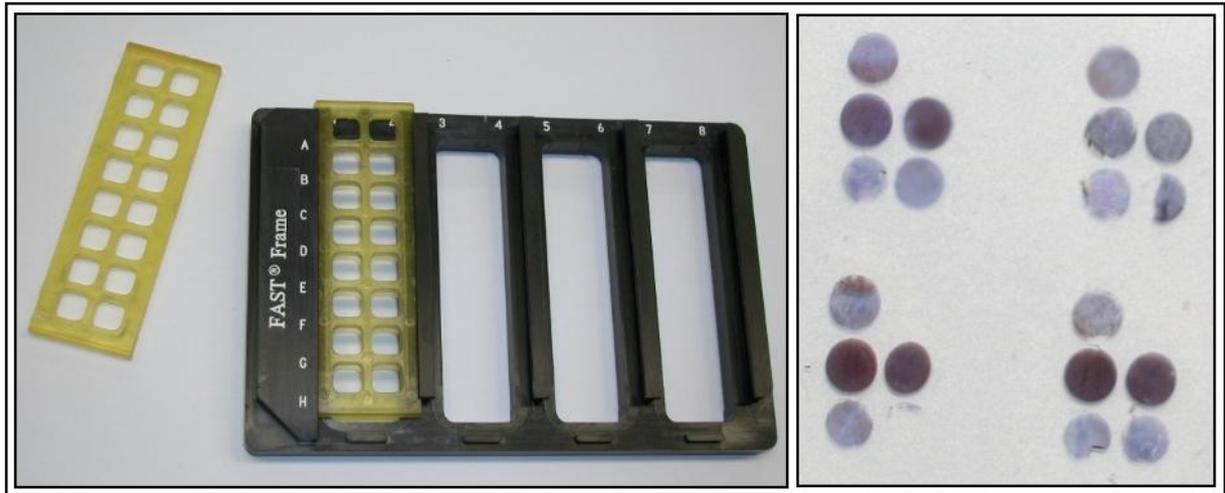


Abb.2: Fast[®] Frame Färberahmen und gefärbter Tissue-Microarray.

3.5. Mikroskopische Auswertung der Tissue-Microarrays

Die Analyse erfolgte anhand der lichtmikroskopischen Auswertung der Färbeergebnisse. Als erstes Kriterium für eine Einteilung wurde die Anfärbung von Zellen des Mantelzelllymphoms auf dem Array durch den Antikörper begutachtet. Hierbei wurde nicht die Intensität der Färbung, sondern die Anfärbung an sich beachtet.

Als nächstes Einteilungskriterium diente die Färbung von Zellen des Lymphfollikels in der Tonsille. Hierbei wurde unterschieden, ob Zellen im Keimzentrum oder Zellen der Mantelzone des Follikels oder Zellen sowohl im Keimzentrum als auch in der Mantelzone angefärbt wurde.

Zur weiteren Unterscheidung wurden anschließend alle weiteren angefärbten Gewebestrukturen begutachtet, die den Großteil der Hintergrundfärbungen ausmachten. Häufig angefärbt wurden Endothelzellen, Histiozyten sowohl im Keimzentrum der Lymphfollikel als auch im Mantelzelllymphomgewebe, Basalzellen des Epithels sowie intraepitheliale Zellen, die am ehesten als Lymphozyten identifiziert wurden.

Weiterhin wurde das Färbemuster des Pankreasgewebes beurteilt. Es gab Unterschiede hinsichtlich der Anfärbung der exokrinen Drüsenanteile, der Inselzellen oder des Ausführungsgangsystems des Pankreasgewebes. Es wurde jedoch lediglich eine positive oder insgesamt negative Anfärbung gewertet (siehe Tabelle 2).

4. Runde des Phage-Display (96 Klone)

Anzahl der MCL-positiven Klone	Anfärbung des Keimzentrums	Anfärbung der Mantelzone / interfollikulär	Anfärbung sonstiger Strukturen
2	-	+	1; 3
1	-	(+)	1; 4

5. Runde des Phage-Display (72 Klone)

Anzahl der MCL-positiven Klone	Anfärbung des Keimzentrums	Anfärbung der Mantelzone	Anfärbung sonstiger Strukturen
7	-	+	1; 2; 3; 5; 6; 7
4	-	+	1; 2; 5
3	-	-	1; 4
1	+	+	1; 3; 7

6. Runde des Phage-Display (48 Klone)

Anzahl der MCL-positiven Klone	Anfärbung des Keimzentrums	Anfärbung der Mantelzone	Anfärbung sonstiger Strukturen
39	-	+	1; 2; 3; 5; 7
7	+	+	1; 3; 5; 7

Auswertung nach den einzelnen Runden des Phage-Displays

MCL-positiv = Anfärbung von Zellen des Mantelzelllymphoms

Anfärbung sonstiger Strukturen:	
1	Endothel
2	Histiozyten
3	Epithel
4	Basalzellen des Epithels
5	Intraepitheliale Lymphozyten
6	Interfollikuläre Zellen
7	Pankreasgewebe

Tabelle 2: Zusammenfassung der Ergebnisse der mikroskopischen Auswertung der einzelnen Antikörperklone verschiedener Panningrunden.

Insgesamt wurden 216 Klone aus der 4. bis 6. Runde des Phage-Displays in der Immunhistochemischen Färbung getestet. Der Anteil der insgesamt 64 Antikörper, die Zellen des Mantelzelllymphomgewebes anfärbten, steigerte sich in jeder Runde des Phage-Displays. In der 4. Runde betrug deren Anteil noch 3,1% der getesteten Antikörper (3 positive / 96 getestete). In der 5. Runde waren es 21% (15 / 72) und in der 6. Runde 96% (46 / 48).

In der 4. Runde wurden drei Antikörper mit zwei verschiedenen Färbemustern gefunden. Die größte Diversität hinsichtlich des Färbemusters der Antikörper, die auch Lymphomzellen anfärbten, zeigte sich in der 5. Runde. Teils fanden sich die gleichen Muster sowohl in der 4. als auch in der 6. Runde wieder. In der 6. Runde war fast jeder getestete Antikörper positiv, es zeigten sich allerdings im Wesentlichen nur zwei unterschiedliche dominante Typen. Einer davon färbte sowohl Zellen des Keimzentrums, als auch Zellen der Mantelzone sehr stark an und konnte auch schon in der 5. Runde identifiziert werden (siehe Tabelle 3; siehe Abb. 9 – 24 im Foto-Anhang).

Phage-Display-Runde	Anzahl getesteter Klone	Anzahl positiver getesteter Klone (%)	Anzahl verschiedener Färbemuster
4	96	3 (3,1%)	2
5	72	15 (21%)	4
6	48	46 (96%)	2

Tabelle 3: Zusammenfassung der Ergebnisse des immunhistochemischen Screenings.

3.6. Proteinisolierung und Analyse

Aus den Ergebnissen der Immunhistochemie wurde ein Antikörper der 5. Runde (AbyD02701) ausgewählt, der die Zellen der Mantelzone eines Lymphfollikels anfärbte, das Keimzentrum allerdings aussparte, also diejenige Zellen färbte, die als Vorläuferzellen des Mantelzelllymphoms gelten. Gleichzeitig zeigte er ein gutes Verhältnis zwischen Farbeintensität des Lymphomgewebes zu den sonstigen Strukturen des umgebenden Gewebes, von denen Endothel, Histiozyten und intraepithelial gelegene Lymphozyten angefärbt wurden.

Dieser Antikörper wurde uns von MorphoSys (München, D) in aufgereinigter Form mit definiertem Proteingehalt zur Verfügung gestellt. Das durch diesen Antikörper erkannte Antigen wurde mittels Immunopräzipitation und anschließender elektrophoretischer Auftrennung (SDS-PAGE) isoliert. Die Bande mit dem enthaltenen Antigen erschien in der

Aufteilung der Proteine bei einem Molekulargewicht von circa 54 Kilodalton (siehe Abb.3).

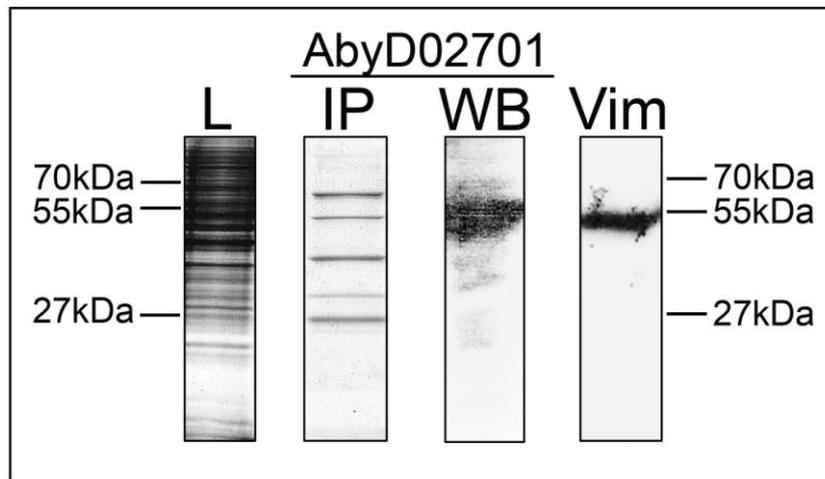


Abb.3: Westernblot und Immunopräzipitation mit dem Antikörper AbyD02701 und Vimentin-Antikörper Vim 3B4 an kultivierten GRANTA-Zellen; L = reines Zell-Lysat, Coomassie-Blau gefärbt; IP = AbyD02701 Immunopräzipitation, Coomassie-Blau gefärbt; WB = Westernblot des Zell-Lysats mit AbyD02701; Vim = Westernblot des Zell-Lysats mit Vimentin-Antikörper Vim 3B4.

Diese Bande wurde aus dem Polyacrylamidgel unter sterilen Bedingungen entnommen zur weiteren Identifizierung mittels Elektrospray-Ionisations-Massenspektrometrie. Diese Analyse der Bande ergab, dass das von dem Antikörper erkannte Protein eine signifikante Übereinstimmung von ca. 51% mit Vimentin hat (siehe Abb. 25 im Foto-Anhang).

Vergleichende Färbungen an den Tissue-Microarrays mit dem rekombinanten Antikörper (AbyD02701) und einem Vimentin-Antikörper (3B4, Dako-Cytomation), der in der Routinediagnostik eingesetzt wird, ergab das gleiche Färbemuster (siehe Abb. 26 und 27 im Foto-Anhang).

3.7. Vergleich der Vimentin-Expression in verschiedenen Zelllinien

Es wurde ein Westernblot mit Proben aus verschiedenen Zelllinien auf die Expression des von unserem Phage-Antikörper erkannten Antigens untersucht. Es waren zum einen Teil Zelllinien von Karzinomen und zum anderen Teil Zelllinien verschiedener Lymphome (siehe 2.7.1.). In allen untersuchten Zelllinien konnte eine Expression des Antigens in unterschiedlicher Quantität dokumentiert werden.

Dieselben Proben wurden zum direkten Vergleich mit einem Vimentin-Antikörper aus der Routinediagnostik untersucht (3B4, Da Dako, Glostrup, DK). Lediglich die Proben der

Zelllinie T47D (duktales Mammakarzinom) zeigten ein eher schwaches Signal mit dem Vimentin-Antikörper, ansonsten ergab sich eine gute Übereinstimmung der Banden (siehe Abb.4 und 5).

Weiterhin wurden Proben der GRANTA-Zellen mit Proben von humanen B-Lymphozyten aus einer Spenderblutprobe auf die Expression des Antigens verglichen. Auch hierbei zeigte sich eine gute Übereinstimmung der detektierten Banden (siehe Abb.6).

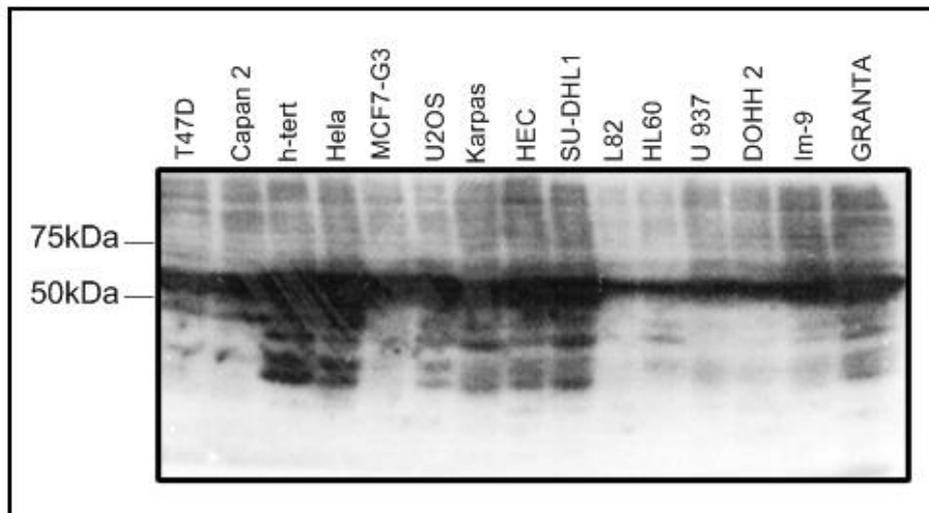


Abb.4: Westernblot der Lysate verschiedener kultivierter Zelllinien (siehe Abschnitt 2.7.1.) mit dem Antikörper AbyD02701.

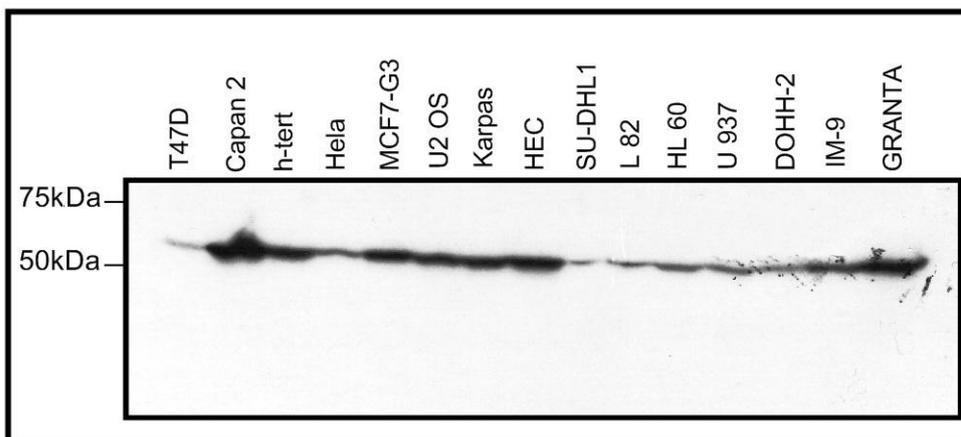


Abb.5: Westernblot der Lysate verschiedener kultivierter Zelllinien (siehe Abschnitt 2.7.1.) mit dem Vimentin-Antikörper Vim 3B4.

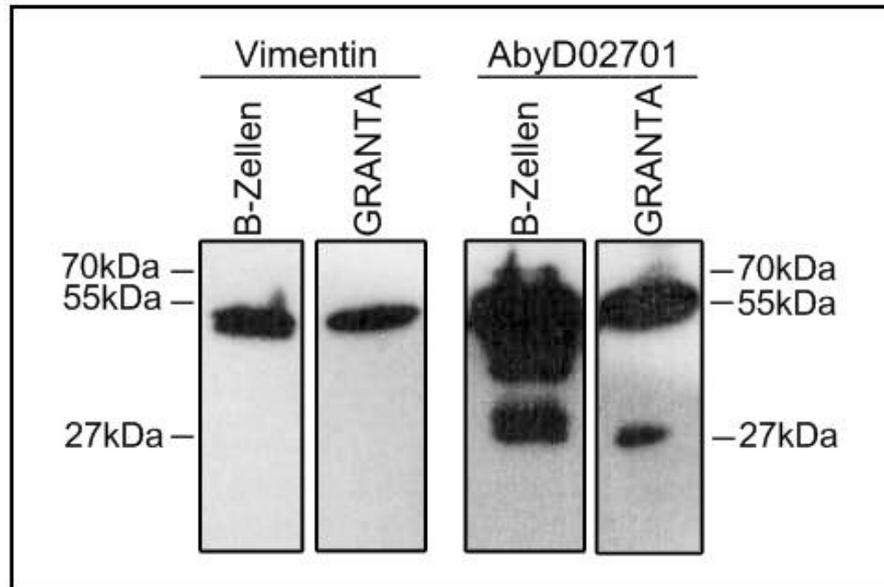


Abb.6: Westernblot der Lysate in Spenderproben gewonnener B-Lymphozyten und kultivierter GRANTA-Zellen mit dem Antikörper AbyD02701 und dem Vimentin-Antikörper Vim 3B4.

4. Diskussion

Die Immunhistochemie im Rahmen der Histopathologie ist ein lange etablierter Bestandteil der Pathologie. Die Antikörper, die hier zum Einsatz kommen, nehmen also einen hohen Stellenwert in der täglichen Routinediagnostik ein. Das breitgefächerte Spektrum an Verwendungsmöglichkeiten auch in vielen anderen Bereichen der Medizin und der Forschung zeigt weiter deren Wichtigkeit. Demzufolge kommt den Herstellungsverfahren und der Suche neuer, möglichst krankheitsspezifischer Antikörper ein besonderes Interesse zu. Mit dem Phage-Display steht ein in hohem Maße variables *in vitro* Verfahren zur Generierung von Antikörpern zur Verfügung.

Wir konnten in der zugrunde liegenden Arbeit zeigen, dass nicht nur native Antigene, sondern auch FFPE-Gewebeschnitte mit komplexen Antigenstrukturen, wie sie in der Histopathologie Verwendung finden, im Phage-Display erfolgreich eingesetzt werden können. Auf diesem Wege gelang es, hochaffine spezifische monoklonale Antikörper zu generieren.

Wir erhielten eine Vielzahl nicht-charakterisierter Antikörper gegen unbekannte Proteine der Gewebeproben. Um diese zu untersuchen, entwickelten wir ein immunhistochemisches Screeningverfahren. Dazu wurde am Institut ein Tissue-Microarray entworfen, die Phage-Antikörper direkt in Färbeprotokollen eingesetzt und die Arrays mikroskopisch ausgewertet.

Die Vielzahl positiver Klone wurde nach dem jeweiligen Färbemuster eingeteilt und ein repräsentativer Klon mit einem günstigen Signal-Rausch-Verhältnis zur weitergehenden Analyse ausgewählt. Hierbei stellte sich heraus, dass der gefundene Antikörper spezifisch gegen Vimentin gerichtet ist.

Die wichtigsten Punkte werden im Folgenden noch näher diskutiert:

1. Die Bedeutung der Antikörper vor allem in der Pathologie und den Stellenwert des Phage-Displays als rekombinantes Verfahren zur Herstellung von Antikörper und dessen Vorteile gegenüber konventionellen Methoden.
2. Im Rahmen der Variation des Phage-Displays durch den Einsatz komplexerer Antigenstrukturen wie Zellsuspensionen und Gewebefragmente die erfolgreiche Verwendung von fixiertem Gewebematerial.
3. Das immunhistochemische Screeningverfahren mit einem am Institut erstellten Tissue-Microarray als High-Throughput-Testmethode.
4. Das Vorkommen und die Bedeutung von Vimentin und Vimentin-Antikörpern.

5. Ein Ausblick zum Stellenwert des Phage-Displays und der Verwendung der Phage-Antikörper in anderen Bereichen als der Immunhistochemie.

4.1. Antikörper – Verwendung und Herstellung

Gerade in der Pathologie wurden durch den Einsatz von Antikörper die diagnostischen Möglichkeiten erweitert. So ist beispielsweise deren Verwendung in der Immunhistochemie zur Identifizierung und Klassifizierung verschiedener Krankheitsentitäten schon lange etabliert und aus der täglichen Routinediagnostik nicht mehr wegzudenken. Vor allem neoplastisch veränderte Zellen und Gewebe können mit Hilfe immunhistochemischer Methoden weiter differenziert werden, als es histomorphologische Kriterien oder das Färbeverhalten in konventionellen Färbetechniken zulässt, da bestimmte Antigene teils krankheitsspezifisch auftreten. Der Nachweis der Expression verschiedener Proteine beziehungsweise das Auftreten bestimmter Oberflächenrezeptoren konnte zum Beispiel zur weiteren Subklassifizierung von Lymphomen, was auch von relevanter Bedeutung für die Prognose ist (Hans et al., 2004), und zur Erstellung von Phänotyp-Profilen zu deren Klassifizierung beitragen. Im Laufe der letzten Jahrzehnte kamen dabei sowohl Methoden der Immunhistologie als auch die Verwendung von cDNA-Arrays zum Einsatz (Picker et al., 1987; Hsi und Yegappan, 2001).

Zur Generierung von Antikörper stehen nun die konventionelle Methode und das Phage-display als eine *in vitro*-Methode gegenüber. Bei der konventionellen Herstellung sowohl polyklonaler als auch monoklonaler Antikörper werden Tiere eingesetzt. Hierzu werden unter anderem Kaninchen, Mäuse oder Ziegen mit dem jeweiligen Antigen immunisiert. Zur Gewinnung polyklonaler Antikörper wird ein gereinigtes Antigen oder ein Gemisch aus Antigen und Adjuvanz dem Tier injiziert, um eine entsprechende Immunreaktion und die Produktion von Antikörpern zu induzieren, die dann nach ca. 4 – 8 Wochen aus dem Serum der Tiere gewonnen werden können. Zur Herstellung monoklonaler Antikörper werden gleichfalls Tiere, meist Mäuse, mit dem jeweiligen Antigen immunisiert. Die antikörperproduzierenden B-Zellen werden aus der Milz des Tieres gewonnen, mit immortalisierten Myelomzellen zu Hybridomazellen fusioniert. Aus der Kultur dieser Hybridomazellen können nun die Antikörper gewonnen werden. Dieser gesamte Vorgang dauert in etwa 3 – 6 Monate (Leenaars und Hendriksen, 2005).

Die ersten Erfolge im Hinblick auf die Technik des Phage-Displays wurden erzielt durch die Ermöglichung, klonierte Antigene von Phagen produzieren und durch Fusion mit Phagenproteinen an deren Oberfläche präsentieren zu lassen (Smith, 1985). Diese Technik wurde dahingehend variiert, dass die antigenbindenden Domäne von Antikörpern auf der Phagenoberfläche präsentiert wurde (McCafferty et al., 1990). Die Verfahren der Herstellung rekombinanter Antikörper wurden auch dadurch vorangetrieben, dass es gelang, Antikörperfragmente als sogenannte Miniantikörper im scFv-Format zu klonieren und in E.coli Bakterien produzieren zu lassen. Darüber hinaus konnten diese durch den Einbau verschiedener Verbindungsdomänen zu Di- bis Tetrameren miteinander verbunden werden, so dass die Produktion von bi- und multivalenten Antikörpern mit einer hohen funktionellen Affinität gelang (siehe Abb.7) (Plückthun und Pack, 1997).

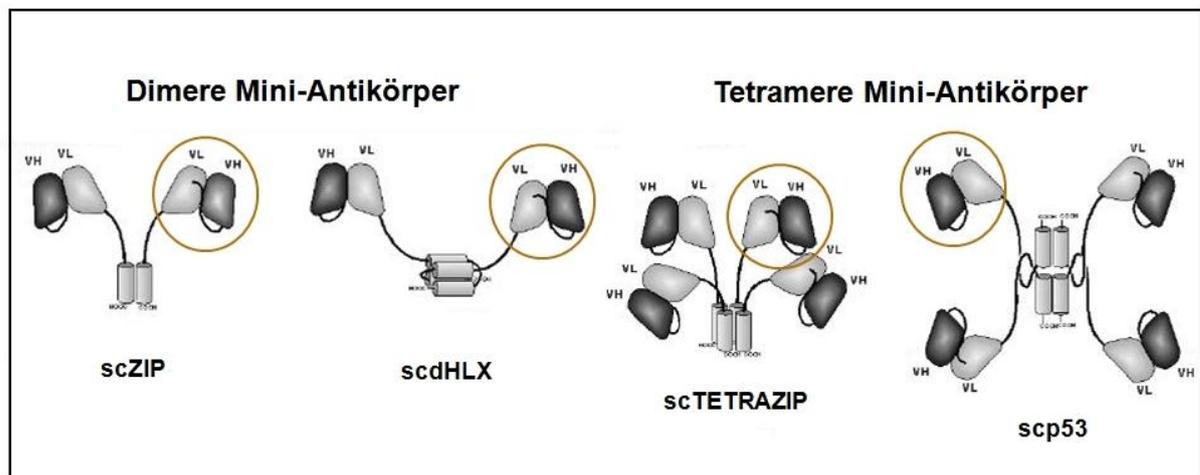


Abb.7: Dimere und tetramere Mini-Antikörperformate (umgezeichnet nach Plückthun und Pack, 1997).

Durch Analyse der am häufigsten auftretenden Strukturen und verwendeten Aminosäuresequenzen der Antikörper des menschlichen Immunsystems konnte eine voll synthetische Antikörperbibliothek erstellt werden (Knappik et al., 2000). Die HuCAL Gold[®] Bibliothek (Human Combinatorial Antibody Library, MorphoSys, München, D), die in dieser Arbeit verwendet wurde, beruht auf diesen Erkenntnissen und entspricht mit einer Diversität von circa $1,6 \times 10^{10}$ ungefähr der des humanen Immunsystems. Ein Vorteil dieser Bibliothek besteht in der Technik des CysDisplay. Hierbei werden die Antikörper über eine Disulfidbrücke mit dem Oberflächenprotein pIII der Phagen verbunden präsentiert, wodurch das Eluieren der an das Antigen gebundenen Phagen durch einfaches Beifügen reduzierender Agenzien erreicht werden kann und damit spezifisch gebundenen Phagen-Antikörper relativ leicht für weitergehende Untersuchungen wie deren Screening

beziehungsweise deren Anreicherung in weiteren Display-Runden zur Verfügung stehen während die Selektion unspezifisch gebundener Antikörper reduziert wird.

In vielerlei Hinsicht bietet die Methode des Phage-Displays als ein Verfahren zur Generierung rekombinanter Antikörper einige Vorteile gegenüber den konventionellen Verfahren. Zum einen kann auf Tierversuche verzichtet werden. Zum anderen können durch die zur Verfügung stehende Phage-Bibliothek maßgeschneiderte Antikörper in einer hohen Ausbeute und mit einer hohen Qualität auch bezüglich der Affinität im Gegensatz zu den konventionellen Verfahren innerhalb einer kurzen Zeitspanne von circa 1 – 2 Wochen hergestellt werden. Ein weiterer wesentlicher Vorteil ist die Verwendung von *E. coli* Bakterien als Produzenten und die relative Einfachheit diese zu handhaben. Hierzu gehört auch die Klonierung der Gene in Expressionsvektoren und deren stabile Transformation in Bakterien sowie die Induzierbarkeit der Expression durch Einfügen von Promotorgenen in die Expressionsvektoren. Die Bakterien sezernieren nun die im scFv-Format produzierten Antikörper in das Periplasma. In der zugrundeliegenden Arbeit wurden Antikörper im dHLX-Format verwendet, das heißt die produzierten scFV-Formate dimerisieren über ein Helix-Turn-Helix-Motiv zu bivalenten Miniantikörpern (Plückthun und Pack, 1997). An dieser Verbindungsdomäne sind sie weiterhin mit einem Myc- und einem His6-Tag versehen über den sie bei deren Einsatz in der Immunhistochemie durch den Brückenantikörper erkannt werden können (siehe Abb.8).

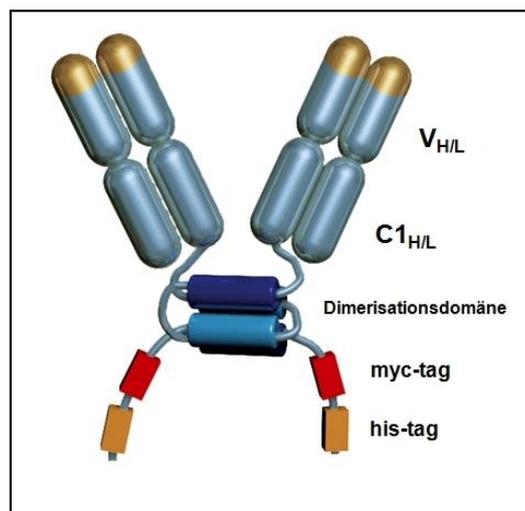


Abb.8: bivalenter Mini-Antikörper im dHLX-Format (mit freundlicher Genehmigung umgezeichnet nach Knappik, MorphoSys, München, D).

In diesem Format nun liegen die im Phage-Display gefundenen Antikörper im Periplasma der Bakterienzellen vor und sind durch die einfache Lyse der Zellmembranen im Überstand vorhanden und direkt einsetzbar für beispielsweise deren Verwendung in der Immunhistochemie. Die als Antikörperproduzenten ausgewählten Bakterienkolonien können als Masterstock-Kolonien bei -80°C aufbewahrt werden und jederzeit aufgetaut, angezüchtet und durch Induktion zur Antikörperproduktion gebracht werden. Womit innerhalb kürzester Zeit weitere Antikörper leicht nachzuproduzieren sind.

4.2. Etablierung des Einsatzes von FFPE-Gewebe im Phage-Display

Während zwar das Phage-Display gegenüber der Hybridomatechnologie und der Generierung polyklonaler Antikörper einige Vorteile bietet, ergibt sich jedoch für alle Methoden ein Problem. Bisher wurden hauptsächlich native Antigene für die Generierung von Antikörpern verwendet. In der Immunhistochemie werden aber überwiegend FFPE-Gewebeschnitte eingesetzt. In dieser Form werden die Gewebeproben üblicherweise auch aufbewahrt. Durch die Fixierung mit Formalin werden Proteine im Gewebeverband denaturiert, und obwohl verschiedene Methoden zum Antigen-Retrieval existieren, ist nicht vorausgesetzt und auch nicht vorhersagbar, dass ein Antigen im fixierten Gewebe durch Antikörper erkannt wird. Es wurden Untersuchungen dazu angestellt, welche strukturellen Veränderungen auf molekularer Ebene bei der Formalinfixierung von Gewebe stattfinden. Man hat dazu einige Antikörper, deren Verwendung in der Immunhistochemie bereits etabliert ist, auf deren erkanntes Epitop untersucht und dabei gefunden, dass diese Antikörper gegen lineare Epitope gerichtet sind. Diese bestehen aus einer Sequenz aufeinander folgender Aminosäuren. In diesen Sequenzen sind die Aminosäuren Tyrosin, Prolin, Leucin und Glutamin am häufigsten vertreten. An den Tyrosin- und Glutaminresten werden diese Proteine während der Fixierung mit Formalin reversibel mit benachbarten Proteinen quervernetzt im Sinne einer Mannich-Reaktion. Auch an Lysinresten werden Quervernetzungen zu benachbarten Proteinen beobachtet. Zwar wird unter hohen Temperaturen in den Verfahren des Antigen-Retrieval die Sekundärstruktur der Proteine alteriert, die primäre Aminosäure-Sequenz allerdings bleibt unbeeinflusst und die Quervernetzungen können hierbei zumindest teilweise wieder aufgehoben werden, so dass die Antikörper-Bindungsstelle reexponiert ist (Shi et al. 1997, 2001, Sompuram et al., 2004, 2006 a, b; Vani et al., 2006).

Im Bemühen formalinresistente Antikörper zu generieren wurden Mäuse mit deparaffinierten Gewebefragmenten immunisiert. Im anschließenden immunhistochemischen Screening sowie weitergehenden Analysen der gefundenen Antikörper konnte gezeigt werden, dass dieser Ansatz erfolgreich zum Erhalt spezifischer monoklonaler Antikörper gegen Antigenstrukturen an Formalinfixiertem Gewebe führt (Moran et al., 1998; Larkin et al., 2005).

Im Unterschied zu der konventionellen Methode durch Immunisierung von Tieren fanden im Phage-Display bereits länger schon nicht nur native, aufgereinigte Proteine oder Proteinbestandteile als Antigene Verwendung, sondern es konnten zum Auffinden spezifischer Antikörper gegen komplexe Antigenstrukturen in verschiedenen Ansätzen bisher Zellen oder Gewebeproben erfolgreich eingesetzt werden. In einem Vergleich der Effektivität der Selektion von Phage-Antikörpern gegen solche komplexeren Antigenstrukturen hinsichtlich der daraus resultierenden Anreicherung spezifischer Binder konnte gezeigt werden, dass Zellen, kryokonserviertes Gewebe und sogar in vivo entstandene Tumoren erfolgreich eingesetzt werden können und gereinigten Proteinen teilweise vorzuziehen sind. Hierbei spielt unter anderem eine Rolle, dass einige Antigene die Anwesenheit einer Lipiddoppelschicht benötigen. Beispielsweise gilt dies für Oberflächenrezeptoren oder Transmembranproteine die idealerweise krankheitsspezifisch sind, allerdings nur im Gewebeverband beziehungsweise auf intakten Zellen vorliegen. Allerdings muss man bedenken, dass beim Einsatz von Zellen oder Geweben auch Antikörpern gewonnen werden, die reaktive sind gegen im Zellverband häufig vorkommende Hintergrundstrukturen. Somit ergibt sich eine Notwendigkeit für Selektionsstrategien. Vor dem eigentlichen Panning am Zielgewebe wurde beispielsweise die Phagenbank mit Normalgewebe subtrahiert (Mutuberria et al., 1999). Antikörper gegen Oberflächendeterminanten auf murinen Thymuszellen konnten durch die Inkubation einer Phage-Antikörper-Bibliothek mit einer Zellsuspension dieser Thymuszellen selektiert werden (Palmer et al., 1997). In einem anderen Ansatz wurde die Methode des „In-Situ Phage Screening“ etabliert. Hier wurden als komplexe Antigene mittels Laser mikrofragmentierte Gewebeproben im Phage-Display eingesetzt (Tanaka et al., 2002). Eine Weiterentwicklung dieser Methoden gelang, indem die Phagen-Antikörperbibliothek zur Subtraktion ungewollter Binder mit einer Zellsuspension lymphozytischer Zellen inkubiert wurde bevor durch den Einsatz von fixiertem Thymusgewebe spezifische Antikörper selektiert werden konnten (Van Ewijk et al., 1997).

Da nun sowohl für diagnostische wie auch für therapeutische Zwecke Antikörper, die krankheitsspezifische Antigene binden, von besonderem Interesse sind, wurde untersucht, ob mittels Phage-Display tumorspezifische Antikörper gefunden werden können. Cai und Garen (1995) benutzen hierzu eine prä-immunisierte Phage-Antikörperbibliothek, die sie aus peripheren zirkulierenden Lymphozyten nach der Immunisierung mit autologen Tumorzellen von Melanompatienten konstruiert hatten. Durch nachfolgende Subtraktion an normalen Melanozyten waren sie mit diesem Ansatz in der Lage, spezifische Anti-Melanom-Antikörper gegen kultivierte autologe Tumorzellen zu erhalten. Durch den Einsatz einer Zellsuspension formalinfixierter Zellen eines kolorektalen Karzinoms konnten auch hier Antikörper erfolgreich selektiert werden (Williams et al., 2002). Des Weiteren konnte ein Anti-CD55-Antikörper beim Einsatz einer Adenokarzinomzelllinie eines Bronchialkarzinoms im Phage-Display und Subtraktion an einer Zellkultur normaler Bronchialzellen erfolgreich isoliert werden (Ridgway et al., 1999).

Aufbauend auf den Ergebnissen vorangegangener Arbeiten wurde von uns fixiertes Gewebe in einem sogenannten subtraktiven Setting im Phage-Display eingesetzt. Es wurde eine positive Selektion von Phage-Antikörper in mehreren Panningrunden an Schnitten maligne entarteten lymphatischen Gewebes, hier im Speziellen an Gewebe eines Mantelzelllymphoms, vorgenommen. Außer in der ersten Panningrunde erfolgte jeweils eine negative Selektion an normalem Tonsillengewebe vor der positiven Selektion an dem Lymphomgewebe. Der Schritt der Subtraktion an dem Normalgewebe soll zu einer Reduktion der Anzahl unspezifischer Binder oder Binder redundanter Strukturen im Gewebe führen (Jaye et al., 2003).

Wir erhielten dadurch über 200 Antikörper gegen unbekannte Proteine der Gewebeproben.

4.3. Etablierung der High-Throughput-Testmethoden

Im Zusammenhang mit der im Phage-Display anfallenden großen Menge nicht charakterisierter Antikörper und zur Identifizierung dazugehöriger Antigene müssen geeignete Screeningverfahren gefunden oder entwickelt werden.

In dieser Hinsicht stehen prinzipiell verschiedenen Möglichkeiten zur Verfügung. Beispielsweise können durch quantitative Real-Time-PCR die eluierten Phagen, die ihr Antigen spezifische gebunden haben, identifiziert werden (Jaye et al., 2003). Insbesondere aber durch die Array-Technologie ist es möglich geworden, eine Vielzahl an Antikörpern gleichzeitig im Hochdurchsatzverfahren zu untersuchen. Hierbei wurden bisher sowohl

Antikörper-Arrays als auch Protein-Arrays erfolgreich für diese Zwecke konstruiert (de Wildt et al., 2000; Holt et al., 2000).

Zwei Gründe spielten bei der Entscheidung für ein immunhistochemisches Screeningverfahren die wesentliche Rolle. Zum einen war ein Screening mit standardisiertem Verfahren an aufgereinigtem Protein wie der häufig eingesetzte ELISA in diesem Fall nicht möglich, da die Selektion der Antikörper an Gewebe und somit an unbekanntem Protein erfolgte. Zum anderen wollten wir Antikörper finden, die in der Immunhistochemie an FFPE-Schnitten Verwendung finden könnten.

Wir entwickelten am Institut einen Tissue-Microarray. Dieser Array enthielt Gewebeproben derselben Entitäten, die im Phage-Display eingesetzt wurden, Mantelzelllymphom- und Tonsillengewebe. Zusätzlich enthielt der Array Pankreasnormlagewebe zur Untersuchung mit dem Anti-CK8-Antikörper gegen Zytokeratin in Pankreasepithelien als positive Kontrollmöglichkeit und zur Untersuchung der Anfärbung von Hintergrundstrukturen durch die Phage-Antikörper. Durch Anpassung der Arrays in die Kompartimente des Fast[®] Frame Färberahmens und den somit entstandenen Subarrays, konnte damit ein Hochdurchsatzverfahren für das Screening der großen Menge an Antikörpern etabliert werden.

Die Phage-Antikörper wurden nach Lyse der Bakterienzellmembran direkt in immunhistochemischen Färbeprotokollen eingesetzt. Hierbei ist von enormen Vorteil, dass diese Phagen-Antikörper im dHLX-Format von E.coli produziert werden. Dieses Format, in dem diese in einer nicht-kovalenten dimerisierten Form als bivalente Miniantikörper vorliegen, hat sich als besonders günstig erwiesen. Die funktionelle Affinität erfährt gegenüber dem normalen Format von Antikörpern keine Verluste. Zudem gibt es bei der Faltung der Proteine im Periplasma der Bakterien keinerlei Probleme, der Grad der Degradation ist gering und die Antikörper liegen damit in hoher Zahl im Periplasma vor. Dadurch sind sie durch Lyse der Bakterienzellmembran und nach dem Zentrifugieren im Überstand desselben unmittelbar einsetzbar (Plückthun und Pack, 1997). Durch die vorangegangene Titrierung mit dem bekannten rekombinanten Anti-CK8-Antikörper AbyD03517 (MorphoSys, München, D) konnte die optimale Konzentration für den Einsatz der Phage-Antikörper in den immunhistochemischen Färbeprotokollen bestimmt werden. In der anschließenden mikroskopischen Auswertung der Arrays wurde eine Einteilung der Färbeergebnisse in eine entweder positive oder negative Anfärbung der Lymphomzellen vorgenommen, unabhängig von der Färbeintensität oder der Anzahl gefärbter Lymphomzellen. Somit wurde die Möglichkeit der Nichtberücksichtigung eines

Antikörpers durch Schwankungen in der Konzentration im Lysat oder durch Unterschiede in der Affinität der einzelnen Antikörper möglichst gering gehalten.

Von den isolierten 216 Antikörpern zeigten insgesamt 64 ein positives Färbegergebnis. Darunter waren fünf Klone mit unterschiedlichem Färbemuster erkennbar. Der am häufigsten vertretene Klon färbte sowohl die Zellen des Mantelzelllymphoms als auch die Mantelzone und interfollikulär gelegene Zellen im Tonsillengewebe, nicht aber die Zellen im Keimzentrum der Sekundärfollikel. Dies entspricht dem erwarteten Färbemuster hinsichtlich einer gesuchten Anfärbung antigener Strukturen in Ursprungszellen des Mantelzelllymphoms (siehe Kapitel 1.5.). Einer dieser Klone mit einem günstigen Signal-Rausch-Verhältnis in der Färbung wurde zur weiteren Analyse ausgewählt, während die anderen Klone unberücksichtigt blieben. Es ist allerdings möglich, dass diese ähnliche Strukturen erkennen. Durch Immunpräzipitation und anschließende Massenspektrometrie stellte sich heraus, dass dieser Antikörper spezifisch gegen Vimentin gerichtet ist.

4.4. Vimentin

Die Proteine des Zytoskeletts werden in die drei Gruppen der Mikrofilamente, der Intermediärfilamente und der Mikrotubuli unterteilt. Intermediärfilamente kommen in fast allen eukaryotischen Zellen vor. Die Hauptaufgaben sind vor allem struktureller Art und bestehen in der mechanischen Unterstützung sowohl der Kern- als auch der Plasmamembran sowie der Anordnung des Zellkerns und der Organellen innerhalb des Zytoplasmas. Durch ihre Verbindung mit Desmosomen und Hemidesmosomen tragen sie wesentlich zur Verankerung, Stabilität und Widerstandsfähigkeit des Gewebeverbandes bei. Außerdem sind sie an Prozessen wie der Signaltransduktion mitbeteiligt. Man kann die Intermediärfilamente weiter in Gruppen unterteilen. Vimentin mit einem Molekulargewicht von 54 kDa gehört in die Gruppe 3 der Intermediärfilamente und wird vor allem in Zellen mesenchymalen Ursprungs wie beispielsweise Fibroblasten, Chondrozyten, Osteozyten, aber auch in Endothelzellen, einigen epithelialen Zellen sowie in Leukozyten exprimiert. Die meisten Intermediärfilamente zeigen ein zellspezifisches Auftreten (Lodish et al., 2004; Goldman et al., 1996). Diese Zellspezifität macht man sich unter anderem in der pathologischen Diagnostik von Weichgewebstumoren bereits lange zu Nutze, gerade wenn morphologische Kriterien nur unzureichend zur Diagnose herangezogen werden können (Osborn und Weber, 1983).

Während der Verlust beziehungsweise die Veränderungen der Expression von Intermediärfilamenten wie Zytokeratinen in Epithelzellen zu schwerwiegenden Erkrankungen wie zum Beispiel den bullösen epidermalen Erkrankungen der Haut führt, ist noch nicht gesichert, ob Vimentin eine vitale Funktion hat, da bei Knock-out-Mäusen mit einer Null-Mutation im Vimentin keinerlei Änderung des Phänotyps auftraten (Colucci-Guyon et al., 1994). Die Zellen der Lymphopoese wurden von den Vorläufer- bis zu den reifen Zellen auf die Expression von Vimentin hin untersucht. Die Ergebnisse zeigten, dass Vimentin in der T-Zell-Reihe während der gesamten Differenzierung vorhanden ist, während in B-Lymphozyten die Expression bei der Umwandlung zur reifen Plasmazelle deutlich abnimmt (Dellagi et al., 1983). Die reaktiven B-Zellen im Keimzentrum eines Lymphfollikels erfahren physiologisch einen Verlust ihrer Vimentinexpression. Lymphome, die ihren Ursprung von den Zellen des Keimzentrums aus nehmen wie beispielsweise das folliculäre Lymphom oder das Burkitt-Lymphom sind nachgewiesenermaßen Vimentin-negativ (Möller et al., 1988). Es wurde bereits das Färbeverhalten verschiedener Lymphome sowie lymphatischen Gewebes mit einem etablierten Vimentin-Antikörper getestet. Hierbei färbte der Vimentin-Antikörper die folliculären B-Zellen der Mantelzone eines Sekundärfollikels, interfollikulär gelegene Zellen und auch im Gewebe enthaltene Makrophagen, nicht aber die Zellen des Keimzentrums. Auch in dieser Arbeit wurde keine Anfärbung von Lymphomen mit Ursprung im Keimzentrum nachgewiesen (Gustmann et al., 1991). Damit zeigt sich eine gute Übereinstimmung mit unseren Färbeergebnissen. Auch im Vergleich unseres Antikörpers mit einem bereits etablierten Anti-Vimentin-Antikörpers im Westernblot mit diversen Tumorzelllinien mesenchymalen und lymphatischen Ursprungs konnte gezeigt werden, dass unser Antikörper Vimentin erkennt.

Das subtraktive Panning soll wie oben bereits erwähnt zu einer Reduktion der Anzahl unspezifischer Binder oder Binder redundanter Strukturen im Gewebe führen. Das Weglassen der negativen Subtraktion an normalem Tonsillengewebe in der ersten Panningrunde des Phage-Displays könnte allerdings dazu geführt haben, einen Pool spezifischer Antikörper zu finden, die gegen häufig vorkommende Strukturen wie dem Vimentin gerichtet sind. Durch die Wiederholung von Panningrunden ist eine Zunahme der Avidität der Binder zu verzeichnen, gleichzeitig nimmt man allerdings eine Einschränkung in der Diversität der gefundenen Binder in Kauf (Jaye et al., 2003). Außerdem kann dies zu einer Anreicherung von Bindern an antigene Strukturen, die mit hoher Dichte vorkommen,

führen, während weniger häufig vertretene Strukturen und dagegen gerichtete Antikörper mit eventuell geringerer Affinität dadurch verloren gehen können (Jensen et al., 2003).

4.5. Ausblick

Mit der Einführung der Phage-Display-Technologie durch Smith 1985 steht eine effektive Methode zur Herstellung monoklonaler rekombinanter Antikörper gegenüber herkömmlichen Methoden zur Verfügung. In den letzten Jahren wurde in verschiedenen Ansätzen die Methode des Phage-Displays beständig weiterentwickelt. Mittlerweile ist es möglich, Antikörper mit sowohl hoher Affinität als auch hoher Spezifität gegen eine Vielzahl an Antigenen zu finden (Hoogenboom, 2005). Auch die Automatisierung dieser Technologie wird vorangetrieben. Durch die hohe Effektivität der Antikörper und aufgrund der Tatsache, dass diese leicht zugänglich in hoher Konzentration im Plasma von E.coli Bakterien produziert werden, kann eine Standardisierung und Automatisierung vieler einzelner Protokollschritte im Verfahren des Phage-Displays erfolgen. Gleichzeitig wird dabei ein hohes Maß an Reliabilität gewonnen sowie deren direkte und vielseitige Anwendung wesentlich vereinfacht (Krebs et al. 2001). Weiterhin kann das Format dieser Antikörper im Hinblick auf deren späteren Gebrauch variiert werden, so können sie als scFv, Fab oder vollständiges Immunglobulin produziert und verwendet werden. Antikörper sind unersetzbar geworden in labordiagnostischen Tests, wie zum Beispiel ELISA, RIA und Elektrophoresen, darüber hinaus steht mit dem Phage-Display ein Verfahren zur Aufklärung von Vorgängen auf molekularer Ebene innerhalb der Zelle zur Verfügung. Nach der sogenannten Postgenom-Ära helfen Antikörper somit bei der Identifizierung von Target-Proteinen beziehungsweise sie helfen, diese Prozesse zu beschleunigen (Kretzschmar und von Rüden, 2002). Die Nutzung des Phage-Displays zur Identifizierung tumorassoziierter Antigene gegenüber der Expression in nicht-maligne transformierten Zellen bietet einen wesentlichen Vorteil gegenüber anderen Verfahren wie cDNA-Array-Technologie, Oligonukleotid-Microarrays oder seriellen Analysen der Genexpression. Mit den Phage-Antikörpern können die Proteine, also die Gen-Produkte und deren eventuell in verschiedenen Zellen unterschiedliche posttranslational modifizierte Formen identifiziert werden (Ridgway et al., 1999). Hierbei können auch hochmolekulare Proteine sowie Transmembran- und extrazelluläre Proteine erkannt werden (Jensen et al., 2003).

Antikörper gewinnen auch immer mehr an Bedeutung hinsichtlich der Etablierung und Weiterentwicklung als therapeutische Substanzen. Hierbei stehen vermehrt das Auffinden

von Antikörpern gegen tumorspezifische Antigene und deren späterer Einsatz als zielgerichtete Substanzen in der Tumorthherapie im Vordergrund.

Als Immuntherapeutika sind bereits mehrere Antikörper seit einigen Jahren etabliert. Hier unterscheidet man zwischen murinen, chimären oder humanisierten Antikörper. Rituximab, ein chimärer monoklonaler Antikörper gegen CD20-Antigen, wird zum Beispiel in der Therapie vieler Non-Hodgkin-Lymphome der B-Zell-Reihe eingesetzt (Plosker und Figgitt, 2003). Trastuzumab, ein humanisierter monoklonaler Antikörper gegen den HER2/neu Wachstumsfaktor-Rezeptor, wird in der Therapie bestimmter Formen des metastasierten Mammakarzinoms eingesetzt (Slamon et al., 2001). Allerdings birgt die Gabe von Antikörpern immer das Risiko einer Immunreaktion auf die körperfremden Proteine. Da die Phage-Antikörper voll synthetische humane Antikörper sind, wird hierbei dieses Risiko wesentlich reduziert. Sie bieten einen weiteren wichtigen Vorteil, indem sie in ihrem Format variiert beziehungsweise modifiziert werden, wobei hier die kleineren Proteinformate als scFv, Fab oder einzelne variable Domäne besonders günstig sind. Denn durch den fehlenden Fc-Anteil findet keine Fc-Rezeptor-Interaktion statt. Zudem haben sie in diesem Format eine bessere Gewebepenetration (Kretzschmar und von Rüden, 2002; Filpula, 2007). Die Koppelung zytotoxischer oder radioaktiver Substanzen an solche tumorspezifischen scFv oder Fab stellen weitere potentielle Perspektiven dar.

Antikörper werden durch ihr breites Spektrum an Anwendungsmöglichkeiten in vielen Bereichen der Medizin, Diagnostik, Therapie und Forschung immer bedeutsamer. Das Phage-Display bietet vielfältige Möglichkeiten zur Herstellung von Antikörper in verschiedenen Formaten und für verschieden Bereiche. Es bedarf zwar noch weiterer Forschung und Verfeinerung der Methoden in einigen Bereichen, wie beispielsweise auch in dem von uns verfolgten Ziel der Generierung formalinresistenter spezifischer Antikörper. Die Methode des Phage-Displays bietet jedoch gute Perspektiven im Hinblick auf die Generierung diagnostisch und eventuell im weiteren Verlauf auch therapeutisch verwendbarer, krankheitsspezifischer Antikörper. Durch den hier gegebenen Einblick in die Vielfalt des Phage-Displays wird klar, dass dieses Verfahren und die rekombinanten Phage-Antikörper auch zukünftig eine große Rolle spielen können.

5. Zusammenfassung

Die Histopathologie ist wesentlicher Bestandteil in der Pathologie und gerade der Einsatz von Antikörpern in der Immunhistochemie kann zur differenzierten Diagnosestellung und Klassifizierung von Tumoren und anderen Erkrankungen beitragen. Antikörper nehmen somit einen hohen Stellenwert in der täglichen Routine ein und damit wird das Interesse auch auf deren Herstellungsverfahren und das Finden neuer Antikörper gelenkt. Mit dem Phage-Display steht eine effektive *in vitro* Methode zur Herstellung rekombinanter Antikörper zur Verfügung. Hierbei wird eine repräsentative Antikörperbibliothek an der Oberfläche von Bakteriophagen präsentiert. Durch Inkubation der Antikörper-Bibliothek mit einem jeweiligen Antigen, können spezifische Binder gefunden und selektioniert werden.

Wir konnten in der zugrunde liegenden Arbeit zeigen, dass nicht nur native Antigene, sondern auch FFPE-Gewebeschnitte mit komplexen Antigenstrukturen, wie sie in der Histopathologie zum Einsatz kommen, im Phage-Display verwendet werden können. Es wurde eine Selektion von Phage-Antikörpern an Schnitten maligne entarteten lymphatischen Gewebes, hier im Speziellen an Gewebe eines Mantelzelllymphoms, vorgenommen. Auf diesem Wege gelang es, hochaffine spezifische monoklonale Antikörper zu generieren.

Wir erhielten über 200 Antikörper gegen unbekannte Proteine der Gewebeproben. Um diese Vielzahl nicht-charakterisierter Antikörper zu untersuchen entwickelten wir ein immunhistochemisches Screeningverfahren. Dazu wurde am Institut ein Tissue-Microarray entworfen und ein Färbeprotokoll etabliert, mit dem die Phage-Antikörper direkt nach Extraktion durch Lyse der Bakterien, die als Antikörperproduzenten dienen, eingesetzt werden können. Die Arrays wurden im Anschluss mikroskopisch ausgewertet.

Wir fanden eine Vielzahl positiver Klone, die ein gutes Färbeergebnis mit starken Signalen erbrachten, sich allerdings in ihrem Färbemuster häufig wenig unterschieden. Unter den insgesamt 64 von 216 Antikörpern mit positivem Färbeergebnis waren fünf Klone mit verschiedenen Färbemustern erkennbar. Der am häufigsten vertretene Klon färbte sowohl die Zellen des Mantelzelllymphoms als auch die Mantelzone und interfollikulär gelegene Zellen im Tonsillengewebe, allerdings nicht die Zellen im Keimzentrum der Sekundärfollikel. Dies entspricht dem erwarteten Färbemuster hinsichtlich gesuchter Anfärbung antigener Strukturen in Ursprungszellen des Mantelzelllymphoms.

Zur weiteren Analyse wurde ein Klon mit einem günstigen Signal-Rausch-Verhältnis ausgewählt, während andere Klone unberücksichtigt blieben.

Durch Immunpräzipitation und anschließende Massenspektrometrie stellte sich heraus, dass dieser Antikörper spezifisch gegen Vimentin gerichtet ist. Der Vergleich unseres Antikörpers mit einem kommerziellen Anti-Vimentin-Antikörper im Westernblot an diversen Tumorzelllinien mesenchymalen und lymphatischen Ursprungs konnte zeigen, dass Vimentin spezifisch erkannt wird.

Literaturverzeichnis

- Cai X, Garen A: Anti-melanoma antibodies from melanoma patients immunized with genetically modified autologous tumor cells: Selection of specific antibodies from single-chain Fv fusion phage libraries. *Proc Natl Acad Sci USA* 92:6537-6541 (1995)
- Colluci-Guyon E, Portier MM, Dunia I, Paulin D, Pournin S, Babinet C: Mice lacking vimentin develop and reproduce without an obvious phenotype. *Cell* 79:679-694 (1994)
- De Wildt RM, Mundy CR, Gorick BD, Tomlinson IM: Antibody arrays for high throughput screening of antibody-antigen interactions. *Nat Biotechnol* 18:989-994 (2000)
- Dellagi K, Vainchenker W, Vinvi G, Paulin D, Brouet JC: Alteration of vimentin intermediate filament expression during differentiation of human hemopoietic cells. *EMBO J* 2:1509-1514 (1983)
- Filpula D: Antibody engineering and modification technologies. *Biomol Eng* 24:201-215 (2007)
- Goldman RD, Khuon S, Chou YH, Opal P, Steinert PM: The Function of Intermediate Filaments in Cell Shape and Cytoskeletal Integrity. *J Cell Biol* 134:971-983 (1996)
- Gustmann C, Altmannsberger M, Osborn M, Griesser H, Feller AC: Cytokeratin Expression and Vimentin Content in Large Cell Anaplastic Lymphomas and Other Non-Hodgkin's Lymphomas. *Am J Pathol* 138:1413-1422 (1991)
- Hans CP, Weisenburger DD, Greiner TC, Gascoyne RD, Delabie J, Ott G, Müller Hermelink HK, Campo E, Braziel RM, Jaffe ES, Pan Z, Farinha P, Smith LM, Falini B, Banham AH, Rosenwald A, Staudt LM, Connors JM, Armitage JO, Chan WC: Confirmation of the molecular classification of diffuse large B-cell lymphoma by immunohistochemistry using a tissue microarray. *Blood* 103:275-282 (2004)

- Holt LJ, Büssow K, Walter G, Tomlinson IM: By-passing selection: direct screening for antibody-antigen interactions using protein arrays. *Nucleic Acids Res* 28:E72 (2000)
- Hoogenboom HR: Selecting and screening recombinant antibody libraries. *Nat Biotechnol* 23:1105-1116 (2005)
- Hsi ED, Yegappan S: Lymphoma immunophenotyping: a new era in paraffin-section immunohistochemistry. *Adv Anat Pathol* 8:218-239 (2001)
- Jarutat T, Nickels C, Frisch Ch, Stellmacher F, Hofig KP, Knappik A, Merz H: Selection of vimentin-specific antibodies from the HuCAL® phage display library by subtractive panning on formalin-fixed, paraffin-embedded tissue. *Biol Chem* 388:651-658 (2007)
- Jaye DL, Nolte FS, Mazzucchelli L, Geigerman C, Akyildiz A, Parkos CA: Use of Real Time Polymerase Chain Reaction to Identify Cell- and Tissue-Type-Selective Peptides by Phage Display. *Am J Pathol* 162:1419-1429 (2003)
- Jensen KB, Jensen ON, Ravn P, Clark BFC, Kristensen P: Identification of Keratinocyte specific Markers Using Phage Display and Mass Spectrometry. *Mol Cell Proteomics* 2:61-69 (2003)
- Knappik A, Ge L, Honegger A, Pack P, Fischer M, Wellnhofer G, Hoess A, Wölle J, Plückthun A, Virnekäs B: Fully Synthetic Human Combinatorial Antibody Library (HuCAL) Based on Modular Consensus Frameworks and CDRs Randomized with Trinucleotides. *J Mol Biol* 296:57-86 (2000)
- Krebs B, Rauchenberger R, Reiffert S, Rothe C, Tesar M, Thomassen E, Cao M, Dreier T, Fischer D, Höss A, Inge L, Knappin A, Marget M, Pack P, Meng XQ, Schier R, Söhlemann P, Winter J, Wölle J, Kretzschmar T: High-throughput generation and engineering of recombinant human antibodies. *J Immunol Methods* 254:67-84 (2001)

- Kretzschmar T, Von Rüden T: Antibody discovery: phage display. *Curr Opin Biotechnol* 13:598-602 (2002)
- Larkin A, Moran E, Kennedy SM, Clynes M: Monoclonal antibody 5C3 raised against formalin fixed paraffin-embedded invasive breast tumor tissue: characterisation of its reactive antigen via immunoprecipitation and internal sequencing. *J Immunol Methods* 303:53-65 (2005)
- Leenaars M, Hendriksen CFM: Critical Steps in the Production of Polyclonal and Monoclonal Antibodies: Evaluation and Recommendations. *ILARJ* 46:269-279 (2005)
- Lipman NS, Jackson LR, Trudel LJ, Weis-Garcia F: Monoclonal versus Polyclonal Antibodies: Distinguishing Characteristics, Applications, and Information Resources. *ILAR J* 46:258-268 (2005)
- McCafferty J, Griffiths AD, Winter G, Chriswell DJ: Phage antibodies: filamentous phage displaying antibody variable domains. *Nature* 348:552-554 (1990)
- Merz H, Lange K, Gaiser T, Müller A, Kapp U, Bittner C, Harder S, Siebert R, Bentz M, Binder T, Diehl V, Feller AC: Charakterization of a novel human Anaplastic large cell lymphoma cell line tumorigenic in SCID mice. *Leuk Lymphoma* 43:165-172 (2002)
- Möller P, Momburg F, Hofmann WJ, Matthaei-Maurer DU: Lack of Vimentin Occurring During the Intrafollicular Stages of B Cell Development Charakterizes Follicular Center Cell Lymphomas. *Blood* 71:1033-1038 (1988)
- Moran E, Larkin A, Cleary I, Barnes C, Kennedy SM, Kelehan P, Clynes M: Monoclonal antibodies raised to paraffin wax embedded archival tissue; feasibility study of their potential to detect novel antigenic markers. *J Immunol Methods* 219:151-159 (1998)
- Mutuberria R, Hoogenboom HR, van der Linden E, de Bruïne AP, Roovers RC: Model systems to study the parameters determining the success of phage antibody selections on complex antigens. *J Immunol Methods* 231:65-81 (1999)

-
- Osborn M, Weber K: Tumor diagnosis by intermediate filament typing: a novel tool for surgical pathology. *Lab Invest* 48:372-394 (1983)
- Palmer DB, George AJT, Ritter MA: Selection of antibodies to cell surface determinants on mouse thymic epithelial cells using a phage display library. *Immunology* 91:473-478 (1997)
- Picker LJ, Weiss LM, Medeiros LJ, Wood GS, Warnke RA: Immunophenotypic Criteria for the Diagnosis of Non-Hodgkin's Lymphoma. *Am J Pathol* 128:181-201 (1987)
- Plosker GL, Figgitt DP: Rituximab: a review of its use in non-Hodgkin's lymphoma and chronic lymphocytic leukaemia. *Drugs* 63:803-843 (2003)
- Plückthun A, Pack P: New protein engineering approaches to multivalent and bispecific antibody fragments. *Immunotechnology* 3:83-105 (1997)
- Ridgway JBB, Ng E, Kern JA, Lee J, Brush J, Goddard A, Carter P: Identification of a Human Anti-CD55 Single-Chain Fv by Subtractive Panning of a Phage Library Using Tumor and Nontumor Cell Lines. *Cancer Res* 59:2718-2723 (1999)
- Shi SR, Cote RJ, Taylor CR: Antigen Retrieval Immunohistochemistry: Past, Present, and Future. *J Histochem Cytochem* 45:327-343 (1997)
- Shi SR, Cote RJ, Taylor CR: Antigen Retrieval Techniques: Current Perspectives. *J Histochem Cytochem* 49:931-937 (2001)
- Slamon DJ, Leyland-Jones B, Shak S, Fuchs H, Paton V, Bajamonde A, Fleming T, Eiermann W, Wolter J, Pegram M, Baselga J, Norton L: Use of chemotherapy plus a monoclonal antibody against HER2 for metastatic breast cancer that overexpresses HER2. *N Engl J Med* 344:783-792 (2001)
- Smith GP: Filamentous fusion phage: novel expression vectors that display cloned antigens on the virion surface. *Science* 228:1315-1317 (1985)
- Sompuram SR, Vani K, Bogen SA: A Molecular Model of Antigen Retrieval Using a Peptide Array. *Am J Clin Pathol* 125:91-98 (2006 b)

- Sompuram SR, Vani K, Hafer LJ, Bogen SA: Antibodies Immunoreactive With Formalin Fixed Tissue Antigens Recognize Linear Protein Epitopes. *Am J Clin Pathol* 125:82-90 (2006 a)
- Sompuram SR, Vani K, Messana Elizabeth, Bogen SA: A Molecular Mechanism of Formalin Fixation and Antigen Retrieval. *Am J Clin Pathol* 121:190-199 (2004)
- Tanaka T, Ito T, Furuta M, Eguchi C, Toda H, Wakabayashi-Takai E, Kaneko K: In-Situ Phage Screening. A method for identification of subnanogram tissue components in situ. *J Biol Chem* 277:30382-30387 (2002)
- Taylor CR, Levenson RM: Quantification of immunohistochemistry-issues concerning methods, utility and semiquantitative assessment II. *Histopathology* 49:411-424 (2006)
- Tiemann M, Schrader C, Klapper W, Dreyling MH, Campo E, Norton A, Berger F, Kluin P, Ott G, Pileri S, Pedrinis E, Feller AC, Merz H, Janssen D, Hansmann ML, Krieken H, Möller P, Stein H, Unterhalt M, Hiddemann W, Parwaresch R, European MCL Network: Histopathology, cell proliferation indices and clinical outcome in 304 patients with mantle cell lymphoma (MCL): a clinicopathological study from the European MCL Network. *Br J Haematol* 131:29-38 (2005).
- Van Ewijk W, De Kruif J, Germeraad WTV, Berends P, Röpke C, Platenburg PP, Logtenberg T: Subtractive isolation of phage-displayed single-chain antibodies to thymic stromal cells by using intact thymic fragments. *Proc Natl Acad Sci USA* 94:3903-3908 (1997)
- Vani K, Bogen SA, Sompuram SR: A high throughput combinatorial library technique for identifying formalin-sensitive epitopes. *J Immunol Methods* 317:80-89 (2006)
- Willats WGT: Phage display: practicalities and prospects. *Plant Mol Biol* 50:837-854 (2002)
- Williams BR, Sompuram SR, Sharon J: Generation of Anti-Colorectal Cancer Fab Phage Display Libraries With a High Percentage of Diverse Antigen-Reactive Clones.

Comb Chem High Throughput Screen 5:489-499 (2002)

Wohlschläger Ch, Lange K, Merz H, Feller AC: Aberrant immunophenotypes of mantle cell lymphomas. Leuk Lymphoma 44:269-273 (2003)

Literatur:

Boenisch T: Handbuch Immunhistochemische Färbemethoden, 3. Auflage,
DakoCytomation, Hamburg, 2003

Cotran RS, Kumar V, Collins T: Robbins Pathologic Basis of Disease, 6. Auflage,
668-668, Saunders, Philadelphia, Pennsylvania, USA, 1999

Feller AC, Diebold J: Histopathology of Nodal and Extranodal Non-Hodgkin's
Lymphomas, 3. Auflage, 66-74, Springer, Berlin, 2004

Jaffe ES, Harris NL, Stein H, Vardiman JW: World Health Organization Classification of
Tumors; Pathology & Genetics – Tumors of Haematopoietic and Lymphoid
Tissues, 168-170, IARC Press, Lyon, France, 2001

Janeway CA, Travers P, Walport M, Shlomchik M: Immunobiology, 6. Auflage, 104-110,
136-148, Garland Publishing, London, UK, 2005

Lodish H, Berk A, Matsudaira P, Kaiser CA, Krieger M, Scott MP, Zipursky LS, Darnell J:
Molecular Cell Biology, 4. Auflage, 805-815, Palgrave Macmillan, UK, 2004

Foto-Anhang

Abb. 9 - 16: Beispiele der verschiedenen Färbemuster aus den Ergebnissen des immunhistochemischen Screenings der Antikörper aus der 4. bis 6. Panningrunde jeweils an Mantelzelllymphomgewebe (MCL) und Tonsillengewebe (Vergrößerung 1:400).

4. Runde:

MCL

Tonsille

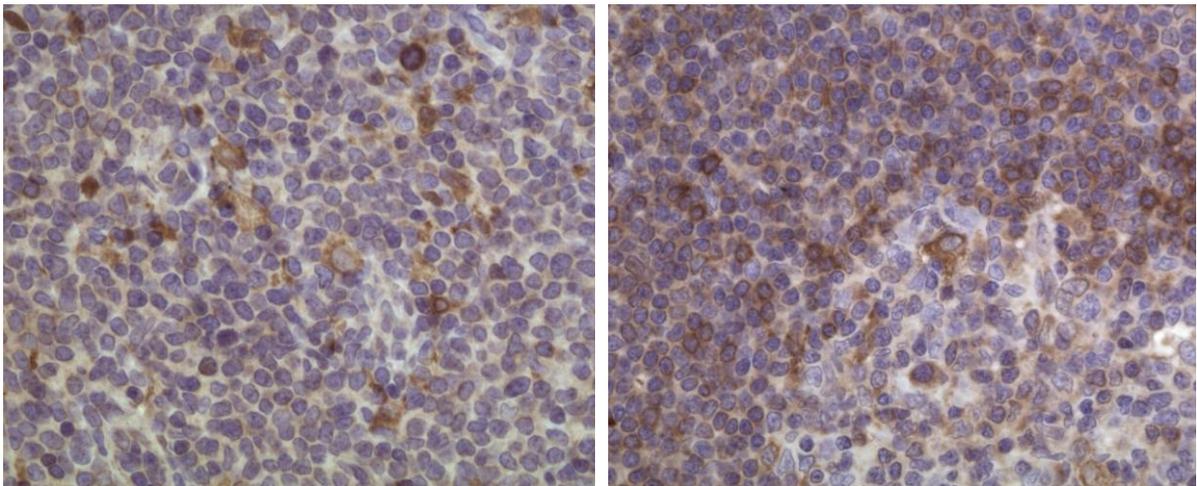


Abb. 9: Antikörper-Klon G2. MCL: vereinzelt Anfärbung von Lymphomzellen und Histiocyten; Tonsille: Aussparung des Keimzentrums und schwache Anfärbung vereinzelter Zellen der Mantelzone

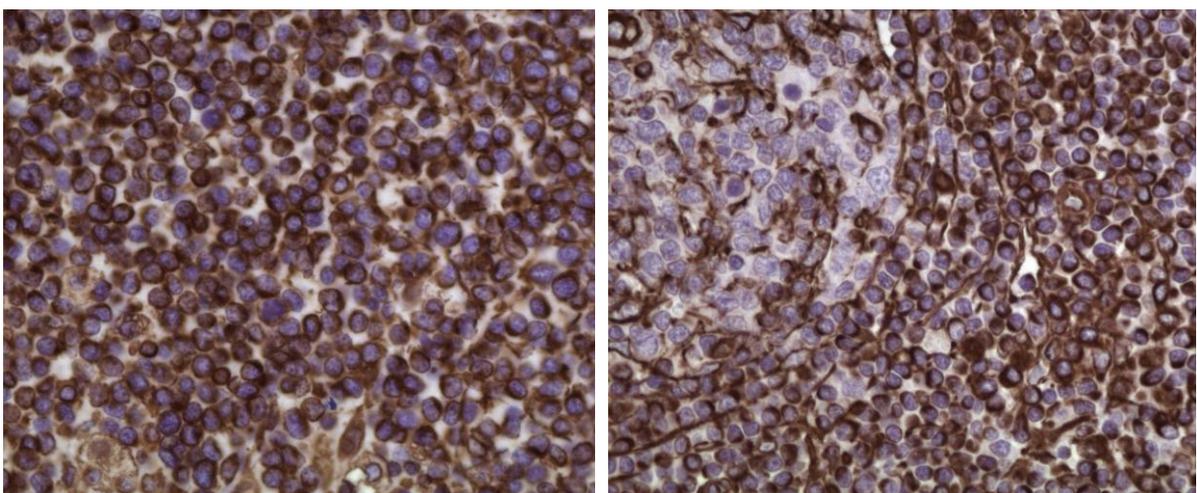


Abb. 10: Antikörper-Klon G6. MCL: starke Anfärbung der Lymphomzellen; Tonsille: Aussparung des Keimzentrums und starke Anfärbung der Zellen der Mantelzone sowie interfollikulär gelegener Zellen.

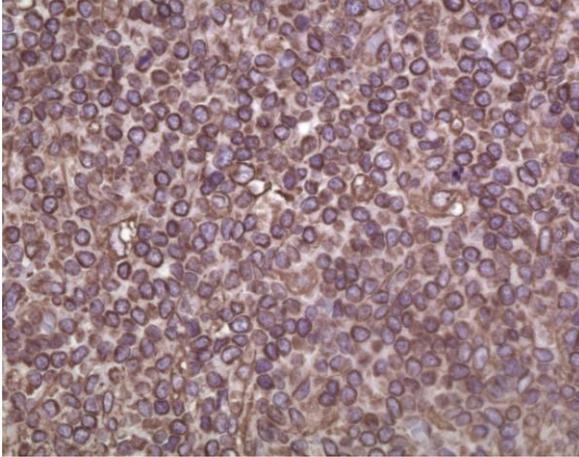
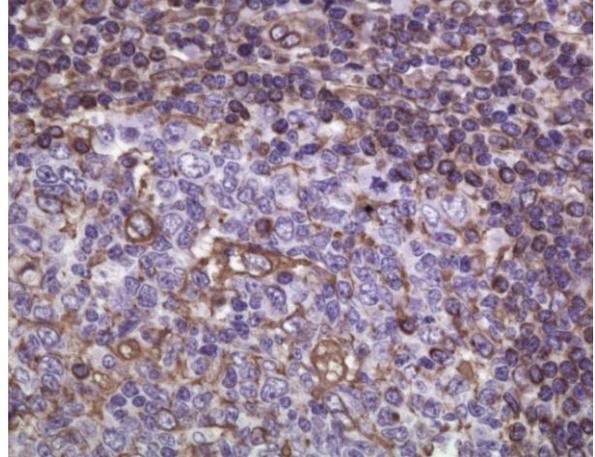
5. Runde -1:**MCL****Tonsille**

Abb. 11: Antikörper-Klon A3. MCL: gute Anfärbung der Lymphomzellen; Tonsille: Aussparung des Keimzentrums, Anfärbung der Zellen der Mantelzone, schwache Anfärbung der Hintergrundstrukturen.

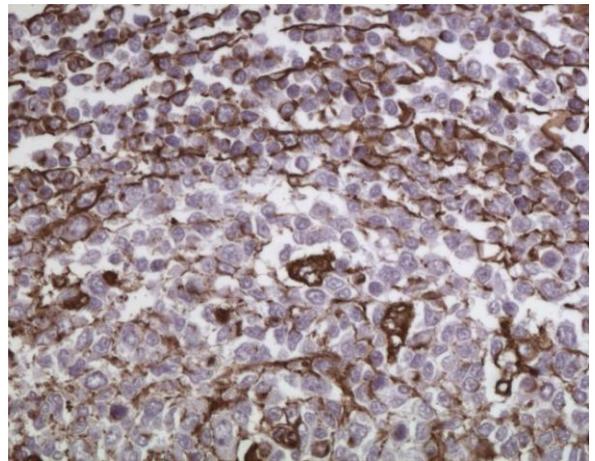
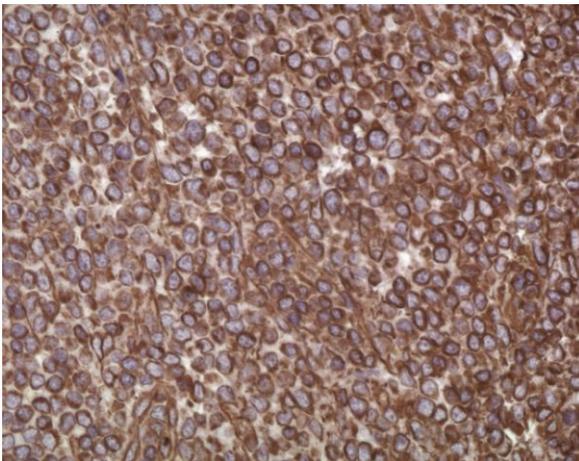


Abb. 12: Antikörper-Klon C12. MCL: starke Anfärbung der Lymphomzellen; Tonsille: Aussparung des Keimzentrums, Anfärbung vereinzelter Zellen der Mantelzone, starke Anfärbung der Hintergrundstrukturen vor allem Endothelien und Histiocyten.

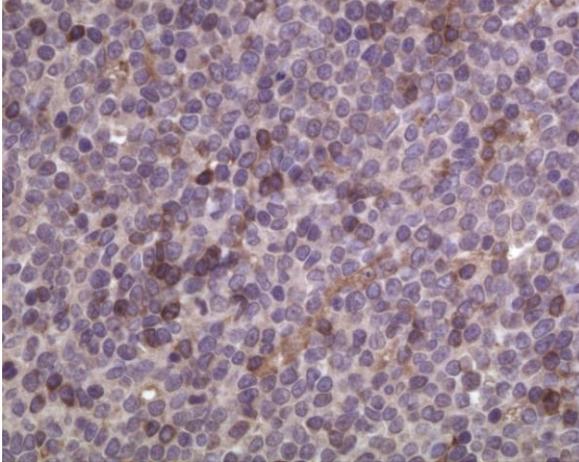
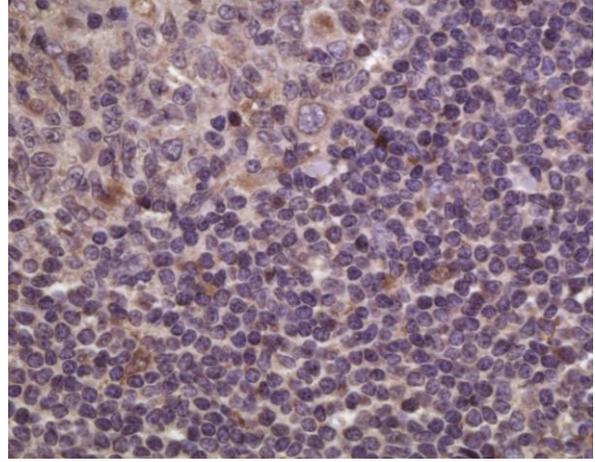
5. Runde-2:**MCL****Tonsille**

Abb. 13: Antikörper-Klon D3. MCL: schwache Anfärbung vereinzelter Zellen im Lymphom; Tonsille: Aussparung des Keimzentrums, keine Anfärbung von Zellen der Mantelzone, schwache Anfärbung von Hintergrundstrukturen.

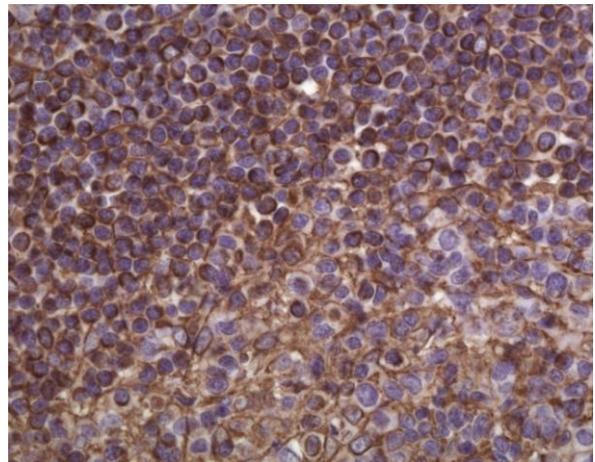
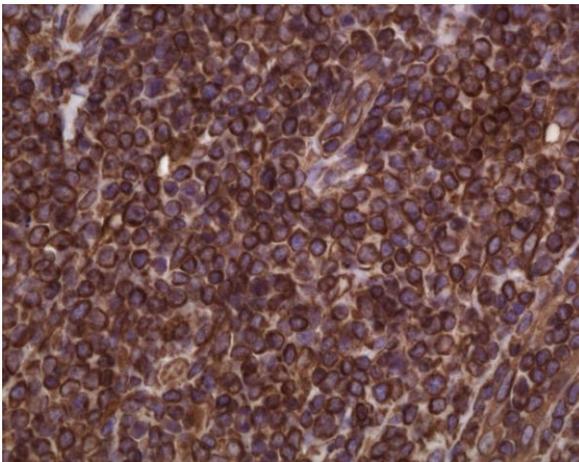


Abb. 14: Antikörper-Klon E11. MCL: starke Anfärbung der Lymphomzellen; Tonsille: Anfärbung der Zellen des Keimzentrums und der Mantelzone sowie Hintergrundstrukturen.

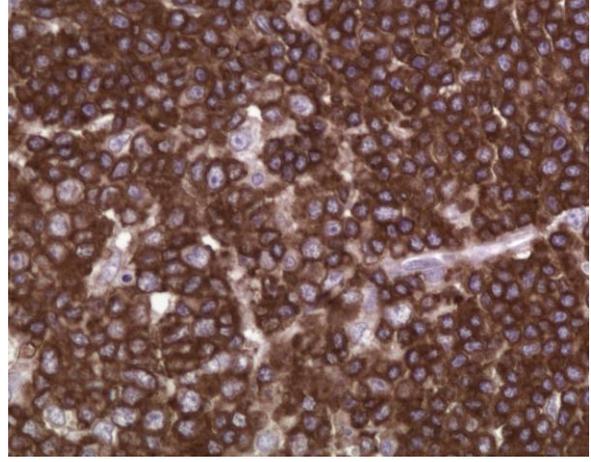
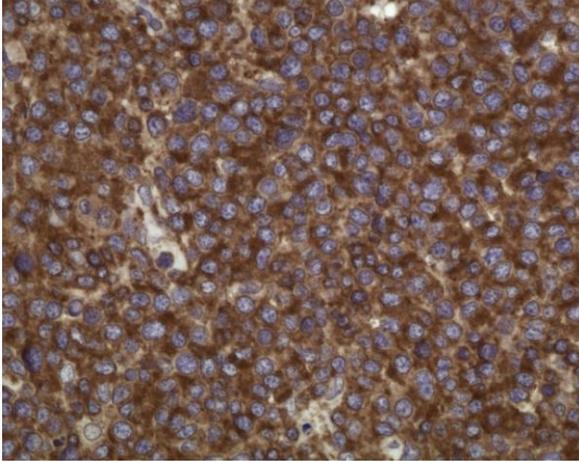
6.Runde:**MCL****Tonsille**

Abb. 15: Antikörper-Klon A2. MCL: starke Anfärbung der Lymphomzellen; Tonsille: starke Anfärbung sowohl der Zellen im Keimzentrums, als auch der Zellen der Mantelzone und der Hintergrundstrukturen.

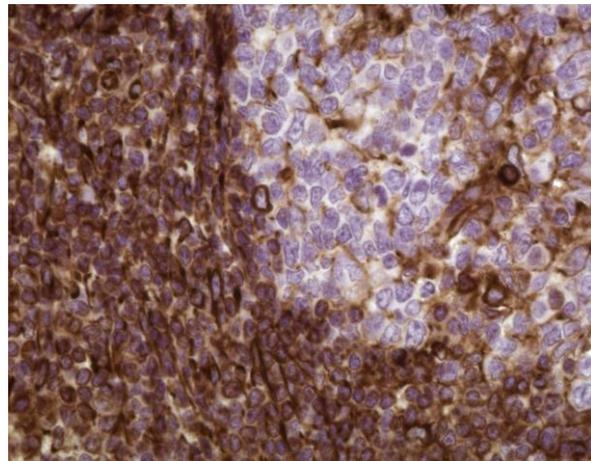
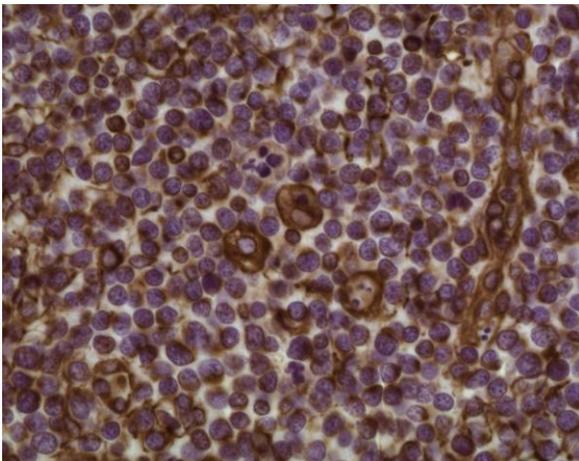


Abb. 16: Antikörper-Klon B2. MCL: Anfärbung der Lymphomzellen; Tonsille: Aussparung des Keimzentrums, starke Anfärbung der Zellen der Mantelzone und der Hintergrundstrukturen, vor allem Endothelien und Histiocyten.

Abb. 17 – 24: Beispiele für die Anfärbung verschiedener Hintergrundstrukturen.

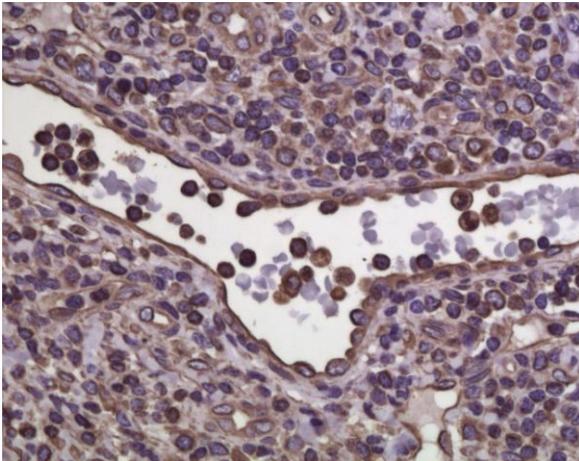


Abb. 17: Antikörper-Klon A3, 5. Runde:
Anfärbung von Endothelien und intra-
vasalen Leukozyten (1:400)

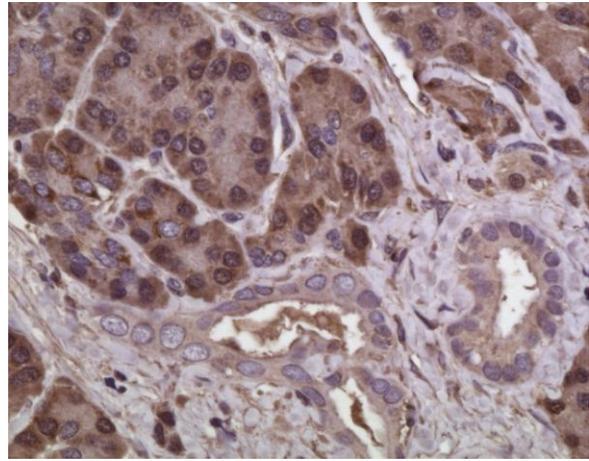


Abb. 18: Antikörper-Klon D3, 5. Runde:
Anfärbung der Azini und Ausführungs-
gänge in Pankreasgewebe (1:400)

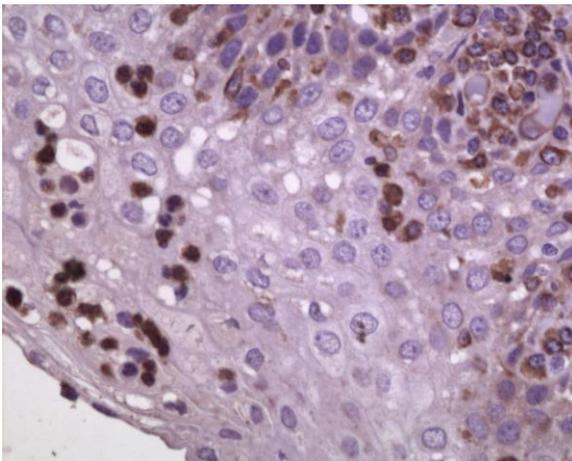


Abb. 19: Antikörper-Klon A3, 5. Runde:
Anfärbung intraepithelial gelegener
Lymphozyten (1:400)

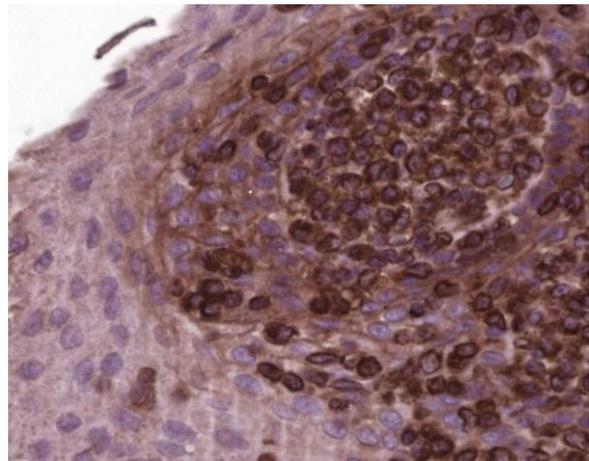


Abb. 20: Antikörper-Klon AbyD02701, 5.
Runde: Anfärbung einer intraepithelial
gelegenen Leukozytenansammlung (1:400)

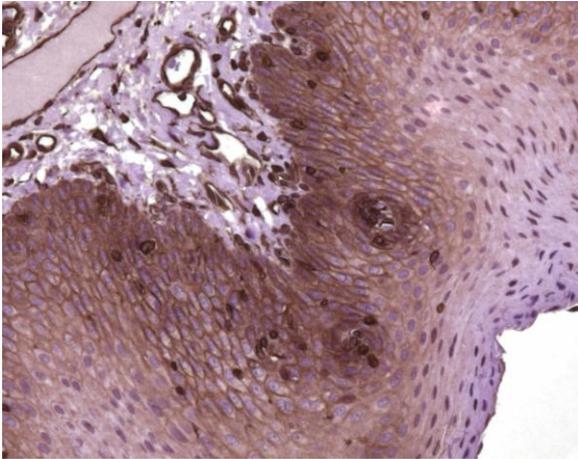


Abb. 21: Antikörper-Klon AbyD02701, 5. Runde: Anfärbung der basalen Schichten des Epithels (1:200)

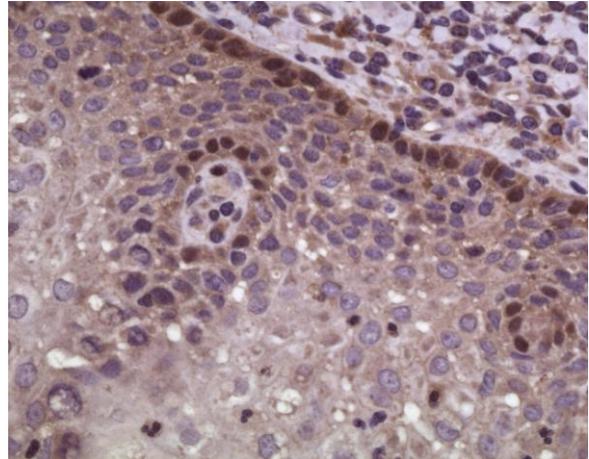


Abb. 22: Antikörper-Klon D3, 5. Runde: Anfärbung der Basalzellen des Epithels (1:400)

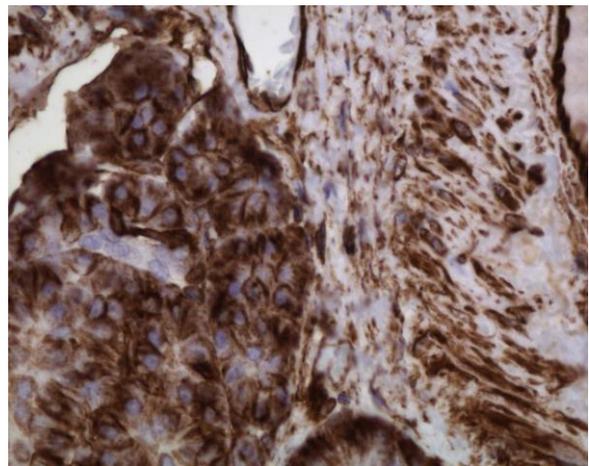
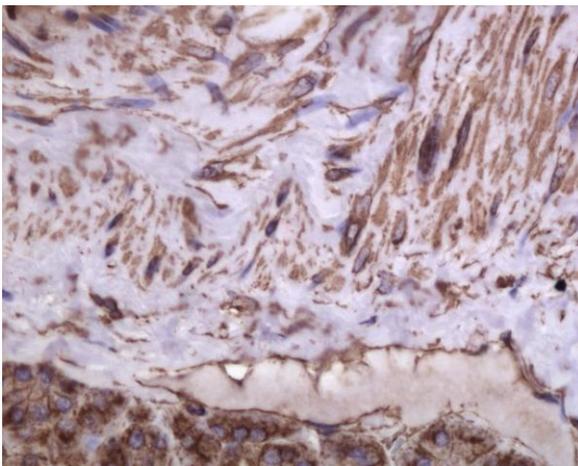


Abb. 23 und 24: Antikörper-Klon AbyD02701, 5. Runde: Anfärbung von Fibrozyten und Myozyten im lockeren Bindegewebe (1:400)

1. [gi|37852](#) **Mass:** 53653 **Total score:** 1158 **Peptides matched:** 50
vimentin [Homo sapiens]
 Check to include this hit in error tolerant search or archive report

Query	Observed	Mr(expt)	Mr(calc)	Delta	Miss	Score	Rank	Peptide
<input checked="" type="checkbox"/> 122	523.34	1044.67	1045.52	-0.86	0	26	1	LQEMLQR
<input checked="" type="checkbox"/> 128	544.84	1087.67	1087.53	0.14	0	74	1	QVDNNSLAR
<input checked="" type="checkbox"/> 130	547.32	1092.63	1092.52	0.11	0	68	1	FADLSEAANR
<input checked="" type="checkbox"/> 136	558.30	1114.59	1114.56	0.02	0	55	1	VELQELNDR
<input checked="" type="checkbox"/> 137	558.35	1114.69	1114.56	0.12	0	(28)	1	VELQELNDR
<input checked="" type="checkbox"/> 138	561.44	1120.87	1120.58	0.29	0	44	1	EYQDLLNVK
<input checked="" type="checkbox"/> 151	584.81	1167.61	1168.71	-1.10	0	(13)	1	ILLAELEQLK
<input checked="" type="checkbox"/> 152	585.37	1168.73	1168.71	0.02	0	(49)	1	ILLAELEQLK
<input checked="" type="checkbox"/> 153	585.45	1168.89	1168.71	0.18	0	73	1	ILLAELEQLK
<input checked="" type="checkbox"/> 181	627.91	1253.81	1253.56	0.25	0	(37)	1	LGDLYEEMR
<input checked="" type="checkbox"/> 182	627.93	1253.85	1253.56	0.29	0	79	1	LGDLYEEMR
<input checked="" type="checkbox"/> 183	628.39	1254.77	1253.56	1.21	0	(5)	1	LGDLYEEMR
<input checked="" type="checkbox"/> 191	635.86	1269.71	1269.55	0.15	0	(36)	1	LGDLYEEMR + Oxidation (M)
<input checked="" type="checkbox"/> 196	648.49	1294.97	1294.66	0.31	0	(43)	1	MALDIETATYR
<input checked="" type="checkbox"/> 205	655.34	1308.67	1308.60	0.07	0	(57)	1	NLQEAEBWYK
<input checked="" type="checkbox"/> 206	655.42	1308.83	1308.60	0.23	0	59	1	NLQEAEBWYK
<input checked="" type="checkbox"/> 207	655.43	1308.85	1308.60	0.25	0	(27)	1	NLQEAEBWYK
<input checked="" type="checkbox"/> 208	656.36	1310.71	1310.65	0.05	0	(49)	1	MALDIETATYR + Oxidation (M)
<input checked="" type="checkbox"/> 210	656.40	1310.79	1310.65	0.13	0	52	1	MALDIETATYR + Oxidation (M)
<input checked="" type="checkbox"/> 219	662.34	1322.67	1322.61	0.06	0	(15)	1	EBAENTLQSPR
<input checked="" type="checkbox"/> 220	662.36	1322.71	1322.61	0.10	0	46	1	EBAENTLQSPR
<input checked="" type="checkbox"/> 238	714.18	1426.35	1427.70	-1.36	0	(4)	1	SLYASSPGGVYATR
<input checked="" type="checkbox"/> 239	714.28	1426.55	1427.70	-1.16	0	(36)	1	SLYASSPGGVYATR
<input checked="" type="checkbox"/> 240	714.90	1427.79	1427.70	0.08	0	(8)	1	SLYASSPGGVYATR
<input checked="" type="checkbox"/> 241	714.91	1427.81	1427.70	0.10	0	(22)	1	SLYASSPGGVYATR
<input checked="" type="checkbox"/> 242	714.92	1427.83	1427.70	0.12	0	(29)	1	SLYASSPGGVYATR
<input checked="" type="checkbox"/> 243	714.93	1427.85	1427.70	0.14	0	(46)	1	SLYASSPGGVYATR
<input checked="" type="checkbox"/> 244	714.93	1427.85	1427.70	0.14	0	(39)	1	SLYASSPGGVYATR
<input checked="" type="checkbox"/> 245	714.98	1427.95	1427.70	0.24	0	72	1	SLYASSPGGVYATR
<input checked="" type="checkbox"/> 287	748.44	1494.87	1494.78	0.09	0	9	1	TYSLGSAALRPSTSR
<input checked="" type="checkbox"/> 310	767.46	1532.91	1532.84	0.06	1	43	1	KVESLQEBIAPLK
<input checked="" type="checkbox"/> 315	770.52	1539.03	1538.90	0.12	1	42	1	ILLAELEQLKGGK
<input checked="" type="checkbox"/> 327	785.58	1569.15	1569.89	-0.74	0	(45)	1	ISLPLPNPSSLNLR
<input checked="" type="checkbox"/> 328	785.88	1569.75	1569.89	-0.14	0	(16)	1	ISLPLPNPSSLNLR
<input checked="" type="checkbox"/> 329	786.00	1569.99	1569.89	0.10	0	90	1	ISLPLPNPSSLNLR
<input checked="" type="checkbox"/> 330	786.01	1570.01	1569.89	0.12	0	(55)	1	ISLPLPNPSSLNLR
<input checked="" type="checkbox"/> 331	786.02	1570.03	1569.89	0.14	0	(43)	1	ISLPLPNPSSLNLR
<input checked="" type="checkbox"/> 332	786.50	1570.99	1569.89	1.10	0	(47)	1	ISLPLPNPSSLNLR
<input checked="" type="checkbox"/> 337	794.45	1586.89	1586.79	0.10	1	55	1	TNEKVELQELNDR
<input checked="" type="checkbox"/> 366	834.96	1667.91	1667.84	0.07	0	32	1	ETNLDSLPLVDTRSK
<input checked="" type="checkbox"/> 370	844.96	1687.91	1687.82	0.09	1	(21)	1	VEVERDNLAEDIMR
<input checked="" type="checkbox"/> 371	844.99	1687.97	1687.82	0.15	1	37	1	VEVERDNLAEDIMR
<input checked="" type="checkbox"/> 379	867.84	1733.67	1733.81	-0.14	1	73	1	LQDEIQNMKEBMR
<input checked="" type="checkbox"/> 391	918.94	1835.87	1835.79	0.07	0	29	1	DGQVINETSQHDHDL
<input checked="" type="checkbox"/> 422	729.70	2186.08	2185.96	0.12	0	(10)	1	EMENFAVEAANYQDTIGR
<input checked="" type="checkbox"/> 423	729.75	2186.23	2185.96	0.27	0	(15)	1	EMENFAVEAANYQDTIGR
<input checked="" type="checkbox"/> 424	1094.49	2186.97	2185.96	1.01	0	(59)	1	EMENFAVEAANYQDTIGR
<input checked="" type="checkbox"/> 426	735.01	2202.01	2201.95	0.05	0	70	1	EMENFAVEAANYQDTIGR + Oxidation (M)
<input checked="" type="checkbox"/> 447	790.12	2367.34	2366.12	1.22	1	14	1	LQEMLQREBAENTLQSPR + Oxidation (M)
<input checked="" type="checkbox"/> 453	798.47	2392.39	2392.13	0.26	1	23	1	EBAENTLQSPRQVDNNSLAR

Abb.25: Das Ergebnis der ESI-MS-Untersuchung zeigt eine 51%ige Übereinstimmung des durch den Antikörper AbyD02701 gebundenen Proteins mit Vimentin.

Abb. 26 und 27: Vergleichende Färbungen an Mantelzelllymphom und Tonsille mit den Antikörpern AbyD02701 und Anti-Vimentin Vim 3B4 (Vergrößerung 1:400).

MCL

Tonsille

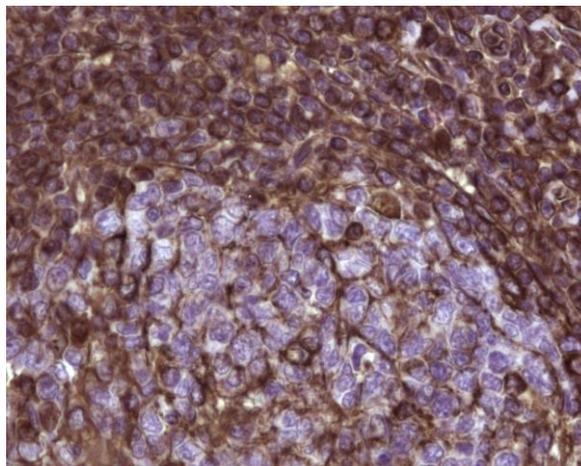
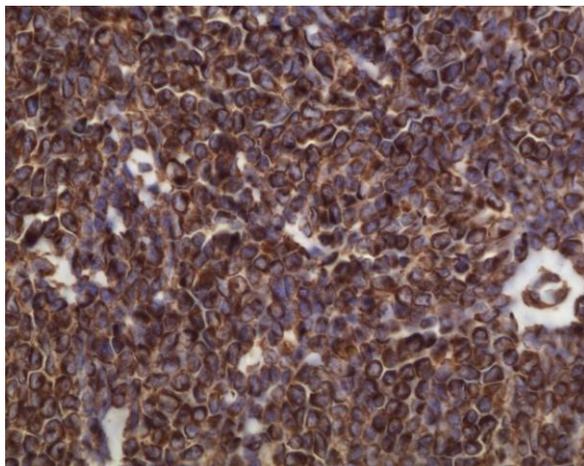


Abb. 26: Antikörper-Klon AbyD02701

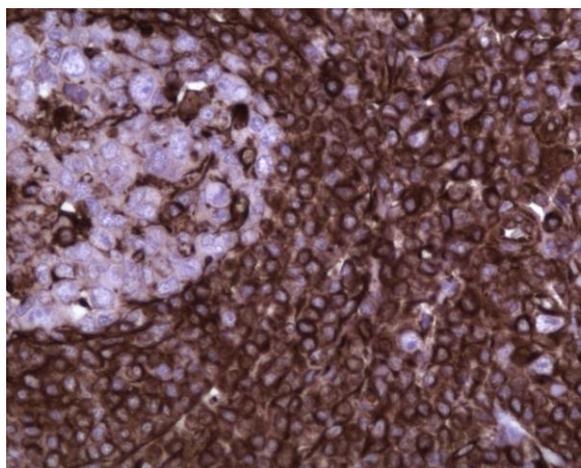
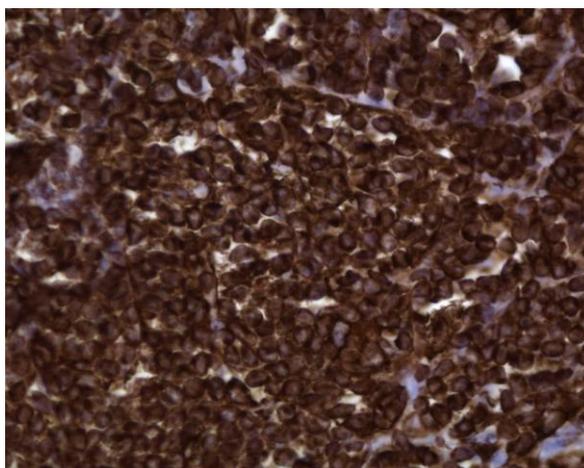


Abb. 27: Anti-Vimentin-Antikörper Vim 3B4

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt meinem Doktorvater, Herrn Prof. Dr. med. Hartmut Merz, für die Überlassung des Themas dieser Arbeit und die wertvollen Anregungen und die stets freundliche Unterstützung bei der Entstehung und Umsetzung.

Ganz besonders bedanken möchte ich mich auch bei Herrn Dr. med. Tiantom Jarutat, der mir während der gesamten Zeit mit viel Geduld tatkräftig unterstützend zur Seite stand und mir durch seine umfangreichen Erfahrungen und sein Wissen bei der Durchführung der Arbeit sehr geholfen hat.

Ich möchte mich auch bei Herrn Prof. Dr. med. A.-C. Feller für die Ermöglichung dieser Arbeit an dem Institut für Pathologie durch die Bereitstellung des Arbeitsplatzes und der Materialien bedanken.

Auch bei allen Mitarbeitern des Ecklabores möchte ich mich für die freundliche Unterstützung und stetige Hilfe durch Bereitstellung von Schnitten und geduldige Beantwortung aller Fragen bedanken.

Ganz besonderer Dank gilt an dieser Stelle auch Frau Alina Graeff, die mich bei der Durchführung des praktischen Teils gegen Ende hin sehr unterstützt hat und überdies hinaus zu einer sehr guten Freundin geworden ist.

Ich danke auch meinen Eltern, die mir mein Studium und die Durchführung dieser Dissertation ermöglichten, meinen Geschwistern und allen Freunden, die mir durch Kritik und Anregungen produktiv zur Seite standen.

Diese Arbeit widme ich Frau Mareike Middeke, der ich in enger Freundschaft verbunden bin.

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name	Cora Charlotte Nickels
Geburtsdatum	20.04.1980
Geburtsort	München
Staatsangehörigkeit	Deutsch

Schulabschluss

30.06.2000	Allgemeine Hochschulreife Theresien-Gymnasium, München
------------	---

Studium

2001 - 2003	Vorklinischer Abschnitt an der Georg-August-Universität Göttingen
12.09.2003	Erster Abschnitt der ärztliche Prüfung, Göttingen
2003 - 2007	Klinischer Abschnitt an der Universität zu Lübeck
13.11.2007	Zweiter Abschnitt der ärztlichen Prüfung, Lübeck

Praktisches Jahr

21.08.06 - 08.12.06	Innere Medizin: Kardiologie, Notaufnahme; Universitätsklinikum Lübeck
11.12.06 - 30.03.07	Chirurgie: Viszeralchirurgie, Traumatologie, Notaufnahme; Hôpital Riviera, Montreux, Schweiz
02.04.07 - 20.07.07	Wahlfach: Neurologie; Universitätsklinikum Lübeck

Promotion

Institut	Institut für Pathologie der Universität zu Lübeck
Betreuer	Prof. Dr. med. Hartmut Merz
2005 - 2008	Durchführung der praktischen Arbeit der Dissertation im Zeitraum Februar 2005 bis Oktober 2006

Beruf

seit dem 17.03.2008	Assistenzärztin für Innere Medizin / Kardiologie, Berlin
---------------------	--

Publikationen

Jarutat T, **Nickels C**, Frisch Ch, Stellmacher F, Hofig KP, Knappik A, Merz H: Selection of vimentin-specific antibodies from the HuCAL® phage display library by subtractive panning on formalin-fixed, paraffin-embedded tissue. Biol Chem 388:651-658 (2007)

Jarutat T, Frisch Ch, **Nickels C**, Merz H, Knappik A: Isolation and comparative characterization of Ki-67 equivalent antibodies from the HuCAL® phage display library. Biol Chem 387:995-1003 (2006)