

# **Identifizierung und Charakterisierung von Liganden für Faktor VIII neutralisierende Antikörper**

Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Naturwissenschaften

vorgelegt beim Fachbereich 15  
Biowissenschaften der  
Johann Wolfgang Goethe-Universität  
Frankfurt am Main



von  
**Christoph Michael Kessel**  
aus Nierstein am Rhein

Frankfurt am Main, 2008

Vom Fachbereich Biowissenschaften (15) der  
Johann Wolfgang Goethe-Universität als Dissertation angenommen.

Dekan: Prof. Dr. V. Müller

Erstgutachter: Prof. Dr. A. Starzinski-Powitz

Zweitgutachter: PD Dr. W. Kreuz

Datum der Disputation: 21.07.2008

*Meinen Eltern  
Meinem Bruder*

*&*

*Anne & Michael Farrell*

*„All we have to decide is what to do with the time that is given to us.“*

*J.R.R. Tolkien*

# Danksagungen

Die vorliegende Arbeit wurde in der Arbeitsgruppe von Herrn PD. Dr. Wolfhart Kreuz am Klinikum für Kinderheilkunde III der Johann Wolfgang Goethe-Universität angefertigt. Mit dieser Arbeit entstand dort die Arbeitsgruppe für Molekulare Hämostaseologie und Immundefizienz.

Frau Prof. Dr. A. Starzinski-Powitz möchte ich herzlich für die freundliche, unkomplizierte Betreuung dieser Arbeit am Fachbereich Biowissenschaften der J. W. Goethe-Universität in Frankfurt am Main danken.

Herrn PD. Dr. Wolfhart Kreuz möchte ich besonders für seine Unterstützung danken, ohne die diese Arbeit sowie die Entstehung der Molekularen Hämostaseologie nicht möglich gewesen wäre.

Ganz besonders möchte ich mich bei meinem Kollegen, Freund und Mentor Christoph Königs für seine ständige Unterstützung und konstruktive Kritik bedanken. Ohne ihn wäre diese Arbeit nicht möglich gewesen.

Ganz herzlich möchte ich mich bei allen (ehemaligen) Mitarbeitern und Doktoranden der Molekularen Hämostaseologie, welche teilweise noch die Anfänge im Georg-Speyer-Haus begleitet haben, bedanken. Zu nennen sind dabei Janti Roland, Susanne Stumpf, Sabine Scholz, Katharina Klich, Karin Becker-Peters, Frank Vorpahl und Sebastian Heidemeyer. Außerdem Danke ich Ulrike Hauber sowie Kai Beuckmann für ihre Gesellschaft in unserem gemeinsamen Büro. Weiterhin möchte ich mich bei allen Ärzten und Schwestern der Station 31-1 für ihre Unterstützung bedanken.

Frau Dr. Ursula Dietrich möchte ich für ihre Unterstützung sowie die Bereitstellung von Arbeitsplatz im Georg-Speyer-Haus in den Anfängen dieser Arbeit danken. Ebenso gilt dieser Dank allen Mitarbeitern ihrer Arbeitsgruppe. Besonders herauszustellen ist dabei Margot Landersz, deren Arbeit im Sequenzierlabor für diese Arbeit unabdingbar war.

Außerdem möchte ich bei allen Mitgliedern der Arbeitsgruppe von Frau Prof. Dr. Dorothee Meike von Laer im Georg-Speyer-Haus für viel gemeinsamen Spaß, Diskussion und Unterstützung bedanken.

Weiterhin danke ich den Mitarbeitern des *Diagnostic Centers for Acute Leukemia (DCAL)* der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Dr. R. Marschalek für gute Gesellschaft, Diskussion und Spaß in unserem gemeinsamen Labor im Klinikum für Kinderheilkunde III.

Für konstruktive Kritik und Diskussion möchte ich darüber hinaus allen Teilnehmern des *Dutch-Germano-Americano-Franco Meeting on Hemophilia A* in Bitche (Frankreich) danken. Der Dank gilt vor allem Dr. Sebastien Lacroix-Desmazes (Centre de recherches biomédicales des Cordeliers, Paris), Prof Dr. David W. Scott (University of Maryland, School of Medicine, Baltimore) und Dr. James Irving (Institute for Structural Biology, Oxford).

Prof Dr. Ian Mackay (Monash University, Melbourne) und Dr. Ursula Dietrich danke ich für kritische Rezension von Manuskripten.

Zuletzt möchte ich mich bei allen Menschen in meinem Umfeld, Freunden und Bekannten für ihre Unterstützung in den vergangenen vier Jahren sowie das gemeinsame Leben außerhalb des Labors bedanken. Ganz besonderer Dank gilt dabei meinen ehemaligen Kommilitonen und Freunden Dr. Michael Burkard, Sebastian Newrzela sowie Nariman Ansari.

# Inhaltsverzeichnis

<b>Zusammenfassung</b> .....	<b>1</b>
<b>1. Einleitung</b> .....	<b>3</b>
<b>1.1 Die Blutgerinnung</b> .....	<b>3</b>
<b>1.2 Das Faktor VIII Protein</b> .....	<b>5</b>
<b>1.3 Hämophilie A</b> .....	<b>7</b>
<b>1.4 Faktor VIII-neutralisierende Antikörper</b> .....	<b>9</b>
1.4.1 Immunologie .....	10
1.4.2 Molekulare Charakteristika.....	14
<b>1.5 Immuntoleranz Induktion (ITI)</b> .....	<b>16</b>
<b>1.6 Neue Therapie-Strategien</b> .....	<b>19</b>
<b>1.7 Das Phage Display-Verfahren</b> .....	<b>21</b>
<b>1.8 Zielsetzung der Arbeit</b> .....	<b>25</b>
<b>2. Material &amp; Methoden</b> .....	<b>26</b>
<b>2.1 Material</b> .....	<b>26</b>
2.1.1 Laborgeräte und Einwegartikel.....	26
2.1.2 Chemikalien, Biochemikalien, Puffer und Medienbestandteile.....	27
2.1.3 Lösungen und Medien .....	29
2.1.4 Kits.....	30
2.1.5 Enzyme, Zytokine, Faktoren, Standards.....	31
2.1.6 Antikörper .....	31
2.1.7 Vektoren.....	33
2.1.8 Oligonukleotide.....	35
2.1.9 Synthetische Peptide.....	38

2.1.10	Bakterienstämme .....	40
2.1.11	Zelllinien .....	40
2.1.12	PDB-Dateien .....	41
<b>2.2</b>	<b>Methoden .....</b>	<b>43</b>
<b>2.2.1</b>	<b>Patienten .....</b>	<b>42</b>
2.2.1.1	Inhibitor- sowie CD20 <sup>+</sup> Zellverläufe .....	42
2.2.1.2	Gewinnung von Patientenplasma .....	42
<b>2.2.2</b>	<b>Arbeiten mit Escherichia coli .....</b>	<b>43</b>
2.2.2.1	Kulturbedingungen von <i>E. coli</i> .....	43
2.2.2.2	Herstellung chemisch-kompetenter <i>E. coli</i> .....	43
2.2.2.3	Transformation chemisch-kompetenter <i>E. coli</i> .....	43
2.2.2.4	Anzucht von Einzelklonen (analytische Plasmidpräparation) .....	44
2.2.2.5	Anzucht von Einzelklonen (präparative Plasmidpräparation) .....	44
2.2.2.6	<i>E. coli</i> ER2738 Vorkultur .....	44
2.2.2.7	Lagerung von <i>E. coli</i> .....	44
<b>2.2.3</b>	<b>Arbeiten mit Bakteriophagen .....</b>	<b>44</b>
2.2.3.1	Phage Display-Selektion (Biopanning) .....	44
2.2.3.2	Vereinzelung von Phagen (Titern) .....	46
2.2.3.3	Anzucht von Einzelklonen .....	47
2.2.3.4	Konzentrationsbestimmung von Phagen .....	48
<b>2.2.4</b>	<b>Molekularbiologische Methoden .....</b>	<b>48</b>
2.2.4.1	Analytische Plasmidpräparation .....	48
2.2.4.2	Präparative Plasmidpräparation .....	48
2.2.4.3	Gelelektrophorese von DNA .....	48
2.2.4.4	Isolierung und Reinigung von DNA-Fragmenten .....	48
2.2.4.5	Isolierung von ssDNA aus Phagen .....	49
2.2.4.6	Sequenzierung .....	49
2.2.4.7	Phosphorylierung von Oligonukleotiden .....	50
2.2.4.8	Hybridisierung von Oligonukleotiden .....	50

2.2.4.9	PCR-Amplifikation einzelner FVIII-Domänen.....	50
2.2.4.10	Umklonierung der Signalpeptid-DNA in 364H.....	50
2.2.4.11	Klonierung von FVIII-Domänen.....	51
2.2.4.12	Fusion selektierter Peptidliganden an C4bp <sub>α</sub> .....	52
<b>2.2.5</b>	<b>Proteinbiochemische Methoden .....</b>	<b>53</b>
2.2.5.1	FVIII-spezifische Subklassen-Verläufe.....	53
2.2.5.2	Bestimmung der FVIII-Konzentration für eine kompetitive Elution.....	53
2.2.5.3	ELISA mit Phagenpopulationen aus einzelnen Selektionsschritten.....	53
2.2.5.4	Phagen-ELISA .....	54
2.2.5.5	ELISA mit ausgewählten Phagenklonen .....	54
2.2.5.6	Inhibitionstest mit ausgewählten Phagenklonen .....	55
2.2.5.7	Relative Konzentrationsangleichung exprimierter FVIII-Domänen.....	55
2.2.5.8	Untersuchung der Domänenspezifität von Patienten-IgG.....	55
2.2.5.9	Untersuchung der Subklassenverteilung auf FVIII-Domänen.....	56
2.2.5.10	ELISA mit synthetischen Peptiden.....	56
2.2.5.11	Inhibitionstest mit synthetischen Peptiden.....	56
2.2.5.12	ELISA mit Multimeren.....	56
2.2.5.13	Inhibitionstest mit Multimeren.....	57
2.2.5.14	ELISA mit Überständen stimulierter Zellen .....	57
2.2.5.15	Bethesda-Test mit synthetischen Peptiden.....	57
2.2.5.16	Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE) .....	57
2.2.5.17	Western Blot.....	58
2.2.5.18	Aufreinigung und Charakterisierung von Multimeren .....	58
2.2.5.19	Stabilitätstest mit Multimeren und Peptiden.....	59
2.2.5.20	Markierung von FVIII mit Fluorescein-5-isothiocyanat .....	59
<b>2.2.6</b>	<b>Zellkultur .....</b>	<b>59</b>
2.2.6.1	Isolierung von PBMCs aus Blut.....	59
2.2.6.2	Bestimmung der Zellzahl.....	60
2.2.6.3	Anlegen von Kryokulturen .....	60
2.2.6.4	Auftauen von Zellen.....	60
2.2.6.5	Kultivierung von PBMCs .....	60
2.2.6.6	Kultivierung von 293T-Zellen .....	60

2.2.6.7	Transiente Transfektion .....	61
2.2.6.8	Expression von FVIII-Domänen in 293T-Zellen .....	61
2.2.6.9	Expression von C4bp $_{\alpha}$ -Peptid-Multimeren in 293T-Zellen .....	61
2.2.6.10	Färbung von B-Zellen mit FVIII-FITC .....	62
2.2.6.11	Färbung von B-Zellen mit Peptiden .....	62
2.2.6.12	Polyklonale Stimulation von B-Zellen in PBMCs .....	62
2.2.6.13	ELISPOT .....	63
2.2.6.14	Differenzierung stimulierter Zellen .....	63
2.2.6.15	Detektion der Zellproliferation .....	63
<b>2.2.7</b>	<b><i>In silico</i>-Analysen .....</b>	<b>64</b>
2.2.7.1	Epitopkartierung .....	64
2.2.7.2	Klonierungsplanung und Sequenzanalysen .....	64
2.2.7.3	Strukturvorhersagen und Modellierungen .....	64
2.2.7.4	Durchflußzytometrie-Daten .....	64
2.2.7.5	Statistik .....	64
<b>3.</b>	<b>Ergebnisse .....</b>	<b>65</b>
<b>3.1</b>	<b>Phage Display-Selektion Inhibitor-spezifischer Peptide und Epitopkartierung .....</b>	<b>65</b>
3.1.1	Inhibitorverläufe der HA Patienten .....	65
3.1.2	Patientenplasmen enthalten FVIII-spezifisches IgG <sub>1</sub> - sowie IgG <sub>4</sub> .....	67
3.1.3	Anreicherung von Phagenpopulationen mit Spezifität für IgG in Patientenplasmen .....	68
3.1.4	Selektierte Einzelklone sind spezifisch für IgG in Patientenplasmen .....	70
3.1.5	Die AS-Sequenzen der selektierten Peptide weisen Konsensusmotive auf .....	71
3.1.6	Epitopkartierungen der Konsensusmotive identifizieren konformationelle Epitope in der A2- und C2-Domäne .....	76
3.1.7	Bestätigung der Domänenspezifität der <i>in silico</i> -Epitopkartierung .....	78
3.1.8	Selektierte Phagenklone binden anti-FVIII Antikörper .....	82

	Zusammenfassung von Abschnitt 3.1.....	84
<b>3.2</b>	<b>Synthetische Peptidliganden für FVIII-Inhibitoren.....</b>	<b>85</b>
3.2.1	Synthetische Peptide binden IgG in Patientenplasma .....	85
3.2.2	Die IgG-Bindung erfolgt primär durch die Aminosäuren der Konsensusmotive.....	87
3.2.2	Synthetische Peptide blockieren FVIII-Inhibitoren .....	88
3.2.3	Die Kombination von Peptiden verbessert deren Inhibitionseigenschaften ....	91
	Zusammenfassung von Abschnitt 3.2.....	93
<b>3.3</b>	<b>Optimierung und Stabilisierung von Peptidliganden durch Multimerisierung .....</b>	<b>94</b>
3.3.1	Durch Fusion an C4bp <sub>α</sub> lassen sich die Peptide multimerisieren und binden IgG in Patientenplasma.....	94
3.3.2	Die Multimerisierung der Peptide verbessert die Bindung von FVIII-Inhibitoren.....	98
3.3.3	Die Peptide 12C6 und 12H10 lassen sich in einem Heteromultimer kombinieren.....	99
3.3.4	Die Expression der Peptide in multimerer Form verlängert deren Halbwertszeit.....	101
	Zusammenfassung Abschnitt 3.3 .....	102
<b>3.4</b>	<b>Targeting von Gedächtnis-B-Zellen.....</b>	<b>102</b>
3.4.1	CD19 <sup>+</sup> IgG <sup>+</sup> B-Zellen in PBMC-Präparationen lassen sich mit FVIII-FITC oder synthetischen Peptiden anfärben.....	103
3.4.2	Gedächtnis-B-Zellen in PBMC-Präparationen lassen sich polyklonal stimulieren .....	105
3.4.3	Nachweis antigenspezifischer Gedächtnis-B-Zellen im ELISPOT.....	107
	Zusammenfassung von Abschnitt 3.4.....	109

<b>4.</b>	<b>Diskussion .....</b>	<b>110</b>
4.1	Phage Display als Methode der Wahl zur Identifizierung konformationeller Epitope FVIII neutralisierender Antikörper.....	110
4.2	Phage Display-Selektion von strukturellen und konformationellen Mimotopen mittels kompetitiver sowie pH-shift Elution .....	112
4.3	Beteiligung der identifizierten Aminosäuren an strukturellen, funktionellen Epitopen FVIII neutralisierender Antikörper.....	114
4.4	Beteiligung der identifizierten Aminosäuren an immundominanten Epitopen FVIII neutralisierender Antikörper .....	116
4.5	Relevanz der Peptide 12C6 und 12H10 als funktionelle Mimotope FVIII neutralisierender Antikörper .....	119
4.6	Bindung von IgG <sub>1</sub> und IgG <sub>4</sub> anti-FVIII Antikörpern durch die funktionellen Mimotope .....	121
4.7	Multimerisierung der Mimotope als Basis zu Entwicklung therapeutisch nutzbarer Proteine .....	122
4.8	Mimotop-vermitteltes Targeting antigenspezifischer B-Zellen .....	125
4.9	Schlussfolgerung.....	127
<b>5.</b>	<b>Literatur.....</b>	<b>129</b>
<b>6.</b>	<b>Anhang.....</b>	<b>141</b>
6.1	Kladogrammanalysen der Sequenzen ELISA-positiver Phagenklone ...	141
6.1.1	Patient 1 (A).....	141
6.1.2	Patient 1 (B) .....	142
6.1.3	Patient 2 (A).....	143
6.1.4	Patient 2 (B) .....	144
6.2	Abkürzungsverzeichnis .....	145
6.3	Einbuchstabencode für Aminosäuren.....	147
6.4	Publikationen und Kongressbeiträge.....	148

<b>Lebenslauf.....</b>	<b>150</b>
<b>Eidesstattliche Erklärung.....</b>	<b>152</b>

## Zusammenfassung

Das Fehlen von funktionellem Blutgerinnungsfaktor VIII (FVIII) in Hämophilie A- (HA-) Patienten wird durch Substitution mit FVIII-Präparaten therapiert. Die wesentlichste gegenwärtige Komplikation der FVIII-Ersatz-Therapie besteht in dem Auftreten von FVIII neutralisierenden Antikörpern (Inhibitoren) gegenüber exogenem FVIII. Diese können mittels verschiedener, kostenintensiver Therapien zur Induktion einer Immuntoleranz (ITI) mit unterschiedlichem Erfolg eliminiert werden. Für Patienten mit persistierenden Inhibitoren bedeuten diese nicht nur eine drastische Verminderung der Lebensqualität sondern ein lebensbedrohliches Szenario. Eine Liganden-vermittelte Blockierung von neutralisierenden anti-FVIII Antikörpern sowie die zielgerichtete Ansteuerung des Rezeptors FVIII-spezifischer Gedächtnis-B-Zellen stellen mögliche Ansätze zur Verwirklichung antigenspezifischer ITI-Strategien für eine dauerhafte, vollständige Eliminierung von FVIII-Inhibitoren dar.

Zu diesem Zweck wurden in dieser Arbeit durch Screening von phagenpräsentierten, randomisierten Peptidbibliotheken mit Inhibitor-positiven Patientenplasmen Peptidliganden selektioniert. Diese wiesen eine spezifische Bindung von anti-FVIII Antikörpern in den verwendeten Plasmen auf. Durch den Einsatz entsprechender Software konnten AS-Konsensusmotive der Peptidsequenzen möglichen, konformationellen, funktionellen Inhibitorepitopen in der A2- sowie C2-Domäne von FVIII zugeordnet werden. Die von *in silico*-Analysen vorgegebene Domänenspezifität der anti-FVIII Antikörper wurde in Bindungsstudien mit rekombinant exprimierten FVIII-Domänen verifiziert. Die korrespondierenden, synthetischen Peptidliganden blockierten die IgG-Bindung an FVIII und regenerierten partiell dessen Aktivität im Plasma. Die Peptide stellten funktionelle Mimotope der möglichen Inhibitorepitope in der A2- und C2-Domäne dar. Da FVIII neutralisierende Antikörper zumeist Epitope in beiden Domänen erkennen, wurden die Mimotope kombiniert, was in einer noch effektiveren Blockierung von FVIII-Inhibitoren resultierte. Weiterhin wiesen Mimotopkombinationen Kreuzreaktivität mit anti-FVIII IgG in heterologen Patientenplasmen auf. Durch Fusion der Peptide an die Multimerisierungsdomäne der  $\alpha$ -Kette des humanen C4-Bindeproteins konnten in Zellkultur heptamere Proteine generiert werden. Gegenüber den synthetischen Peptiden wiesen die Multimere aufgrund ihrer Multivalenz sowie der strukturellen Integrität eine deutlich verbesserte Blockierung von anti-FVIII IgG auf. Das Multimerisierungskonzept erlaubte ferner die Kombination unterschiedlicher Peptidliganden in einem Heteromultimer, was anhand der selektierten, funktionellen Mimotope für mögliche A2- und C2-Epitope getestet wurde. Weiterhin zeichneten sich die

Inhibitor-spezifischen Multimere gegenüber den synthetischen Peptiden durch deutlich verlängerte Halbwertszeiten aus. In Präparationen peripherer mononuklearer Zellen (PBMCs) von Patienten färbten synthetische Peptide sowie Fluoreszenz-markierter FVIII B-Zellsubpopulationen mit einem Gedächtnis-B-Zell Phänotyp (CD19<sup>+</sup>IgG<sup>+</sup>). Gedächtnis-B-Zellen in PBMCs wurden polyklonal stimuliert. Im ELISPOT-Verfahren konnten Tetanus-spezifische, jedoch keine FVIII-spezifischen Zellen, detektiert werden. Im Gegensatz zu den verwandten Kontrollen bewirkte eine Präinkubation der Zellen mit dem Peptid 12C6, welches an das toxische D-AS-Peptid (KLAKLAK)<sub>2</sub> gekoppelt war, allerdings eine Reduktion von anti-FVIII IgG in den Überständen stimulierter Zellen.

# 1. Einleitung

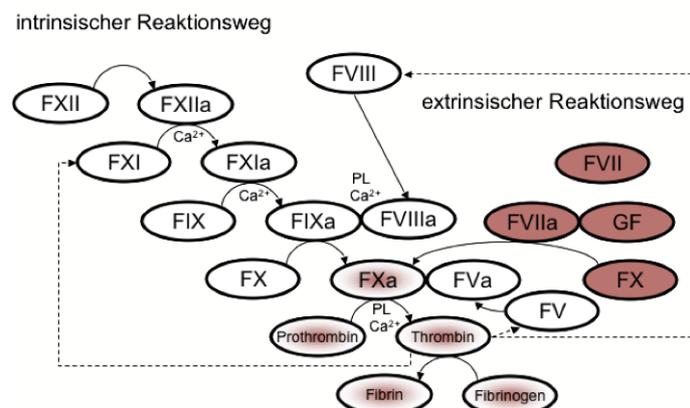
## 1.1 Die Blutgerinnung

Bei Gewebsverletzungen schützt sich der gesunde Organismus vor übermäßigem Blutverlust durch den Vorgang der Blutungsstillung (Hämostase). Ein Zusammenspiel von vaskulären (Blutgefäßen), zellulären (Thrombozyten) und plasmatischen (Gerinnungsfaktoren) Komponenten bewirkt die Gerinnung des Blutes.

In Folge einer Gewebsverletzung wird in der Phase der primären Hämostase zunächst durch Reizung glatter Muskelzellen eine Verlangsamung des Blutstromes durch reflektorische Kontraktion der Blutgefäße bewirkt. Die nachfolgende zelluläre und plasmatische Gerinnung wird hierdurch begünstigt. Die Gefäßverletzung führt zur Freilegung subendothelialer Kollagenfasern, an welche Thrombozyten über Membranglykoproteine binden. Die Thrombozytenadhäsion erfolgt mit Hilfe des von Willebrand-Faktors (vWF). Durch den Kontakt mit Kollagen sowie vWF aktivierte Thrombozyten setzen Agonisten wie Adenosin-5'-diphosphat (ADP) frei um weitere Thrombozyten anzulocken. Es werden synergistisch wirkende, vasokonstriktorische Faktoren wie Serotonin und das Gewebshormon Thromboxan A<sub>2</sub> freigesetzt, welches darüber hinaus zusammen mit PDGF (*platelet derived growth factor*) aggregations-, adhäsions- und wachstumsfördernd auf die Thrombozyten wirkt. Diese verzahnen sich eng über Kalzium induzierte Pseudopodienbildung. Eine Umorganisation der Thrombozytenmembran bewirkt die Exposition des Rezeptorkomplexes GPIIb/IIIa, an welchen Fibronectin und über die plasmatische Gerinnung

generiertes Fibrinogen sowie Fibrin binden. Der daraus resultierende weiße Thrombus wird durch Kontraktion der Thrombozyten auf einen Bruchteil seiner ursprünglichen Größe reduziert und verfestigt sich.

Die plasmatische Gerinnung (Abb. 1.1) kann je nach auslösendem Mechanismus zwei



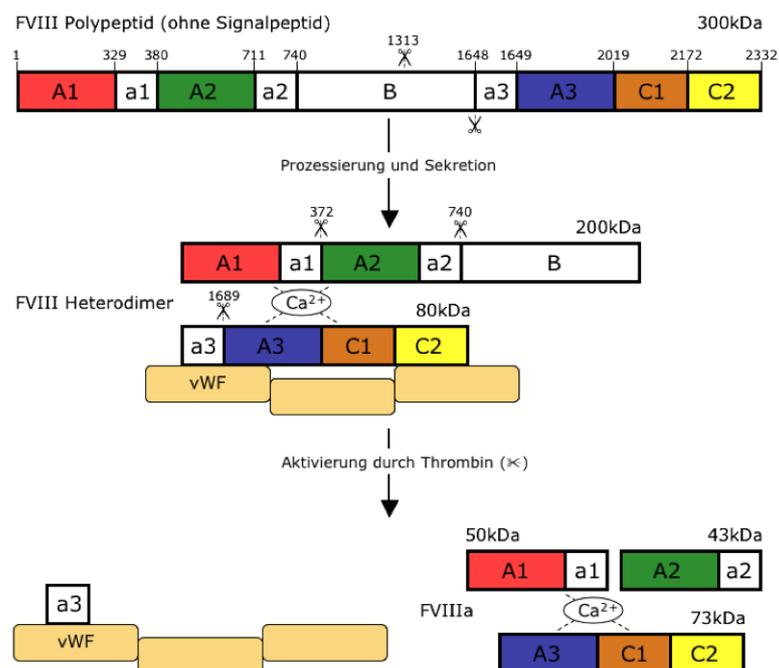
**Abb. 1.1 Die Gerinnungskaskade.** Weiß hinterlegte Proteine partizipieren nur am intrinsischen, rot hinterlegte nur am extrinsischen Reaktionsweg. Rot-weiß hinterlegte Proteine sind an beiden Reaktionswegen beteiligt.

Wege beschreiten (Mann *et al.*, 1999). Der initiale, extrinsische Reaktionsweg wird unverzüglich an der Stelle der Gewebsverletzung bei Freisetzung von Gewebefaktor (GF) ausgelöst. Dieser bindet an Faktor VII wodurch die Serin-Protease vermittelte Aktivierung von Faktor VII (FVII) zu FVIIa initiiert wird (Broze *et al.*, 1985). Dieser extrinsische Tenase-Komplex wandelt proteolytisch Faktor X (FX) in FXa um, welcher zunächst nur pikomolare Konzentrationen von Thrombin generiert (Di Scipio *et al.*, 1977; Tracy *et al.*, 1981). Thrombin spaltet Fibrinogen und initiiert damit die Bildung eines Blutgerinnsels bestehend aus einem Fibrin-Netzwerk (Mann *et al.*, 1990). Über den extrinsischen Reaktionsweg generiertes Thrombin aktiviert proteolytisch diverse Gerinnungs-Faktoren (Eaton *et al.*, 1986), darunter Faktor V (FV) und Faktor VIII (FVIII). FVIII stellt einen zentralen, regulatorischen Cofaktor in diesem Reaktionsweg dar (Lawson *et al.*, 1994). FVIII tritt in einem nicht kovalenten Komplex mit dem von Willebrand Faktor (vWF) auf (Foster *et al.*, 1987). Bei vWF handelt es sich um ein multimeres Protein, welches multivalent für FVIII ist. In Folge der Aktivierung von FVIII zu FVIIIa durch Thrombin werden die hydrophoben Wechselwirkungen zwischen FVIII und vWF gelöst (Saenko und Scandella, 1995). In Gegenwart von Kalzium sowie negativ geladenen Phospholipiden auf der Oberfläche von aktivierten Thrombozyten bindet FVIIIa an Faktor IXa (FXa) und bildet somit den intrinsischen Tenase-Komplex. Dieser katalysiert, im Gegensatz zum extrinsischen Tenase-Komplex, die Umwandlung von FX in FXa 50 bis 100fach schneller (van Dieijen *et al.*, 1981). FVIII führt eine entscheidende, konformationelle Änderung in FIXa herbei und gewährleistet somit dessen volle Serin-Proteasen-Aktivität. Ferner wird durch die Präsenz von FVIII im Komplex mit FIXa dessen Affinität an die Oberfläche aktivierter Thrombozyten um das fünffache gesteigert. FXa bildet auf der Membranoberfläche mit dem Cofaktor Va (FVa) den Prothrombinase-Komplex, welcher den primären Aktivator von Prothrombin darstellt. Das generierte Thrombin verstärkt seine Produktion durch die Aktivierung von Faktor XI (FXI) sowie durch die Komplettierung der im extrinsischen Reaktionsweg begonnenen Aktivierung von FV und FVIII. Außerdem spaltet Thrombin Fibrinogen zu Fibrin und verstärkt damit das bereits über den extrinsischen Reaktionsweg gebildete Fibrin-Netzwerk nachhaltig.

Der extrinsische Reaktionsweg stellt eine stark beschleunigte, jedoch kurzlebige hämostatische Reaktion auf eine Gewebsverletzung dar (Rao und Rapaport, 1987) und initiiert darüber hinaus durch die Bildung von geringen Mengen Thrombin den intrinsischen Reaktionsweg, welcher für die eigentliche Blutgerinnung verantwortlich ist und aufgrund seiner Langlebigkeit deren Ausweitung sowie Anhalten fördert (Komiyama *et al.*, 1990).

## 1.2 Das Faktor VIII Protein

Im gesunden Menschen ist die Leber das primäre Organ der physiologischen Expression von FVIII. Das FVIII-Gen befindet sich ca. eine Megabase vom distalen Ende des langen Armes des X-Chromosomes (Xq28) entfernt und umfasst 26 Exons, welche für eine Polypeptidkette von 2351 Aminosäuren kodieren (Vehar *et al.*, 1984). Das unprozessierte Protein besteht aus sechs Domänen (**Abb. 1.2**), welche in der Reihenfolge NH<sub>3</sub>-A1-(a1)-A2-(a2)-B-(a3)-A3-C1-C2-COOH angeordnet sind (Saenko und Scandella, 1995). Die A-Domänen weisen untereinander eine Sequenzhomologie von 30% auf und werden von sauren *Spacern* (a1-3) mit einer hohen Dichte der Aminosäuren Asparagin und Glutamat flankiert. Die B-Domäne beinhaltet diverse Prozessierungsstellen, verfügt jedoch über keine bekannte hämostatische Funktion (Lenting *et al.*, 1998). Am Carboxylende befinden sich die homologen Domänen C1 und C2.



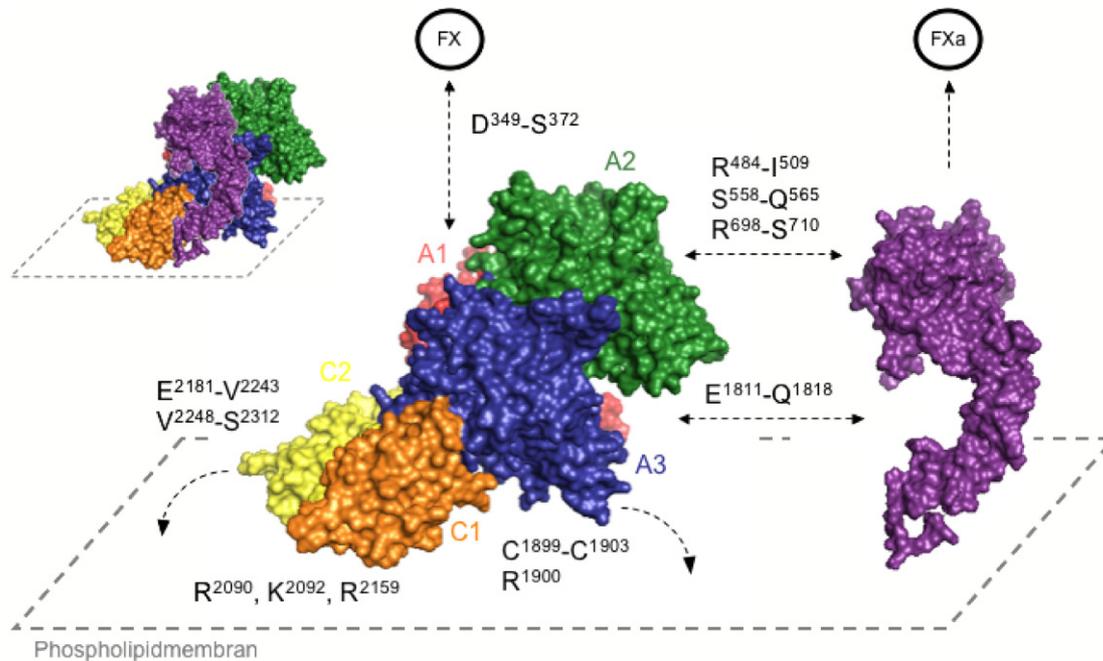
**Abb. 1.2 Prozessierung von FVIII.** Das FVIII-Polypeptid wird intrazellulär prozessiert und als Heterodimer sekretiert. Die aktive Form von FVIII besteht aus einem Heterotrimer, welches von vWF dissoziiert.

Um als aktiver Cofaktor zur Gerinnung beitragen zu können, muss das Polypeptid einige posttranslationale Modifikationen durchlaufen. Das FVIII-Polypeptid enthält 25 N-Glykosylierungsstellen, von welchen 19 in der B-Domäne liegen (Toole *et al.*, 1984). Diese Glykosylierung ist Voraussetzung für den Calnexin und Calreticulin vermittelten, intrazellulären Transport vom endoplasmatischen Retikulum (ER) zum Golgi-Apparat

(Moussalli *et al.*, 1999). Dort erfolgt die O-Glykosylierung sowie Sulfatierung von sechs Tyrosinen in den sauren Spacern, welche für die hochaffine Bindung an vWF sowie Aktivierung durch Thrombin verantwortlich sind (Pittmann *et al.*, 1992; Michnick *et al.*, 1994). Im Plasma zirkuliert das 2332 Aminosäuren umfassende Glykoprotein als Heterodimer (Kane und Davis, 1988). Dieses setzt sich aus einer leichten Kette bestehend aus den Domänen A3-C1-C2 sowie einer schweren Kette aus A1-, A2- und B-Domäne zusammen (**Abb 1.2**). Diese Form von FVIII ist an eine N-terminale Domäne von vWF über Bindungsstellen in a3 und C2 gebunden (Saenko und Scandella, 1997). In diesem Komplex wird FVIII stabilisiert und vor proteolytischem Abbau geschützt. Die Halbwertszeit von FVIII im Plasma erhöht sich so altersabhängig von zwei bis drei auf 12 bis 14 Stunden (Weiss *et al.*, 1977). In seiner aktivierten Form dissoziiert vWF durch Abspaltung von a3 von FVIII. Aus der weiteren proteolytischen Prozessierung durch Thrombin geht eine FVIIIa -Heterotrimer hervor. Dieses besteht aus der A1 Domäne, welche über ein divalentes Metall-Ion ( $\text{Ca}^{2+}$  oder  $\text{Mn}^{2+}$ ) mit der leichten Kette (A3-C1-C2) assoziiert ist, während die A2-Domäne durch elektrostatische Wechselwirkungen gebunden wird (Pipe und Kaufmann, 1997). Ohne gebundenen vWF kann FVIIIa über Aminosäuren-Reste (AS-Reste) in 2181-2243 und 2248-2312 der C2-Domäne, insbesondere über die hydrophoben Reste von Met2199/Phe2200 sowie Leu2251/2252 an negativ geladenen Phospholipide auf der Oberfläche von aktivierten Thrombozyten binden (Barrow *et al.*, 2001). Außerdem sind die AS 1899-1903 in der A3-Domäne an der Bindung an die Phospholipidmembran beteiligt (Ngo *et al.*, 2008). Im Tenase-Komplex (**Abb. 1.3**) erfolgt die Bindung von FVIIIa an FIXa hauptsächlich über die AS-Reste 1811-1818 der A3-Domäne (Lenting *et al.*, 1996). Die Interaktion der AS-Reste 484-509 sowie 558-565 und 698-710 der A2-Domäne induzieren im aktiven Zentrum von FIXa entscheidende, konformationelle Wechsel für die Umsetzung von FX zu FXa (Fay und Scandella, 1999). Die Bindungsstelle für FX befindet sich im sauren a1-Spacer unter Beteiligung der AS-Reste 349-372 (Lapan und Fay, 1997 und 1998).

Die Strukturen der an der Gerinnungskaskade beteiligten Proteine sind weitestgehend unbekannt. Bislang konnten die Strukturen der einzelnen C2-Domäne von humanem FV und FVIII sowie die Struktur von porcinem FIX mittels Röntgen-Kristallographie aufgeklärt werden (Macedo-Ribeiro *et al.*, 1999; Pratt *et al.*, 1999). Auch die Kristallstruktur von humanem FVIII (**Abb 3.1**) wurde mittlerweile aufgeklärt (Shen *et al.*, 2008; Ngo *et al.*, 2008). Diese entspricht in großen Teilen zuvor generierten Homologie-Modellen der Strukturen der A- sowie C1-Domäne, welche basierend auf den röntgenkristallographischen Daten von humanem Ceruloplasmin (Pemberton *et al.*, 1997) bzw. der C2-Domäne erstellt wurden

(Stoilova-McPhie *et al.*, 2002). Ein Modell des Tenase-Komplexes (**Abb 3.1**) auf der Phospholipidmembran aktivierter Thrombozyten wurde basierend auf Docking-Analysen zwischen den Kristallstrukturen von FVIII und porcinem FIX erstellt (Ngo *et al.*, 2008).



**Abb. 1.3 Strukturmodell des Tenase-Komplexes (nach Ngo *et al.*, 2008).** FVIIIa interagiert über die AS-Reste 489-509, 558-565 und 698-710 in A2 mit FIXa (PDB 1pfx). Die Bindung an FIXa erfolgt über die AS-Reste 1811-1818 in der A3-Domäne von FVIIIa. Über die AS-Reste 2181-2243 und 2248-2312 in der C2-Domäne sowie die AS 1899-1903 und 1900 in der A3-Domäne bindet FVIIIa an die Phospholipid-Membran aktivierter Thrombozyten. FX wird im sauren Spacer a1 über die Aminosäuren 349-372 gebunden und im aktiven Zentrum von FIXa in FXa umgesetzt.

### 1.3 Hämophilie A

Bei Hämophilie A (HA) handelt es sich um eine X-chromosomal-rezessiv vererbte Gerinnungstörung. Diese wird durch einen Defekt oder Fehlen von FVIII bedingt. Fehlfunktion oder Fehlen von FVIII resultiert aus einer unvollständigen oder fehlerhaften Proteinexpression bedingt durch Punktmutationen, Deletionen, Insertionen oder Inversionen im annähernd 180kb umfassenden FVIII Gen. Punktmutationen stellen den häufigsten Gendefekt dar. Sie treten bei 90-95% der HA-Patienten auf. Bei den auftretenden Punktmutationen handelt es sich um *Missense*, *Nonsense* und mRNA *splice-site* Mutationen. Die zweithäufigste Ursache für HA sind Deletionen, welche bei 5-10% der Patienten auftreten (Bowen *et al.*, 2002). Duplikationen und Insertionen treten hingegen extrem selten auf. Eine Inversion des Introns 22 stellt die Ursache für 40-50% der Fälle einer schweren HA dar

(Lakich *et al.*, 1993). Deren Ursprung geht auf eine fehlerhafte DNA-Replikation während der Spermatogenese zurück (Antonarakis *et al.*, 1995). Aufgrund der Lokalisation des FVIII-Gens auf dem X-Chromosom sowie des rezessiven Erbgangs sind fast ausschließlich Männer von der Krankheit betroffen. Die Inzidenz von HA liegt ungefähr bei einem von 5000 männlichen Individuen. Heterozygote Trägerinnen (Konduktorinnen) können zwar eine verringerte FVIII-Aktivität aufweisen (30-70%), sind jedoch klinisch meist unauffällig (Kasper *et al.*, 2000). Klinisch manifestiert sich HA durch eine vermehrte Blutungsneigung sowie unkontrollierbare Blutungen nach Verletzungen oder operativen Eingriffen. Charakteristisch für HA sind die im weiteren Krankheitsverlauf wiederholt auftretenden Blutungen in Gelenken



**Abb. 1.4 Hämophilie A (HA).** Beispiel einer klinischen Manifestation von HA durch Einblutungen im Knie.

wie Sprunggelenk, Knie (**Abb. 1.4**), Hüfte und Ellenbogen sowie in die Muskulatur. Diese führen zu degenerativen Entzündungen, Gelenkdeformation und Verkrüppelung. Sowohl spontane als auch posttraumatische oder iatrogene Blutungen sind für die Patienten ohne Behandlung oft lebensgefährlich. Eine Einteilung der Patienten erfolgt anhand der FVIII-Aktivität im Plasma. Bei der leichten Form von HA liegt die Aktivität von FVIII zwischen 5 und 25% und die Symptomatik besteht meist in Blutungen nach einem Trauma, invasiver Diagnostik oder operativen Eingriffen. Liegt die Aktivität von FVIII im Bereich von 1-5%, so kann es bei dieser mittelschweren Form von HA zu spontanen Blutungen, häufiger jedoch zu Blutungen in Folge von Traumata kommen. Die schwere Form der HA äußert sich bereits in früher Kindheit (bei Beginn von Bewegung) durch häufige spontane Blutungen in Gelenken, Muskeln und Organen sowie massiven Blutungen nach Traumata. Die Aktivität von FVIII liegt unter 1% (Hoyer *et al.*, 1994).

Die Therapie von HA-Patienten besteht in der Infusion von FVIII-Konzentraten, die entweder FVIII aus Spenderplasma (*plasma derived, pdFVIII*) oder rekombinant hergestellten FVIII (rekombinant, rFVIII) enthalten. Die Infusionen erfolgen entweder nur bei Bedarf oder prophylaktisch. Letzteres ist in den Industrieländern zur Prävention von Gelenkschädigungen die Therapie der Wahl (Berntorp *et al.*, 1996). Bei Patienten mit leichter und mittelschwerer HA kann Desmopressin (1-Desamino-8-D-Arginin-Vasopressin; DDAVP) verabreicht

werden, das durch Freisetzung von FVIII und vWF zu einer temporären, moderaten Erhöhung des FVIII-Plasmaspiegels führt.

#### **1.4 Faktor VIII neutralisierende Antikörper: Inhibitoren**

Seit den späten 70er Jahren stellte die Übertragung viraler Infektionen wie Hepatitis B und C sowie HIV durch Substitutionstherapie von HA-Patienten mit FVIII aus Plasma-Pools ein großes Problem dar. Gegenwärtig schließen sensitive Test-Verfahren der Spenderplasmen, die eingeführten Methoden zur Virus-Inaktivierung, sowie die Möglichkeit einer rekombinanten Herstellung von FVIII virale Transmission nahezu völlig aus. Die größte, bestehende Komplikation der FVIII-Ersatz-Therapie besteht in dem Auftreten von FVIII neutralisierenden Allo-Antikörpern (Hemmkörper, Inhibitoren).

Inhibitoren treten bei erstbehandelten Patienten (*previously untreated patients, PUPs*) mit einer mittelschweren HA in 5.3-12.5%, bei Patienten mit schwerer HA in 22-52% der Fälle auf (Kreuz *et al.*, 1996). Seltener betroffen sind Patienten mit leichter HA (13%). Im Therapieverlauf sind die Antikörper bei Kindern meist innerhalb der ersten 10-20 Expositionstage nachweisbar (Kreuz *et al.*, 1995 und 2002). Das Risiko eines Auftretens von Inhibitoren reduziert sich nach ca. 200 Behandlungstagen drastisch. Eine Sonderform von Inhibitoren führt bei der so genannten erworbenen HA zu einer Inaktivierung von FVIII in nicht von HA betroffenen Individuen. Hier kommt es bei vorwiegend älteren Menschen, Patienten mit Autoimmunerkrankungen und Frauen unmittelbar nach der Geburt aus bisher nicht geklärten Gründen zur Bildung von Autoantikörpern gegen endogenen FVIII (Green und Lechner, 1981; Delgado *et al.*, 2003).

Ein Standardverfahren zur Detektion von Inhibitoren ist der Bethesda-Test, in welchem die Inaktivierung von FVIII in Normalplasma durch Zugabe von Patientenplasma evaluiert wird. Dabei wird die aus der FVIII-Restaktivität resultierende Gerinnung photometrisch detektiert. Anhand einer entsprechenden Eichgerade kann aus den FVIII-Restaktivitäten der Inhibitortiter in Bethesda-Einheiten errechnet werden. Eine Bethesda-Einheit (BE) ist als die 50%ige Inaktivierung von FVIII in Normalplasma definiert (Kasper *et al.*, 1975). Zur Abgrenzung von negativen und positiven Testwerten liegt der Grenzwert bei 0.5 BE/ml. Patienten mit einer kontinuierlichen Präsenz von Inhibitoren (persistente Inhibitoren) werden nach dem Inhibitortiter in *low responders* (0.6-5 BE/ml) und *high responders* (>5 BE/ml) eingeteilt (White *et al.*, 2001). 53% der bei HA identifizierten Inhibitoren sind *high responding*-Inhibitoren (Lusher *et al.*, 1999). Da high responder-Patienten aufgrund der

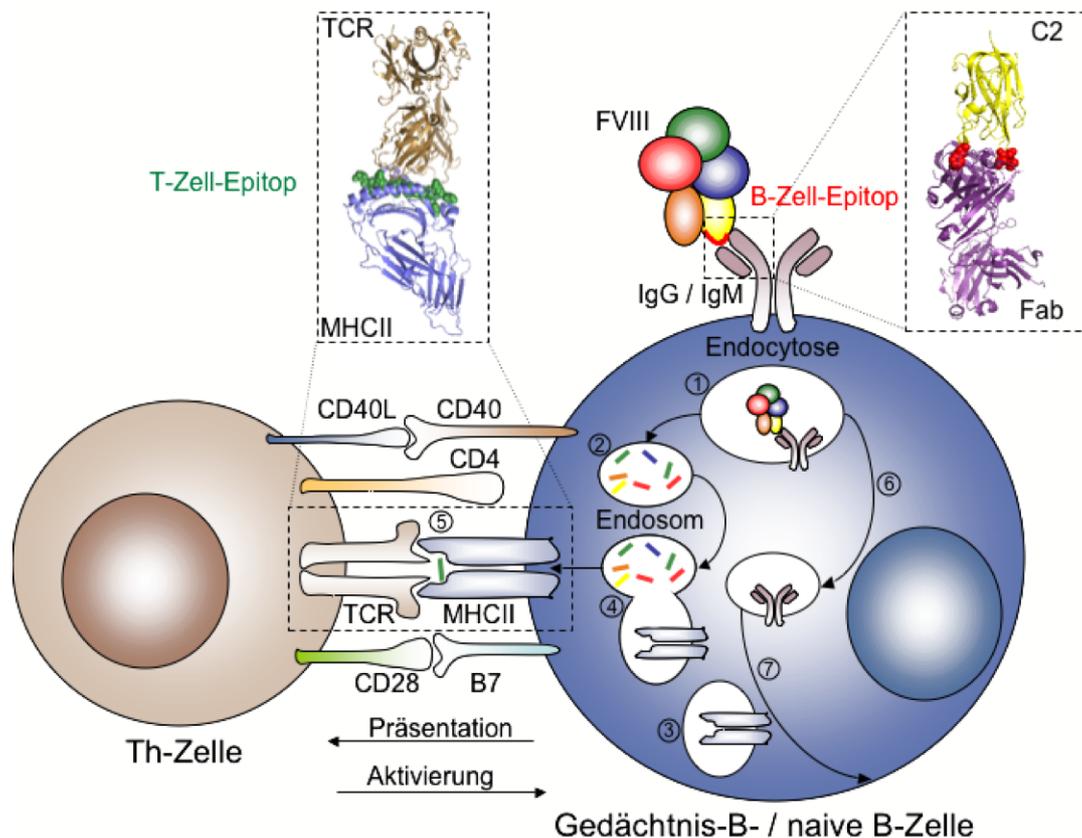
Inhibitoren nicht ausreichend auf FVIII-Substitution reagieren, müssen die Inhibitoren schnell und effektiv eliminiert werden, um das Risiko lebensbedrohlicher Blutungen zu reduzieren.

### 1.4.1 Immunologie

Die Ausbildung von FVIII-Inhibitoren wird allen Anzeichens nach sowohl von genetischen als auch umweltbedingten Faktoren beeinflusst. Die Art der jeweiligen im FVIII-Gen vorliegenden Mutationen ist für die Antikörperbildung relevant (Oldenburg *et al.*, 2004). So weisen Patienten mit Nonsense-Mutationen, großen Deletionen sowie Inversionen die höchste Inhibitor-Inzidenz auf (Schwaab *et al.*, 1995; Tuddenham und McVey *et al.*, 1998). Nonsense-Mutationen in der leichten Kette von FVIII führen im Gegensatz zu Nonsense-Mutationen innerhalb der schweren Kette zu einem höheren Risiko für eine Inhibitorbildung. Weiterhin weisen Patienten mit Deletionen, welche mehr als eine FVIII-Domäne betreffen, gegenüber Patienten mit nur eine Domäne betreffenden Deletionen, eine dreifach erhöhte Inhibitorinzidenz (ca. 88%) auf (Oldenburg *et al.*, 2004). Alle genannten Mutationen führen zu einem vollständigen Fehlen von endogenem FVIII. Es erfolgt damit keine Negativselektion autoreaktiver B- und T-Zellklone auf FVIII, womit die Etablierung einer zentralen Immuntoleranz gegen das Protein ausbleibt (Palmer, 2003; Siggs *et al.*, 2006). Missense-Mutationen sowie kleine Deletionen sind mit einer wesentlich niedrigeren Inhibitorinzidenz assoziiert, da in diesen Fällen lediglich ein nicht funktionelles FVIII-Protein produziert wird, was aber zur Etablierung einer zentralen Toleranz ausreichend ist (McGinniss *et al.*, 1993). Bei der Antikörperproduktion gegen FVIII handelt es sich um eine Thymus-abhängige Immunantwort, welche in den sekundären lymphatischen Organen, primär in Milz und Lymphknoten erfolgt.

Im Blut zirkulierender FVIII wird von Antigen präsentierenden Zellen (*antigen presenting cells, APCs*), wie dendritischen Zellen, phagozytiert und proteolytisch degradiert (Muraille *et al.*, 2002). Im Zuge der primären Immunantwort kann FVIII außerdem durch naive B-Zellen über deren B-Zellrezeptor (*B cell receptor, BCR*) bestehend aus IgM und IgD gebunden werden. Das durch den BCR erkannte Epitop wird durch die später sekretierten Antikörper gebunden. Als B-Zellepitop (**Abb. 1.5**) bezeichnet man einen 20 bis 25 Aminosäuren und  $680\text{-}880\text{\AA}^2$  umfassenden Bereich auf der Oberfläche des Antigens, mit welchem eine nahezu gleiche Anzahl von Aminosäuren in den variablen Bereichen der schweren ( $V_H$ ) und leichten Kette ( $V_L$ ) von Immunglobulinen (Igs) einen spezifischen, engen Kontakt eingeht (Davies *et al.*, 1990; Regenmortel, 1996). Konformationelle (diskontinuierliche, strukturelle) Epitope

unterscheiden sich von linearen (kontinuierlichen, sequenziellen) Epitopen dadurch, dass für die Antikörper-Bindung essentielle Aminosäuren in der Primär-Sequenz voneinander entfernt liegen und erst durch die native Konformation des Antigens in engen Kontakt gelangen.



**Abb. 1.5 B-Zell / T-Zell-Interaktion.** Naive sowie Gedächtnis-B-Zellen binden Antigen (FVIII) über den BCR bestehend aus membranständigem IgM bzw IgG. Insbesondere Gedächtnis-B-Zellen erkennen dabei hochspezifisch B-Zellepitope auf der Oberfläche des nativen Proteins. Es folgt die rezeptorvermittelte Endozytose des Ig-Antigen-Komplexes über Clathrin-ummantelte Vesikel (1). Im sauren Milieu des Endosoms erfolgt die proteolytische Degradierung des Antigens (2). Antigenische Peptide werden auf MHCII-Moleküle geladen (3, 4) und auf der B-Zelloberfläche präsentiert. Der BCR wird regeneriert (6) und wieder an die B-Zelloberfläche transportiert (7). T-Helfer-Zellen erkennen über den spezifischen T-Zellrezeptor die über MHCII-präsentierten antigenischen Peptide als T-Zellepitope (5) und aktivieren daraufhin die B-Zelle. Als Beispiel eines B-Zellepitopes sind hier die AS-Reste 2199/2200 und 2251/2252 der C2-Domäne gezeigt. Diese befindet sich im Komplex mit dem Fab-Fragment des monoklonalen Antikörpers BO2C11 (Spiegel et al., 2001).

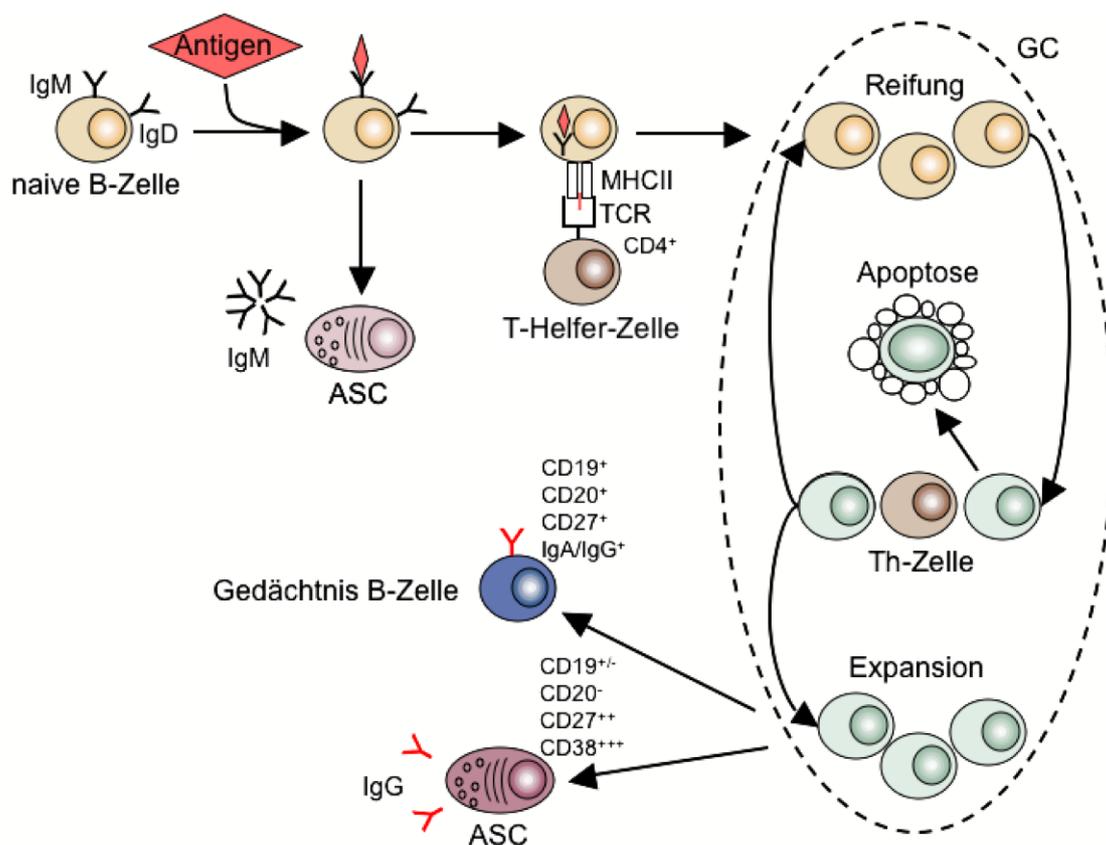
Bei nahezu allen bisher identifizierten Epitopen handelt es sich um konformationelle Epitope. Strukturelle Epitope setzen sich aus zwei bis fünf separaten Bereichen der Protein-Primärsequenz zusammen, welche dabei auch lineare Elemente beinhalten können. Die Energie für eine Antikörperbindung an ein strukturelles Epitop wird nur von drei bis fünf sehr gut zugänglichen Aminosäuren im Radius von ca. 9Å aufgebracht. Im Gegensatz zu dem

strukturellen Epitop ist das so genannte funktionelle Epitop somit wesentlich kleiner (Jin *et al.*, 1992; Benjamin und Perdue, 1996).

Nach initialem Antigenkontakt differenzieren einige B-Zellen (**Abb. 1.6**) direkt zu Antikörper (IgM und IgD) sekretierenden Zellen (*antibody secreting cells, ASCs*). Die Mehrzahl der Antigen-bindenden B-Zellen differenziert jedoch zu APCs, indem Antigen im Komplex mit dem BCR internalisiert und proteolytisch degradiert wird (Lanzavecchia, 1987). In den sekundären lymphatischen Organen werden die so generierten Peptidfragmente über MHCII-Komplexe auf der Oberfläche der APCs präsentiert und können so im Zusammenspiel mit costimulierenden Molekülen (CD40/CD40L, CD28/B7) naive T-Zellen aktivieren, deren T-Zellrezeptor (*T cell receptor, TCR*) diese Peptide (T-Zellepitope) erkennt und über CD40 Ligand (CD40L) und CD28 an die costimulierenden Moleküle der APCs bindet (**Abb. 1.5**). Diese T-Zellen differenzieren in der Folge zu T-Helfer-Zellen (Bjorck *et al.*, 1997; Muraille *et al.*, 2002). Die Population der T-Helfer Zellen (CD4<sup>+</sup>) lässt sich in die Unterpopulationen Th1 und Th2 unterteilen. Th1-Zellen sekretieren proinflammatorische Zytokine, Interferon- $\gamma$ , Tumor-Nekrose-Faktor- $\alpha$  sowie Interleukin 2 (IL-2) und assistieren bei der Sekretion von Komplement-bindenden IgG-Subklassen (IgG<sub>1</sub> und IgG<sub>3</sub>). Th2-Zellen sekretieren antiinflammatorische Zytokine wie IL-4 und IL-10. Außerdem assistieren sie bei der Synthese von Antikörpern (IgE und IgG<sub>4</sub>), welche nicht zu einer Komplement-Bindung in der Lage sind (Mosmann *et al.*, 1986; Abbas *et al.*, 1996). Die polyklonale IgG-Population der FVIII neutralisierenden Antikörper ist primär den Subklassen IgG<sub>4</sub> sowie IgG<sub>1</sub> zuzuordnen (Fulcher *et al.*, 1987). Dabei besteht eine Korrelation zwischen hohen Inhibitortitern und vornehmlich Th2-induzierten IgG-Subklassen, während Th1-induzierte Subklassen vornehmlich bei niedrigeren Inhibitortitern zu finden sind. IgG<sub>4</sub> tritt offenbar in Verbindung mit einer massiven, humoralen Immunantwort gegen FVIII auf, während IgG<sub>1</sub> für die Aufrechterhaltung einer Langzeitimmunantwort gegen das Protein verantwortlich ist (Reding *et al.*, 2002).

Die Interaktion zwischen B-Zellen und T-Helfer-Zellen erfolgt in den primären Follikeln der sekundären lymphatischen Organe durch die Ausbildung von Keimzentren (*germinal centers, GCs*). Hier erfolgen in den Immunglobulinloci der B-Zell-DNA eine Reihe somatischer Hypermutationen, was zu einer Affinitätsreifung der BCRs führt (**Abb. 1.6**). Diese werden ständig mit FVIII in Kontakt gebracht und somit B-Zellklone selektiert, deren BCR eine möglichst hohe Affinität für das Antigen hat. In Klonen, deren BCR nur eine geringe Affinität aufweist, wird Apoptose induziert. Antigen-spezifische T-Helferzellen interagieren mit den selektierten, hochaffinen B-Zellklonen und induzieren in diesen durch Hochregulation der

Expression von CD40L und IL-4 einem Klassenwechsel von IgM und IgD zu IgG und IgA sowie deren Expansion. Die B-Zellklone differenzieren entweder zu Gedächtnis B-Zellen oder ASCs (Lanzavecchia, 1987). ASCs können weiter zu langlebigen Plasmazellen ausdifferenzieren, welche Überlebensnischen im Knochenmark besetzen und kontinuierlich Antikörper sekretieren (Manz *et al.*, 2005). Während einer sekundären Immunantwort verlassen diese langlebigen Plasmazellen in großer Zahl das Knochenmark (Odendahl *et al.*, 2005). Die u.a. in der Peripherie zirkulierenden Gedächtnis-B-Zellen werden durch Antigen-Kontakt aktiviert und differenzieren in der Folge ebenfalls zu ASCs bzw. führen in den GCs zur Bildung neuer Gedächtnis B-Zellen.

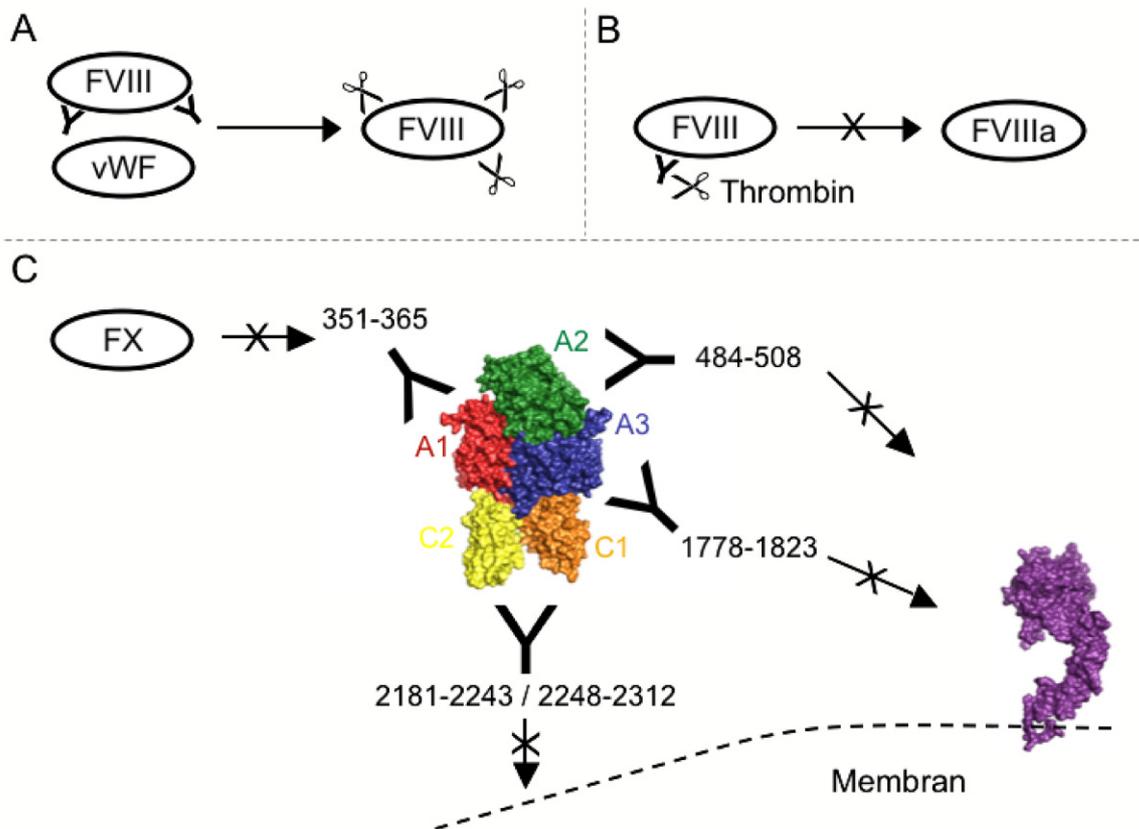


**Abb 1.6 B-Zelldifferenzierung.** Nach Antigenkontakt erfolgt die Differenzierung einiger naiver B-Zellen in ASCs, während der Hauptanteil durch Interaktion mit T-Helfer-Zellen aktiviert wird. In den Keimzentren (GC) der sekundären lymphatischen Organe findet die Reifung der aktivierten B-Zellen mittels T-Zellhilfe durch Anhäufung somatischer Hypermutationen statt, wodurch die Affinität des BCR für das Antigen erhöht wird. Unzureichend bindende Klone werden deletiert (Apoptose). B-Zellklone mit hochaffinen BCRs expandieren und differenzieren zu IgG<sup>+</sup> Gedächtnis-B-Zellen und ASCs.

### 1.4.2 Molekulare Charakteristika

Gegenwärtig sind unterschiedliche Mechanismen der FVIII Neutralisation durch Inhibitoren bekannt. So konnten bislang Antikörper identifiziert werden, welche FVIII hydrolysieren (Lacroix-Desmanzes *et al.*, 1999 und 2002). Die Schnittstellen für solche Antikörper liegen gleichmäßig über die Domänen A1 bis C1 verteilt und sind in 85% der Fälle nach einem Arginin oder Lysin lokalisiert. Andere Inhibitoren richten sich gegen nicht-funktionelle Determinanten des Proteins, beeinflussen aber auf diese Weise dennoch dessen Halbwertszeit (Gilles *et al.*, 1993). Am Besten charakterisiert sind Inhibitoren, welche in funktionellen Regionen von FVIII binden (Saenko *et al.*, 2002) und damit die Bindung und Interaktion von FVIII an FIXa, Phospholipide oder vWF inhibieren (**Abb. 1.7**). Eine Vielzahl an Epitopen konnte innerhalb der A2- und C2-Domäne lokalisiert werden (Scandella *et al.*, 2001). Außerdem wurden antigene Determinanten inhibitorischer Antikörper in den A3- und C1-Domänen sowie dem a1 Spacer identifiziert. In der A2-Domäne erwiesen sich die Aminosäuren 484-508 als essentiell für die Bindung einzelner Inhibitoren (Healey *et al.*, 1995) und überlappen damit mit der für die FIXa-Interaktion verantwortlichen Region (489-509). Dieser Bereich, mit geringer Affinität für FIXa, definiert die Cofaktor-Aktivität von FVIIIa. Durch diese Interaktion wird eine für die katalytische Aktivität von FIXa essentielle Konformationsänderung induziert. Eine Inhibitorbindung in diesem Bereich beeinträchtigt folglich die cofaktorische Aktivität von FVIIIa. Darüber hinaus wird FVIIIa im Tenase-Komplex erheblich destabilisiert, was sich in der spontanen Dissoziation der A2-Domäne äußert (Fay und Scandella, 1999). In der C2-Domäne finden sich antigene Determinanten im Bereich der Aminosäuren 2181-2243 (Healey *et al.*, 1998) sowie 2248-2312 (Scandella *et al.*, 1995). In dieser Region bindende, inhibitorische Antikörper verhindern die Bindung von FVIIIa an negativ geladene Phospholipide. Diese Inhibitoren blockieren darüber hinaus die Interaktion zwischen FVIII und vWF, da sich die Bindungsstellen für Phospholipide und vWF in der C2-Domäne überlappen (Saenko und Scandella, 1995). Somit bleibt die Stabilisierung des FVIII-Heterodimers durch vWF aus, was zu einer deutlichen Herabsetzung der Halbwertszeit führt. In der A3-Domäne scheinen die Aminosäuren 1675-1684 Ziel von Inhibitoren zu sein. Diese blockieren damit eine weitere Bindungsstelle für vWF (Shima *et al.*, 1992). Andere IgGs aus Patientenplasmen binden an Aminosäuren im Bereich von 1778-1823 und besetzen damit die hochaffine FIXa-Bindungsstelle, welche die AS-Reste 1811-1818 umfasst (Zhong *et al.*, 1998). Ein weiteres bisher bekanntes Epitop befindet sich im sauren a1-Spacer und umfasst die Aminosäuren 351-365. Eine Antikörperbindung in diesem

Bereich könnte die Aktivierung von FVIII durch Thrombin verhindern, oder die Bindung des Substrates des Tenase-Komplexes (FX) blockieren (Foster *et al.*, 1988).



**Abb. 1.7 Inhibitionsmechanismen von FVIII-Inhibitoren.** (A) Durch Inhibitorbindung an die AS-Reste 1675-1684 der A3-Domäne sowie die AS-Reste 2181-2243 und 2248-2312 in der C2-Domäne wird die Bindung von FVIII an vWF blockiert. Dies hat eine Reduktion der Halbwertszeit von FVIII im Plasma bedingt durch Proteolyse zur Folge. (B) Eine Blockierung einer für die Aktivierung von FVIII essentiellen Thrombinschnittstelle könnte durch Inhibitorbindung an die AS-Reste 351-365 des sauren  $\alpha$ 1-Spacers erfolgen. (C) Durch Inhibitorbindung an die angegebenen AS-Reste blockieren Inhibitoren die Bindung von FVIIIa an die Phospholipid-Membran aktivierter Thrombozyten sowie dessen Interaktion mit FXa, und FX im Tenase-Komplex.

Die Lokalisation der Epitope von FVIII neutralisierenden Antikörpern war von jeher von großem Interesse, wurde zumeist jedoch lediglich in kleinem Umfang durchgeführt (wenige Patienten, monoklonale Antikörper). Gegenwärtig erfolgt die Epitopkartierung von FVIII-Inhibitoren im Zuge einer internationalen, klinischen Studien, um eine genauere Vorstellung hinsichtlich der Diversität von Inhibitorepitopen zu erlangen und eine Basis für neue Therapieoptionen zu schaffen (*Observational ITI Study, ObsITI*). Für einen der ersten Ansätze zur Lokalisation von Inhibitorepitopen wurden in *E. coli* und Sf9-Insektenzellen exprimierte, rekombinante FVIII-Fragmente genutzt. In *Immunoblot*-Tests wurde die Reaktivität von

Patientenplasma mit diesen Fragmenten analysiert (Scandella *et al.*, 1988, 1989, 1995). Eine andere, auf dem Immunoblot-Verfahren basierende Strategie zur Epitopkartierung macht sich durch Thrombinverdau generierte FVIII-Fragmente zu Nutze (Fulcher *et al.*, 1985, 1987). Ein weiterer Ansatz besteht in dem Einsatz von voll funktionellen, chimären Proteinen aus humanem sowie porcinen FVIII. Porciner FVIII weist eine nur geringe Kreuzreaktivität mit humanen Inhibitoren auf, so dass ein Austausch von kleineren Fragmenten in humanem FVIII gegen porcine FVIII-Fragmente eine Epitopidentifikation ermöglicht (Healey *et al.*, 1995, 1998; Barrow *et al.*, 2000, 2001).

Gegenwärtig werden vor allem synthetische Peptide, welche sich entweder von der primären Aminosäuresequenz von FVIII ableiten oder randomisierten Peptidbibliotheken entstammen, zur Epitopkartierung eingesetzt. Die Identifikation von Inhibitorepitopen mittels linearer Peptide, die von der Primärsequenz von FVIII abgeleitet wurden, erfolgt ebenfalls im Immunoblot-Verfahren. Die Peptide wurden auf einer Membran (*PepSpot*-Membran) immobilisiert, mit Patientenplasma inkubiert und gebundene Antikörper mittels Enzym-markiertem anti-Human Antikörpern detektiert (Albert *et al.*, 2003; Kopecky *et al.*, 2006). Randomisierte Peptidbibliotheken, welche auf der Oberfläche von filamentösen Phagen präsentiert werden (*Phage Display*-Verfahren), wurden zur Selektion von inhibitorspezifischen Peptiden eingesetzt (Villard *et al.*, 2003; Mühle *et al.*, 2004). Übereinstimmende Aminosäuren aus einem Vergleiche der selektierten Peptide mit der FVIII-Primärsequenz wurden zur Identifikation von eventuellen Inhibitorepitopen genutzt (Mühle *et al.*, 2004). Allerdings konnten mit den hier beschriebenen Verfahren bislang keine Bestandteile konformationeller Epitope von Inhibitoren aus polyklonalen Patientenplasmen auf der Oberfläche von FVIII identifiziert werden.

### **1.5 Immuntoleranz Induktion (ITI)**

Warum das Immunsystem im Fall fehlender Toleranz in „nur“ ca. 30% der Fälle mit Antikörperproduktion auf substituierten FVIII reagiert, ist noch weitgehend ungeklärt. Bereits mehrere Jahrzehnte zurückliegende Studien in Mäusen könnten zeigen, dass die intraperitoneale oder intravenöse Injektion von hochdosierten Lösungen körperfremder Proteine eher Toleranz induziert als eine Immunantwort hervorruft (Dixon und Maurer, 1955). Erst die Verabreichung dieser Lösungen zusammen mit Adjuvantien führte zur Ausbildung einer Immunantwort. Wie bereits beschrieben, sind B-Zellen zur Produktion von hochaffinen Antikörpern auf T-Zellhilfe angewiesen. Deren primäre Aktivierung wird von

dendritischen Zellen vollzogen, welche antigenische Peptide im Komplex mit MHCII präsentieren. Dendritische Zellen stellen somit einen Schlüsselregulator der adaptiven Immunantwort dar. Für die Reifung dendritischer Zellen sind neben der Aufnahme von Antigen zusätzliche Signale (*Danger*-Signale: *Toll-like* Rezeptor Agonisten) oder andere, proinflammatorische Stimuli, wie inflammatorische Zytokine oder CD40/CD40L-Interaktionen, verantwortlich (Shi *et al.*, 2003; Pulendran, 2004; Rock *et al.*, 2005). Weder FVIII noch FVIIIa präsentieren jedoch solche proinflammatorischen Stimuli für dendritische Zellen (Pfistershammer *et al.*, 2006). Daher sollte auch die Substitution von hochdosiertem FVIII im Rahmen einer ITI eher zur Induktion von Toleranz führen. Die Bildung von Inhibitoren in ca. 30% der Patienten mit schwerer HA ist daher eventuell auf noch nicht identifizierte *Danger*-Signale zurückzuführen. In einem hämophilen Mausmodell konnte bereits gezeigt werden, dass die Präsenz von *Toll-like*-Rezeptoragonisten die Toleranzinduktion sowie bereits induzierte Toleranz beeinträchtigt (Reipert *et al.*, 2007).

In etwa 60-80% der Patienten gelingt eine therapeutische Induktion der Immuntoleranz (ITI) von FVIII. In diesem Rahmen kommt es eventuell zu einer Erradierung der Inhibitoren (DiMichele, 1998). Als erstes ITI-Protokoll wurde das „Bonn-Protokoll“ 1977 von Brackmann und Gormsen etabliert. Gemäß diesem Protokoll erfolgte eine tägliche, zweimalige Infusion großer FVIII-Mengen bis zur Normalisierung von dessen Halbwertszeit. Dieses Protokoll wurde durch vorangehende Immunadsorption des Inhibitors und kombinierte Gabe von FVIII, Cyclophosphamid und Immunglobulinen modifiziert („Malmö-Protokoll“; Nilsson *et al.*, 1988). Wichtige Therapieoptionen im Falle akuter Blutungen bei high responder-Patienten bestehen in der Verabreichung von „Bypass“-Produkten wie Prothrombin-Komplex-Konzentraten (PPCs) sowie aktivierten Prothrombin-Komplex-Konzentraten (aPPCs) aus Humanplasma (Roberts, 1999; FEIBA<sup>®</sup>), porcinem FVIII (Gatti und Mannucci, 1984) oder rekombinantem FVIIa (Roberts, 1999; NovoSeven<sup>®</sup>).

Um die Entstehung von Inhibitoren in HA-Patienten kontrollieren zu können, kommen neben dem, gemäß des Malmö-Protokolls verabreichten Cyclophosphamid, weitere Immunsuppressiva wie Prednison, Azathioprin oder Cyclosporin zum Einsatz. In Fällen, welche auf die genannten Präparate nur ungenügend ansprechen, stellt eine Therapie mit einem humanisierten, monoklonalen anti-CD20-Antikörper (Rituximab, Mabthera<sup>®</sup>) eine weitere, wenn auch experimentelle Therapie-Option dar (Linde *et al.*, 2001; Mathias *et al.*, 2004). Wiederholte Infusionen dieses Antikörpers führen zu einer Depletion von >95% aller peripheren B-Zellen. Gute Erfolge weist diese Therapie vor allem im Fall der erworbenen HA auf (Wiestner *et al.*, 2002).

Art und Reinheit der für eine ITI zu verwendenden FVIII-Präparationen, insbesondere der Gehalt von vWF, welcher im Gegensatz zu rFVIII-Präparationen in plasmatischen FVIII-Präparationen enthalten ist, wird kontrovers diskutiert (Berntorp, 2001; Ettingshausen und Kreuz, 2005). Die Bindung an vWF verlängert die Halbwertszeit von FVIII im Plasma. Die Halbwertszeit für die Komplexbildung zwischen FVIII und vWF im Plasma liegt bei zwei Sekunden (Vlot *et al.*, 1996). Diese schnelle Komplexbildung findet eventuell ebenso zwischen substituierten FVIII und endogenem vWF statt, was die geringfügigen Unterschiede zwischen pdFVIII und rFVIII hinsichtlich deren Halbwertszeit im Plasma erklärt. Allerdings scheinen gerade venöse Scherkräfte die Geschwindigkeit dieser Komplexbildung herabzusetzen, was zu einer längeren Exposition der C2-Domäne führt (Prof. Dr. Edward Tuddenham, persönliche Kommunikation).

Es wird spekuliert, dass die Präsenz von vWF bei ITI zu einer Maskierung der immundominanten Inhibitorepitope in der C2-Domäne führt und damit die Immunogenität von FVIII reduziert. So konnte bereits gezeigt werden, dass vWF-haltige FVIII-Konzentrate im Fall der Präsenz eines C2-spezifischen Inhibitors eine deutlich verbesserte Halbwertszeit aufweisen. Darüber hinaus ließ sich eine verringerte inhibitorische Aktivität der C2-spezifischen Inhibitoren bei Verwendung von vWF-haltigen FVIII-Konzentraten im Gegensatz zu vWF-freien FVIII-Präparationen nachweisen (Berntorp *et al.*, 2003). Ferner zeichnet sich ab, dass die Verwendung von vWF-haltigen FVIII-Konzentraten zur Induktion einer Immuntoleranz Vorteile gegenüber hochreinen oder rekombinanten FVIII-Präparationen haben könnte (Kreuz *et al.*, 2003; Ettingshausen und Kreuz, 2005). Ein eindeutiger Zusammenhang zwischen diesen Beobachtungen und der Präsenz von vWF ist jedoch noch nicht bewiesen. Allerdings konnte ein immunmodulatorischer Effekt von vWF-haltigen FVIII-Konzentraten *in vitro* bereits nachgewiesen werden (Thorpe *et al.*, 1989; Wadhwa *et al.*, 1992). Diese Effekte sind wohl auf immunmodulatorische Zytokine wie TGF- $\beta$  zurückzuführen (Wadhwa *et al.*, 1994). Eine Klärung der Frage hinsichtlich der Auswirkungen der für eine ITI zu verwendenden FVIII-Konzentrate verlangt weitere Studien, welche sich gezielt mit einer Korrelation zwischen klinischen Beobachtungen und immunologischen Vorgängen auf molekularer und zellulärer Ebene befassen (*Observational ITI Study, ObsITI*; Kreuz *et al.*).

Gegenwärtig konzentrieren sich die Entwicklungen neuer Therapieoptionen auf die Optimierung von FVIII-Präparaten (Parker *et al.*, 2004; Purohit *et al.*, 2005), die Etablierung neuer Gentherapie-Strategien (Lei *et al.*, 2005) sowie immunmodulatorische Ansätze mittels

Einzelketten-Antikörper (*single chain fragment variable, scFv*) und Peptiden (Gilles *et al.*, 2004; Villard *et al.*, 2004; Kessel *et al.*, 2006).

### 1.6 Neue Therapie-Strategien

Über die immunologischen Mechanismen bei einer ITI ist noch wenig bekannt. ITI in HA-Patienten mit Inhibitoren stellt daher ein sehr gutes klinisches Modell, einerseits zum Studium der immunologischen Mechanismen, andererseits zur Entwicklung neuartiger antigenspezifischer Immuntoleranz-Therapien, dar (Pipe *et al.*, 2004; Collins *et al.*, 2006; Reipert *et al.*, 2006).

Zu Beginn einer ITI ist das Immunsystem durch einen hohen Anteil an FVIII-spezifischen Gedächtnis-B und T-Zellen sowie Inhibitor-sekretierenden Plasmazellen gekennzeichnet. Alle drei Zellpopulationen beinhalten langlebige Zellen, welche auch in Abwesenheit des Antigens für eine Aufrechterhaltung des immunologischen Gedächtnisses sorgen (Manz *et al.*, 2005; McHeyzer-Williams und McHeyzer-Williams, 2005). Im Zuge einer ITI gilt es folglich vornehmlich diese Zellpopulationen auszuschalten. Während FVIII-spezifische Gedächtnis-B und T-Zellen antigenspezifische Rezeptoren (BCR bzw. TCR) auf ihrer Oberfläche exprimieren, haben langlebige Plasmazellen diese während ihrer terminalen Differenzierung verloren und entziehen sich damit einer antigenspezifischen Therapie (Manz *et al.*, 2005). Somit stellen FVIII-spezifische Gedächtnis-B und T-Zellen die eigentlichen Ziele einer ITI dar. Gedächtnis-B-Zellen exprimieren einen hochaffinen Antigen-Rezeptor und sind nach Antigenkontakt in der Lage sehr schnell in Antikörper-sekretierende Plasmazellen zu differenzieren. Weiterhin operieren sie als hoch effiziente APCs, welche nach Antigenkontakt wiederum T-Zellen stimulieren können. Gelingt es, diese Zellpopulation zu dezimieren, so kann auch keine Erneuerung langlebiger, Inhibitor-sekretierender Plasmazellen aus dem Pool der Gedächtnis-B-Zellen erfolgen. Im HA-Maus-Modell konnte bereits gezeigt werden, dass hohe Dosen FVIII die Re-Stimulation FVIII-spezifischer Gedächtnis-B-Zellen inhibieren (Hausl *et al.*, 2005). Allerdings ist es fraglich, ob die hierbei verwendeten Dosen jemals in einem HA-Patienten unter ITI mit FVIII erreicht werden. Weiterhin konnte sowohl im Maus-Modell als auch im Patienten die Relevanz von anti-idiotypischen Antikörpern für die Neutralisation von FVIII-Inhibitoren nachgewiesen werden. Ob FVIII-Inhibitor-spezifische, anti-idiotypische Antikörper auch in der Lage sind die entsprechenden Gedächtnis-B-Zellen zu inaktivieren, ist jedoch nicht geklärt (Gilles *et al.*, 1996, 2004).

Antigenspezifische Strategien für eine ITI erscheinen im Gegensatz zu unspezifischen Ansätzen (Antikörper gegen CD20, CD40L) wesentlich attraktiver, um deren weitreichende, unerwünschte Nebenwirkungen auf das Immunsystem der Patienten zu vermeiden, da diese sich oft bereits einer partiell immunsupprimierenden Therapie unterziehen. Antigenspezifische ITI-Strategien können aufgrund der beschriebenen Relevanz von Gedächtnis T- und B-Zellen auf einer zielgerichteten Eliminierung dieser basieren (Pipe *et al.*, 2004).

Die antigenspezifische Ansteuerung (*Targeting*) von T-Zellen, welche über den TCR gewährleistet werden könnte, erscheint für einen Therapie-Ansatz sehr attraktiv. Allerdings ist über deren Rolle, insbesondere die Rolle von regulatorischen T-Zellen im Zuge einer ITI, noch zu wenig bekannt (Pipe *et al.*, 2004). Ferner weisen T-Zellen ein hohes Maß an Kreuzreaktivität mit einer Vielzahl der über MHCII präsentierten T-Zellepitope auf (Mason, 1998). Das Targeting von B-Zellen erscheint aufgrund ihres hochaffinen BCRs weitaus realistischer. Als mögliche Liganden kommen das native Antigen oder Derivate dessen (Proby *et al.*, 2000; Zocher *et al.*, 2003; Reiners *et al.*, 2004; Stöcker *et al.*, 2005), anti-idiotypische Antikörper (Sasaki *et al.*, 1989) sowie kleine Peptide (Renschler *et al.*, 1994; Buhl *et al.*, 2002) in Frage. Diese Liganden können B-Zellen über rekombinante Fusion mit toxischen Domänen (Ellerby *et al.*, 1999; Proby *et al.*, 2000; Reiners *et al.*, 2004; Stöcker *et al.*, 2005) oder Antikörper-abhängige Zelltoxizität (*antibody dependent cytotoxicity, ADCC*) depletieren (Sasaki *et al.*, 1989). Aufgrund der Größe und Immunogenität von FVIII erscheint die Verwendung des nativen Proteins oder dessen einzelner Domänen zur Ansteuerung FVIII-spezifischer B-Zellen wenig sinnvoll. Ähnliche Bedenken gelten für eine Verwendung anti-idiotypischer Antikörper (Renschler *et al.*, 1994; Buhl *et al.*, 2002). Für einen anti-idiotypischen Antikörper, welcher an den C2-Domänen-spezifischen, monoklonalen Antikörper BO2C11 bindet, wurde bereits eine strukturelle Übereinstimmung mit dieser Domäne nachgewiesen (Gilles *et al.*, 2004). Der Umstand, dass von Plasmazellen sekretierte Antikörper dem membranständigen Immunglobulin des BCRs entsprechen, ermöglicht die Selektion von FVIII-Inhibitor spezifischen Peptidliganden mittels des Phage Display-Verfahrens. Einer der Hauptvorteile dieser Liganden, welche aus randomisierten Peptidbibliotheken selektioniert werden, besteht in der hochspezifischen Bindung von Antikörpern ohne zwingende Ähnlichkeit in Sequenz und Konformation zum nativen Antigen. Damit wirken kurze Peptidliganden kaum immunogen (Kelly *et al.*, 2003; Pipe *et al.*, 2004). Im Folgenden soll das auch in dieser Arbeit zur Peptidliganden-Selektion angewandte Phage Display-Verfahren näher erläutert werden.

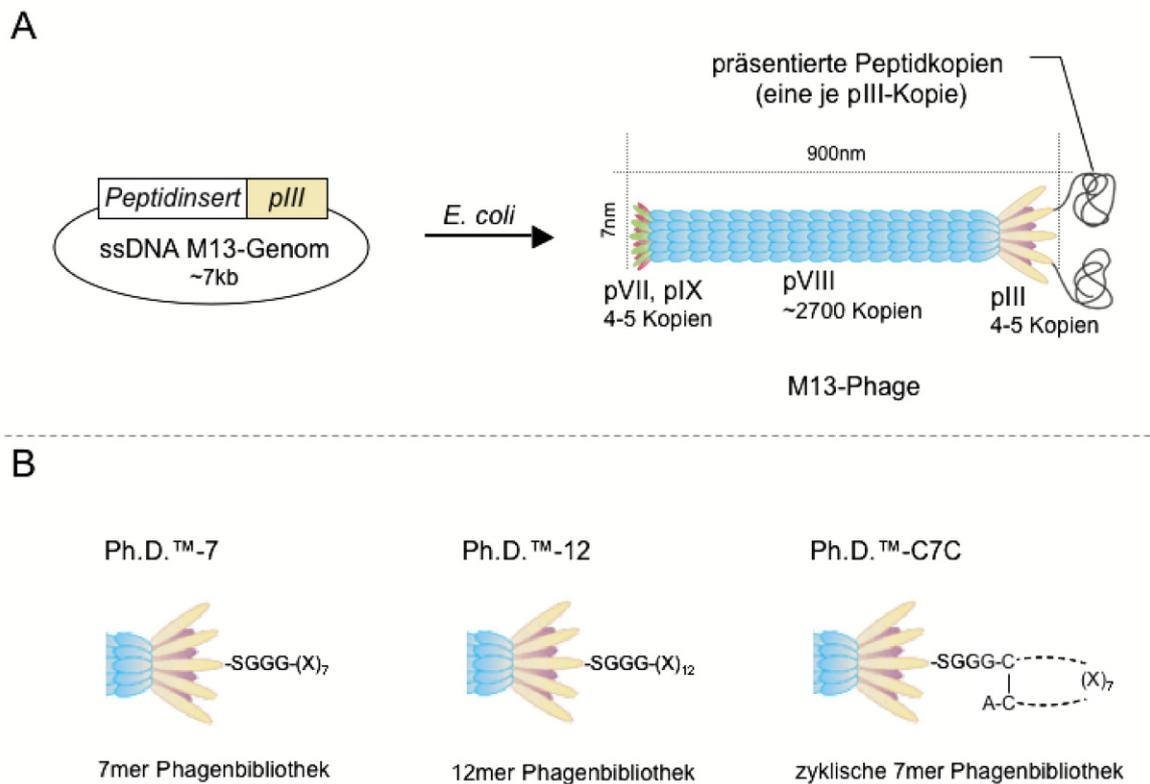
## 1.7 Das Phage Display-Verfahren

Bakteriophagen sind Viren, welche Bakterien, meist *E. coli*, infizieren. Das Virion des filamentösen Phagen M13, welcher zur Familie der *Inoviridae* gehört, hat eine Länge von 900nm und eine Breite von 7nm. Es besteht aus dem einzelsträngigen (ssDNA), ringförmigen Phagengenom (ca. 7kb), welches von ca. 2700 Kopien des Hüllproteins pVIII umgeben ist. Das eine Ende der röhrenförmigen Struktur wird von jeweils vier bis fünf Kopien der Hüllproteine pVII und pIX, das andere Ende von vier oder fünf Kopien des Hüllproteins pIII begrenzt. Mittels der pIII-Proteine infizieren M13-Phagen *E.coli* über dessen F-Pilus und replizieren sich im Zytoplasma ca. 1000mal je Generation. M13-Phagen gelangen über einen nicht-lytischen Knospungs-Prozess, welcher Zusammenbau und Export miteinander verschränkt, wieder aus der Wirtszelle (Wilson *et al.*, 1998).

Bei der Selektion von Phagen-präsentierten Strukturen handelt es sich um eine artifizielle chemische Evolution (Smith und Petrenko, 1997). Die „Fitness“ der Phagenklone besteht dabei in ihrer Fähigkeit zur Bindung an eine Zielstruktur (*Target*) über Fremd-Strukturen (Peptide, scFvs etc.), welche auf der Phagenoberfläche präsentiert werden (*Display*). Es erfolgt eine Selektion hinsichtlich der Phagenklone mit der höchsten Affinität zur jeweiligen Zielstruktur. Die auf der Phagenoberfläche exprimierten Strukturen werden generiert, indem entsprechend kodierende DNA im einzelsträngigen (ssDNA) Phagengenom zusammen mit dem Gen für ein Phagenhüllprotein (meist pIII oder pVIII) als Hybrid-Fusions-Protein in *E.coli* exprimiert und anschließend in die Phagenpartikel eingebaut werden. Dies führt nicht zum Verlust der Infektiosität der Phagen. Die physikalische Kopplung der Peptide an Phagenhüllproteine erlaubt eine schnelle und einfache Identifizierung selektionierter Peptide oder scFvs mittels molekularbiologischer Methoden (Smith, 1985; Smith und Petrenko, 1997).

Eine Phagenbibliothek besteht aus einem Mix von Phagenklonen mit unterschiedlichen Fremd-DNA-Insertionen hoher Diversität. Die erste Phagenbibliothek, welche in das pIII-Gen des Phagen f1 klonierte Fragmente des Restriktionsenzym *EcoRI* beinhaltete, wurde 1985 konstruiert. Die fremden Genfragmente wurden als Teil von pIII zwischen dessen N- und C-Terminus exprimiert (Smith, 1985). Seither wurden einige Verbesserungen hinsichtlich der Konstruktion der Vektoren vorgenommen. Die zu präsentierenden Peptide werden im Gegensatz zur Mitte des pIII-Oberflächenproteins nun an dessen N-Terminus platziert (**Abb. 1.8 A**). Dadurch wird für die präsentierten Peptide eine größere konformationelle Freiheit gewährleistet (Wilson *et al.*, 1998). Für die Suche nach hochaffinen Peptidliganden für eine bestimmte Zielstruktur können entsprechende Phagenbibliotheken aus Peptiden, welche sich

von der Primärsequenz des eigentlichen Antagonisten der Zielstruktur ableiten, konstruiert werden. Eine weitere Option besteht in der Verwendung randomisierter Phagenbibliotheken, welche Peptide definierter Länge präsentieren und aufgrund ihrer hohen Diversität nahezu alle möglichen Aminosäuren-Kombinationen enthalten.



**Abb. 1.8 Der M13-Phage.** (A) Schematische Darstellung des M13-Phagen sowie der Fusion eines Fremdproteins (am Beispiel eines Peptides). Die genetische Information für das Peptid wird an das Gen des pIII-Hüllproteins im Genom von M13 kloniert. (B) Schematische Darstellung der randomisierten, Phagen-präsentierten Peptid-Bibliotheken von New England Biolabs (NEB).

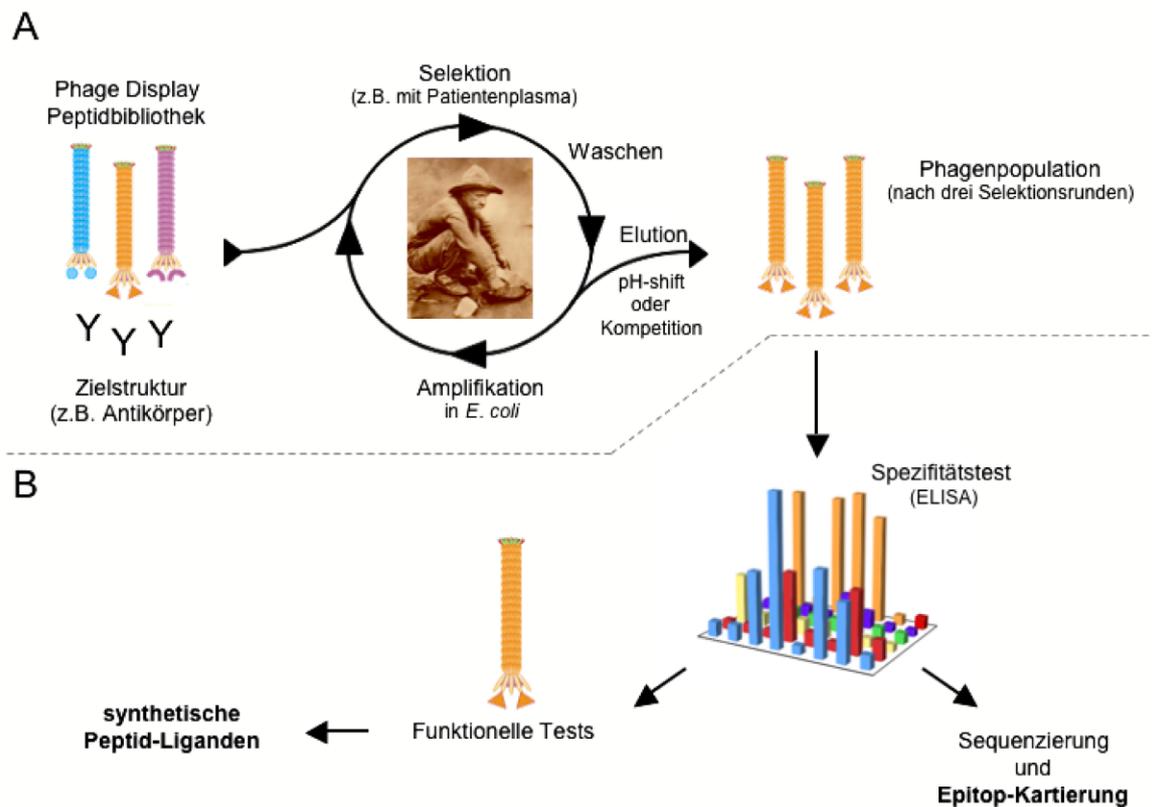
In drei gängigen Bibliotheken (**Abb. 1.8 B**), welche auch in dieser Arbeit zum Einsatz kamen, präsentieren M13-Phagen auf ihrer Oberfläche lineare Heptamere (Ph.D.™-7), zyklische Heptamere (Ph.D.™-C7C) sowie lineare Duodecamere (Ph.D.™-12). Der zur Erstellung der Phagenbibliotheken eingesetzte Vektor M13KE enthält u.a. das pIII-Gen, an dessen N-Terminus die jeweiligen zufälligen Peptidsequenzen über einen Linker fusioniert sind, so dass die randomisierten Peptide am N-Terminus des Hüllproteins pIII auf der Phagenoberfläche präsentiert werden. Die Ph.D.™-7 Phagenbibliothek enthält  $2 \cdot 10^9$ , die Ph.D.™-C7C Phagenbibliothek  $3.7 \cdot 10^9$  und die Ph.D.™-12 Phagenbibliothek  $1.9 \cdot 10^9$  unabhängige Klone. Ph.D.™-7 sowie Ph.D.™-C7C enthalten somit nahezu alle der theoretisch möglichen  $1.28 \cdot 10^9$

heptameren AS-Sequenzen. Die in Ph.D.<sup>™</sup>-12 präsentierten Peptide repräsentieren jedoch nur einen kleinen Teil der  $4.1 \cdot 10^{15}$  möglichen duodecameren Sequenzen. In der Ph.D.<sup>™</sup>-C7C Phagenbibliothek werden die Peptidsequenzen an C- und N-Terminus von zwei Cysteinen flankiert. Da die Hüllproteine der Phagen in das oxidierende Milieu des Periplasmas von *E. coli* synthetisiert werden, kann sich zwischen den Cysteinen eine Disulfidbrücke ausbilden, wodurch die dazwischen liegenden, heptameren Sequenzen in eine zyklische Konformation gezwungen werden.

Phage Display findet seine Anwendung oft in der Suche (*Screening*) nach Peptidliganden für eine Zielstruktur (z.B. Antikörper). Für diese Affinitätsselektion (*Biopanning*) wird die Zielstruktur auf einer Matrix (z.B. 96-Loch-Platten, magnetische Kügelchen) immobilisiert und in der ersten Selektionsrunde mit einem Aliquot der Phagenbibliothek inkubiert (**Abb. 1.9 A**). Nicht-bindende Phagenklone werden gewaschen, gebundene Phagenklone werden eluiert. Die entstandene Subpopulation wird in *E. coli* amplifiziert und anschließend in eine neue Selektionsrunde eingesetzt. Bei der Selektion von Peptidliganden für einen Antikörper kann eine wesentlich spezifischere Elution durch Konkurrenz mit dem eigentlichen Antigen erreicht werden. Mittels zwei bis drei Selektionsrunden lässt sich eine Phagenpopulation mit hoher Spezifität für die Zielstruktur anreichern. Die weitere Charakterisierung (**Abb. 1.9 B**) der Klone besteht in einer Überprüfung ihrer Spezifität für die Zielstruktur im ELISA und der Identifizierung der jeweils präsentierten Peptidkopien durch Sequenzierung des entsprechenden Bereichs der präparierten Phagen-ssDNA.

Phage Display-Selektionen von Peptidbibliotheken ist in großer Bandbreite zur Identifikation von Peptidliganden für definierte Proteine, z.B. Antikörpern (Scott, 1990; Chen *et al.*, 1996; Heiskanen *et al.*, 1999; Königs *et al.*, 2000; Murray *et al.*, 2001) oder Liganden für bestimmte Proteindomänen (Yayon *et al.*, 1993; Cheadle *et al.*, 1994, Gazarian *et al.*, 2001) verwendet worden. Auch Peptidliganden für FVIII-Inhibitoren aus Patienten Plasma (Kuwabara *et al.*, 1999, Mühle *et al.*, 2004) bzw. einem monoklonalen FVIII-Inhibitor konnten bereits mittels Phage Display isoliert werden (Villard *et al.*, 2003). Phagen-assoziierte Peptidbibliotheken sind ebenfalls zur Aufschlüsselung der Komplexität des Antikörperrepertoires in polyklonalen Patientenserum geeignet (Prezzi *et al.*, 1996; Scala *et al.*, 1999; Humbert *et al.*, 2007). Die Phage Display-basierte Selektion von Peptidliganden für Antikörper ist oft mit der Lokalisation des Antikörperepitops verbunden (Cwirla *et al.*, 1990; Cortese *et al.*, 1994; Chen *et al.*, 1996; Boots *et al.*, 1997; Heiskanen *et al.*, 1999; Königs *et al.*, 2000; Kouzmitcheva *et al.*, 2001). Allerdings erweist sich die Kartierung diskontinuierlicher Epitope anhand kurzer AS-Sequenzen als schwierig, da dies eine Analyse der gesamten Tertiärstruktur des nativen

Antigens erfordert. Hierbei sind entsprechende *Software*-Lösungen hilfreich (3DEX: Schreiber *et al.*, 2005; MIMOX: Huang *et al.*, 2006). Phagen bzw. synthetische Peptidliganden, welche Antikörper hochspezifisch binden können und aufgrund deren sequenzieller und struktureller Gemeinsamkeiten mit dem nativen Epitop des Antikörpers aufweisen bezeichnet man als Phagotope bzw. Mimotope.



**Abb. 1.9 Biopanning.** (A) Schema der Biopannings zur Selektion von Peptidliganden für Antikörper in Patientenplasmen. Da die Affinitätsselektion dem Goldwaschen nahe kommt, wird der Prozess als Biopanning bezeichnet. (B) Die einzelnen Phagenklone aus der, mittels Biopannings angereicherten Phagenpopulation werden im ELISA auf ihre Spezifität für die Zielstruktur getestet. Klone mit guter Affinität werden sequenziert und die erhaltenen AS-Sequenzen der präsentierten Peptide zur Epitopkartierung genutzt. Besonders gut bindende Klone werden in funktionelle Tests eingesetzt. Korrespondierend zu den präsentierten Peptiden der potentesten Klone werden schließlich synthetische Peptide generiert.

Im Hinblick auf einen therapeutischen Einsatz von Peptiden bedeutet jedoch deren geringe *in vivo*-Halbwertszeit eine deutliche Einschränkung. Ein prominentes Beispiel für ein potentes, therapeutisch genutztes Peptid stellt der HIV-1 Eintritts-Inhibitor T-20 (*Enfurvitid*) dar, welcher sich von dem Transmembranprotein gp41 von HIV-1 ableitet. Die kurze *in vivo*-Halbwertszeit des Peptides verlangt eine tägliche, zweimalige Infusion von jeweils 100mg (Matthews *et al.*, 2004). Dieses generelle Problem therapeutischer Peptide kann durch den

Einsatz von D-Aminosäuren sowie Retro-Inverso-Derivaten umgangen werden. Allerdings sind diese Modifikationen teuer und wirken sich zudem oft nachteilig auf die Spezifität der Peptide aus. Während die geringe *in vivo*-Halbwertszeit einerseits als Nachteil erachtet wird (Pipe *et al.*, 2004), erscheint dieser Umstand in anderem Kontext in Verbindung mit einer hohen Dosisverabreichung von kleinen, hochspezifischen Molekülen als eine sehr günstige, pharmakokinetische Eigenschaft (Kelly *et al.*, 2003).

### 1.8 Zielsetzung der Arbeit

Ziel dieser Arbeit war es, mittels des Phage Display-Verfahrens Peptidliganden mit Spezifität für FVIII-Inhibitoren in Patientenplasmen zu selektionieren und Konzepte für eine therapeutische Nutzung zu evaluieren. Durch Screening Phagen-präsentierter, randomisierter Peptidbibliotheken mit Inhibitor-positiven HA-Patienten-Plasmen sollten Phagenklonen angereichert werden, welche aufgrund der präsentierten Peptide spezifisch mit den im Patienten-Plasma enthaltenen anti-FVIII-Antikörpern reagieren. Durch Sequenzierung einzelner Phagenklone sollten unter den AS-Sequenzen der kodierten Peptide Konsensusmotive identifiziert werden. Die Motive sollten mittels Datenbank- sowie Software-Analyse sowohl mit der Primärsequenz als auch der Tertiärstruktur von FVIII verglichen werden. Die so generierten Epitopdaten sollten experimentell verifiziert werden. Phagenklone, welche hinsichtlich der Bindung an IgGs in Patientenplasma sowie der AS-Sequenz der präsentierten Peptide besonders viel versprechend erscheinen, sollten in weiteren funktionellen Tests analysiert werden. Entsprechend der AS-Sequenz der potentesten Phagotope sollten synthetische Peptide generiert werden, welche in Bindungs- und Inhibitionsstudien von FVIII-Inhibitoren eingesetzt werden. Da im Hinblick auf mögliche Peptid-basierte Therapiekonzepte eine Reaktivität der Peptide mit Inhibitoren in möglichst vielen Plasmen verschiedener Patienten entscheidend wäre, sollte deren Kreuzreaktivität mit einer Reihe Inhibitor-positiver, heterologer Plasmen analysiert werden. Aufgrund der geringen Halbwertszeit und der damit verbundenen Einschränkungen für eine therapeutische Nutzung der selektionierten Peptidliganden, sollte ein Konzept zur Stabilisierung der Peptide getestet werden. Abschließend sollte mittels der selektionierten Peptide das Targeting FVIII-Inhibitor-spezifischer Gedächtnis-B-Zellen von HA-Patienten evaluiert werden.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Laborgeräte und Einwegartikel

##### Modell

ABIPRISM 3100-Avant Genetic Analyzer  
 Auslaufpipetten (2, 5, 10 und 25ml)  
 Autoklav 2540 EL  
 Behring Coagulation Timer (BCT®)  
 Biofuge 15R  
 Biofuge 17RS  
 Biofuge fresco  
 Biofuge Primo R  
 Blotting-Papier  
 Brutschrank FunctionLine  
 Brutschrank für Zellkulturen FunctionLine  
 DNA Gelelektrophorese-Zelle Sub-cell GT  
 ELISA-96-Loch Platten (F-Form, Microlon)  
 ELISA Reader SpectraMax 340  
 ELISA Reader SLT.Spectra  
 ELISA Washer ELx405  
 FACSCalibur™  
 Filterplatten, 96-Loch, Multiscreen™ -HA  
 Fluoreszenzmikroskop Eclipse TE300  
 Geldokumentation Alpha Imager 1220  
 Gelelektrophorese-Kammer Mini-PROTEAN® 3  
 & Gelelektrophorese Power Pac Basic  
 Gewebescheiden für Zellkultur  
 Heizblock Digital Heatblock  
 HisTrap™ HP Säulen (1ml)  
 Hyperfilm™ ECL  
 Kamera Progressive 3CCD, Model DXC-9100P  
 Kühl-Gefrier-Kombination Premium  
 Magnetischer Halter MPC  
 Magnetrührer MR 1000  
 Mikroskop  
 Mikrowelle  
 Minifuge  
 NanoDrop  
 Nitrocellulose (0.45µm)  
 PCR-Reaktionsgefäße

##### Hersteller/Vertrieb

Applied Biosystems, HITACHI, Foster City, USA  
 Sarstedt AG & Co., Nümbrecht, Deutschland  
 Tuttnauer, Tel Aviv, Israel  
 Dade Behring, Deerfield, IL, USA  
 Heraeus Instruments GmbH, Hanau, Deutschland  
 Whatman, Springfield Mill, UK  
 Heraeus Instruments GmbH, Hanau, Deutschland  
 Heraeus Instruments GmbH, Hanau, Deutschland  
 Bio-Rad, Hercules CA, USA  
 Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Deutschland  
 Molecular Devices Corp., Sunnyvale CA, USA  
 SLT Labinstruments, Crailsheim, Deutschland  
 BIOTEK Instruments Inc., Vermont, ME, USA  
 BD, Franklin Lakes, NJ, USA  
 Millipore, Billerica, MA, USA  
 Nikon, Japan  
 Alpha Innotech Corp., San Leonardo, CA, USA  
 Bio-Rad, Hercules, CA, USA  
  
 Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Deutschland  
 VWR, Darmstadt, Deutschland  
 Amersham Bioscience GmbH, Freiburg, Deutschland  
 Amersham Bioscience GmbH, Freiburg, Deutschland  
 Sony, Japan  
 Liebherr, Biberach, Deutschland  
 Dynal, Oslo, Norway  
 Heidolph, Nürnberg, Deutschland  
 Carl Zeiss AG, Jena, Deutschland  
 Siemens, Deutschland  
 Heraeus Holding, Hanau, Deutschland  
 Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen, Deutschland  
 Bio-Rad, Hercules, CA, USA  
 Sarstedt AG & Co., Nümbrecht, Deutschland

**Modell**

Peristaltikpumpenschläuche (∅ 1.02mm)  
 & Peristaltische Pumpe REGLO  
 Petrischalen  
 pH-Meter MP 220  
 Photometer SmartSpec™ 3000  
 Pipettierhilfe Pipetboy acu  
 Pipetten  
 Pipettenspitzen, gestopft  
 Pipettenspitzen  
 Polypropylen-Röhrchen (10ml)  
 Reaktionsgefäße (1.5 und 2ml)  
 Reaktionsgefäße (15 und 50ml)  
 Rotator MACSmix  
 Röntgenfilmentwickler Optimax TR  
 Schüttel-Inkubator TH-30 und SM-30  
 Sterilbank für Zellkulturen Hera Safe  
 Sterilfilter (0.45µm)  
 Thermocycler DNA Engine  
 UV Transilluminator Gel Doc 2000  
 Vortex Genie 2  
 Wasserbad  
 Zählkammer  
 Zellkulturflaschen (T25, T75, T175)  
 Zellkulturplatten (6-, 12-, 24-, 48- und 96-Loch Platten)  
 Zentrifuge Rottina 48R

**Hersteller/Vertrieb**

Ismatec, Glattbrugg-Zürich, Schweiz  
 Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Deutschland  
 Mettler-Toledo GmbH, Giessen, Deutschland  
 Bio-Rad, Hercules, CA, USA  
 INTEGRA Biosciences GmbH, Fernwald, Deutschland  
 Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland  
 Starlab GmbH, Ahrensburg, Deutschland  
 Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Deutschland  
 BD, Franklin Lakes, NJ, USA  
 Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland  
 BD, Franklin Lakes, NJ, USA  
 Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach, Deutschland  
 Schroeder und Henke, Wiesloch, Deutschland  
 Edmund Bühler GmbH, Tübingen, Deutschland  
 Heraeus Instruments GmbH, Hanau, Deutschland  
 Millipore, Billerica, MA, USA  
 Bio-Rad, Hercules, CA, USA  
 Bio-Rad, Hercules, CA, USA  
 Scientific Industries Inc., Bohemia, NY, USA  
 VWR, Darmstadt, Deutschland  
 Hycor Biomedical Inc, Garden Grove, CA, USA  
 Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Deutschland  
 Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Deutschland  
 Hettich AG, Bäch, Schweiz

**2.1.2 Chemikalien, Biochemikalien, Puffer und Medienbestandteile****Produkt**

Acrylamid/Bis- (30%), Rotiphorese  
 Adenosintriphosphat, ATP  
 Ammoniumperoxodisulfat, APS  
 Ampicillin  
 Bacto-Tryptone  
 Bacto-Yeast Extract  
 β-Mercaptoethanol  
 Biocoll Trennlösung  
 Bovine Serum Albumine, BSA  
 Bromphenolblau  
 Coomassie Blue G250  
 DMEM  
 DMSO  
 dNTP Mix 10mM  
 EDTA Dinatriumsalz Dihydrat  
 Essigsäure 99%  
 Ethanol 99.8%  
 Ethidiumbromidlösung 1%  
 FCS

**Hersteller/Vertrieb**

Carl Roth GmbH + Co, Karlsruhe, Deutschland  
 Roche Diagnostics, Basel, Schweiz  
 Carl Roth GmbH + Co, Karlsruhe, Deutschland  
 Carl Roth GmbH + Co, Karlsruhe, Deutschland  
 BD, Franklin Lakes, NJ, USA  
 BD, Franklin Lakes, NJ, USA  
 Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland  
 Biochrom AG, Berlin, Deutschland  
 PAA Laboratories GmbH, Pasching, Austria  
 Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland  
 Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland  
 Cambrex Corp., East Rutherford, NJ, USA  
 Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland  
 Fermentas GmbH, Leon-Rot, Deutschland  
 AppliChem, Darmstadt, Deutschland  
 Carl Roth GmbH + Co, Karlsruhe, Deutschland  
 Carl Roth GmbH + Co, Karlsruhe, Deutschland  
 Carl Roth GmbH + Co, Karlsruhe, Deutschland  
 Biochrom AG, Berlin, Deutschland

**Produkt**

Fluorescein-5-isothiocyanat, FITC  
 Formamid  
 Glycerin  
 Glycin-HCL  
 HPLC Wasser  
 Imidazol  
 IPTG  
 Isopropanol  
 LB-Agar  
 L-Glutamin  
 Magnesiumchlorid, MgCl<sub>2</sub>  
 Methanol 99%  
 Milchpulver  
 N,N-Dimethylformamid, DMF  
 Natriumacetat, NaOAc  
 Natriumazid, NaN<sub>3</sub>  
 Natriumchlorid, NaCl  
 Natriumdodecylsulfat, SDS, 99%  
 Natriumphosphat, Na<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>  
 o-Phenylendiamin Dihydrochlorid, OPD  
 PBS 10x, PBS 1x  
 Penicillin/Streptomycin  
 Phosphat-Citrat Puffer Tabletten  
 Polyethylenglykol-6000, PEG-6000  
 Probenpuffer 6x  
 Protease Inhibitor Cocktail  
 Puromycin  
 QA-Agarose  
 RIPA Lysis Puffer  
 Roti®-Phenol-Chloroform  
 RPMI 1640 mit Phenolrot  
 RPMI 1640  
 Salzsäure  
 Schwefelsäure 1N  
 TAE-Puffer 10x  
 Tetanol® pur  
 TEMED  
 Tetracyclin  
 Tris  
 Tris-HCl  
 Trypanblau  
 Trypsin EDTA  
 Tween-20  
 Wasserstoffperoxid 30%  
 XGal

**Hersteller/Vertrieb**

Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland  
 Carl Roth GmbH + Co, Karlsruhe, Deutschland  
 Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland  
 Carl Roth GmbH + Co, Karlsruhe, Deutschland  
 VWR, Darmstadt, Deutschland  
 Carl Roth GmbH + Co, Karlsruhe, Deutschland  
 Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland  
 Carl Roth GmbH + Co, Karlsruhe, Deutschland  
 Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland  
 Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland  
 Cambrex Corp., East Rutherford, NJ, USA  
 Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland  
 Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland  
 Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland  
 Fermentas GmbH, Leon-Rot, Deutschland  
 Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland  
 MP Biomedicals, Illkirch, Frankreich  
 Carl Roth GmbH + Co, Karlsruhe, Deutschland  
 Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland  
 Carl Roth GmbH + Co, Karlsruhe, Deutschland  
 Cambrex Corp., East Rutherford, NJ, USA  
 Cambrex Corp., East Rutherford, NJ, USA  
 Carl Roth GmbH + Co, Karlsruhe, Deutschland  
 AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland  
 Invitrogen GmbH, Karlsruhe, Deutschland  
 Chiron Behring GmbH & Co.KG, Marburg, Deutschland  
 Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland  
 AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland  
 Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland  
 Carl Roth GmbH + Co, Karlsruhe, Deutschland  
 Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland  
 Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland  
 Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland  
 Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland  
 Carl Roth GmbH + Co, Karlsruhe, Deutschland

### 2.1.3 Lösungen und Medien

Lösung/Medium	Rezeptur
$\Delta$ FCS	Hitzeinaktiviertes FCS (30 Minuten im 56°C Wasserbad)
10% (w/v) APS	1g Ammoniumperoxodisulfat mit dH <sub>2</sub> O auf 10ml auffüllen, aliquotieren, bei -20°C lagern
10% (w/v) SDS	10 g SDS mit 100ml dH <sub>2</sub> O auffüllen
25% PEG-6000/2.5M NaCl	62.5g PEG-6000 36.5g NaCl in 250ml dH <sub>2</sub> O lösen, autoklavieren und unter Rühren abkühlen
Ampicillin-Stock (1000x)	100mg/ml Ampicillin in dH <sub>2</sub> O lösen, aliquotieren, bei -20°C lagern
Biopanning Puffer A	1xPBS mit 0.1% (w/v) BSA
Biopanning Puffer B	1xPBS mit 1% (w/v) BSA
Biopanning Puffer C	10xPBS mit 1% (w/v) BSA
DMEM, supplementiert (DMEM <sub>sup</sub> )	DMEM 10% (v/v) $\Delta$ FCS 5% (v/v) L-Glutamin 1% (v/v) Penicillin/Streptomycin
DMEM <sub>Puro</sub>	DMEM <sub>sup</sub> mit 20 $\mu$ g/ml Puromycin
ELISA-Blockpuffer (5% MPBST)	5g Milchpulver in 100ml 1xPBS mit 0.5% (v/v) Tween-20 lösen
ELISA-Waschpuffer (1xPBST)	1xPBS mit 0.1% (v/v) Tween-20
Elutionspuffer (0.2M Glycin-HCl)	2.23g Glycin-HCl in 80ml dH <sub>2</sub> O lösen, pH 2.2 einstellen, 100mg BSA zugeben, auf 100ml auffüllen, sterilfiltrieren.
FACS-Puffer	RPMI 1640 mit 3% (v/v) $\Delta$ FCS
IPTG-Stock (1000x)	0.5M in dH <sub>2</sub> O
LB-Agar	LB-Medium 15g Agar in dH <sub>2</sub> O lösen, pH 7 einstellen, auf 1000ml auffüllen, autoklavieren
LB-Ampicillin-Medium LB-Ampicillin Agar	Nach Autoklavieren 1ml Ampicillin-Stock auf 1000ml Medium zugeben (Endkonzentration 100 $\mu$ g/ml)
LB-Medium	10g Bacto Tryptone 5g Bacto Yeast Extract 5g NaCl in dH <sub>2</sub> O lösen, pH 7 einstellen, auf 1000ml auffüllen, autoklavieren
LB-Tetracyclin-Medium LB-Tetracyclin-Agar	Nach Autoklavieren 1ml Tetracyclin-Stock auf 1000ml Medium zugeben (Endkonzentration 10 $\mu$ g/ml)
Neutralisationspuffer	15.76g Tris-HCl in 80ml dH <sub>2</sub> O lösen, pH 9.1 einstellen, auf 100ml auffüllen, sterilfiltrieren
PAGE 10x Laufpuffer	30g Tris 144g Glycin 10g SDS mit dH <sub>2</sub> O auf 1000ml auffüllen

<b>Lösung/Medium</b>	<b>Rezeptur</b>
PAGE Probenpuffer	60% (v/v) Glycerin 18% (w/v) SDS 0.3% (v/v) Bromphenolblau 600mM Tris-HCl 3.5mM Mercaptoethanol
Phagen-Lagerungspuffer	1xPBS mit 0.02% NaN <sub>3</sub>
Puromycin-Stock	10mg/ml Puromycin in ddH <sub>2</sub> O lösen, sterilfiltrieren, aliquotieren, bei -20°C lagern
RPMI, supplementiert (RPMI <sub>sup</sub> )	RPMI 1640 mit Phenolrot 10% (v/v) ΔFCS 5% (v/v) L-Glutamin 1% (v/v) Penicillin/Strptomycin
RPMI, zur Stimulation (RPMI <sub>stim</sub> )	RPMI <sub>sup</sub> mit 50μM β-Mercaptoethanol
Tetracyclin-Stock (1000x)	10mg/ml Tetracyclin in 70%igem Ethanol lösen, aliquotieren, bei -20°C lagern
Top-Agar	10g Bacto Tryptone 5g Bacto Yeast Extract 5g NaCl 1g MgCl <sub>2</sub> · 6H <sub>2</sub> O 7g Agar in dH <sub>2</sub> O lösen, pH 7 einstellen, auf 1000ml auffüllen, autoklavieren
Western Blot Blockpuffer	Siehe ELISA-Blockpuffer
Western Blot Transferpuffer	20% (v/v) Methanol 10% (v/v) PAGE 10xLaufpuffer (ohne SDS)
Western Blot Waschpuffer	Siehe ELISA-Waschpuffer
XGal-Stock	20mg/ml in DMF
Zellkultur-Kryo-Medium	90% (v/v) ΔFCS 10% (v/v) DMSO

### 2.1.4 Kits

<b>Produkt</b>	<b>Hersteller/Vertrieb</b>
ABI PRISM BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit	Applied Biosystems, Foster City, CA, USA
AEC Staining Kit	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
Calcium Phosphat Transfection Kit	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
CellTrace™ CFSE Detection	Invitrogen GmbH (Molecular Probes), Karlsruhe, Deutschland
ECL™ Western Blotting System	Amersham Bioscience GmbH, Freiburg, Deutschland
NucleoBond® PC100	Macherey-Nagel GmbH & Co. KG, Düren, Deutschland
E.Z.N.A. Plasmid Miniprep Kit	Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen, Deutschland
E.Z.N.A. Gel Extraction Kit	Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen, Deutschland
E.Z.N.A. Cycle pure Kit	Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen, Deutschland
Ph.D-7 Phage Display Peptide Library Kit	New England Biolabs, Ipswich, MA, USA
Ph.D-C7C Phage Display Peptide Library Kit	New England Biolabs, Ipswich, MA, USA
Ph.D-12 Phage Display Peptide Library Kit	New England Biolabs, Ipswich, MA, USA
Slide-A-Lyzer 10K MWCO Dialysis Cassets	Pierce, Rockford, IL, USA

### 2.1.5 Enzyme, Zytokine, Faktoren, Standards

Produkt	Hersteller/Vertrieb
100bp DNA Ladder	New England Biolabs, Ipswich, MA, USA
2-Log DNA Ladder (0.1-10kb)	New England Biolabs, Ipswich, MA, USA
Antarctic Phosphatase	New England Biolabs, Ipswich, MA, USA
CD40 Ligand	PeptoTech Inc, Rocky Hill, NJ, USA
FVIII Kogenate®	Bayer Healthcare GmbH, Leverkusen, Deutschland
FIX Mononine®	CSL Behring GmbH, Marburg, Deutschland
IL-2	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
IL-4	PeptoTech Inc, Rocky Hill, NJ, USA
IL-10	PeptoTech Inc, Rocky Hill, NJ, USA
Kaleidoscope Prestained Standard	Bio-Rad, Hercules, CA, USA
p53-6xHis, Positivkontrolle	Jackson ImmunoResearch Laboratories Inc., West Grove, PA, USA
<i>Pfu</i> DNA Polymerase	Fermentas GmbH, Leon-Rot, Deutschland
Pokeweed Mitogen (PMW)	MP Biomedicals, Solon, OH, USA
Restriktionsenzyme	New England Biolabs, Ipswich, MA, USA
Staphylococcus aureus Protein A (SpA)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
T4 Ligase (mit PEG)	Fermentas GmbH, Leon-Rot, Deutschland
T4 Polynukleotid Kinase (PNK)	New England Biolabs, Ipswich, MA, USA

### 2.1.6 Antikörper

Antikörper	Hersteller/Vertrieb
Beriglobin®, polyklonales Immunglobulinpräparat zur subkutanen Injektion	CSL Behring GmbH, Marburg, Deutschland
F(ab') <sub>2</sub> -Fragment Ziege anti-Human IgA+IgG+IgM (spezifisch für schwere und leichte Kette)	Jackson ImmunoResearch Laboratories Inc., West Grove, PA, USA
F(ab') <sub>2</sub> -Fragment Ziege anti-Human IgG (spezifisch für schwere und leichte Kette)	Jackson ImmunoResearch Laboratories Inc., West Grove, PA, USA
Humanes IgG <sub>1</sub> κ	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
Humanes IgG <sub>2</sub> κ	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
Humanes IgG <sub>3</sub> κ	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
Humanes IgG <sub>4</sub> κ	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
Kaninchen anti-Ziege IgG, polyklonal, Fluorescein-5-isothiocyanat (FITC) konjugiert	Jackson ImmunoResearch Laboratories Inc., West Grove, PA, USA
Kanninchen anti-6xHis, polyklonal	Affinity BioReagents™, Golden, CO, USA
Maus anti-6xHis, monoklonal	Jackson ImmunoResearch Laboratories Inc., West Grove, PA, USA
Maus anti-Human CD19, monoklonal, Allophycocyanin (APC) konjugiert	BD, Franklin Lakes, NJ, USA

**Antikörper**

Maus anti-Human CD27, monoklonal,  
R-Phycoerythrin (R-PE) konjugiert

Maus anti-Human CD38, monoklonal,  
R-Phycoerythrin (R-PE) konjugiert

Maus anti-Human CD40, Klon S2C6

Maus anti-Human Faktor VIII A1-Domäne, monoklonal

Maus anti-Human Faktor VIII A2-Domäne, monoklonal

Maus anti-Human Faktor VIII A3-Domäne, monoklonal

Maus anti-Human Faktor VIII C1-Domäne, monoklonal

Maus anti-Human Faktor VIII C2-Domäne, monoklonal

Maus anti-Human IgG<sub>1</sub>, monoklonal, Biotin-SP konjugiert

Maus anti-Human IgG<sub>2</sub>, monoklonal, Biotin-SP konjugiert

Maus anti-Human IgG<sub>3</sub>, monoklonal, Biotin-SP konjugiert

Maus anti-Human IgG<sub>4</sub>, monoklonal, Biotin-SP konjugiert

Maus anti-Human IgG (spezifisch für  $\gamma$ -Kette), monoklonal,  
Biotin-SP konjugiert

Maus anti-Human IgM (spezifisch für  $\mu$ -Kette), monoklonal,  
Biotin-SP konjugiert

Maus IgG<sub>1</sub>  $\kappa$ , monoklonal, Biotin-SP konjugiert

Maus anti-M13, monoklonal  
Meerrettichperoxidase (HRP) konjugiert

Ratte anti-Maus IgG (spezifisch für schwere und leichte  
Kette), Meerrettichperoxidase (HRP) konjugiert

Streptavidin, Meerrettichperoxidase (HRP) konjugiert

Streptavidin, Peridinin-Chlorophyll-a (Sav-PerCP)  
konjugiert

Ziege anti-6xHis, polyklonal

Ziege anti-6xHis, polyklonal  
Fluoreszeinisothiocyanat (FITC) konjugiert

Ziege anti-Human Ig

Ziege anti-Human IgG (spezifisch für  $\mu$ -Kette),  
Meerrettichperoxidase (HRP) konjugiert

Ziege anti-Kanninchen IgG (spezifisch für schwere und  
leichte Kette), Meerrettichperoxidase (HRP) konjugiert

**Hersteller/Vertrieb**

BD, Franklin Lakes, NJ, USA

Dako Deutschland GmbH, Hamburg, Deutschland

Mabtech AB, Hamburg, Deutschland

Green Mountain Antibodies, Burlington, VT, USA

Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim,  
Deutschland

BD, Franklin Lakes, NJ, USA

BD, Franklin Lakes, NJ, USA

BD, Franklin Lakes, NJ, USA

Amersham Bioscience GmbH, Freiburg,  
Deutschland

Jackson ImmunoResearch Laboratories Inc., West  
Grove, PA, USA

Jackson ImmunoResearch Laboratories Inc., West  
Grove, PA, USA

BD, Franklin Lakes, NJ, USA

GeneTex Inc., San Antonio, TX, USA

QED Bioscience Inc., San Diego, CA, USA

Caltag Laboratories, Burlingame, CA, USA

Caltag Laboratories, Burlingame, CA, USA

Jackson ImmunoResearch Laboratories Inc., West  
Grove, PA, USA

## 2.1.7 Vektoren

### Bezeichnung

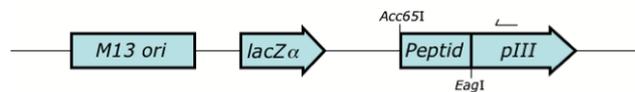
M13KE pIII

### Beschreibung / Verwendungszweck

Vektor der PH.D-7™, -C7C™ und -12™ Phage Display-Peptidbibliotheken. Die am N-Terminus das pIII-Hüllproteins exprimierten, randomisierten Peptide wurden über die Restriktionsschnittstellen *Acc65I* und *EagI* inseriert und sind durch einen flexiblen G<sub>3</sub>S-Spacer von pIII getrennt. Je Virion werden fünf Peptidkopien präsentiert. Die Sequenzierung der Peptidinserts erfolgt aus dem pIII-kodierenden Gen.

### Referenz

NEB,  
Ipswich, MA,  
USA

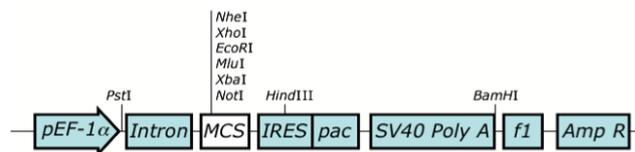


*M13 ori*: M13 Ursprung; *lacZα*: α-Fragment von β-Galaktosidase; *Gen III*: kodiert für das pIII Mantelprotein;  $\leftarrow$ : M13 -96pIII Oligonukleotid

pEF-IRESp

Vektor zur stabilen Expression von rekombinanten Proteinen in Säugerzellen.

Hobbs *et al.*,  
1998

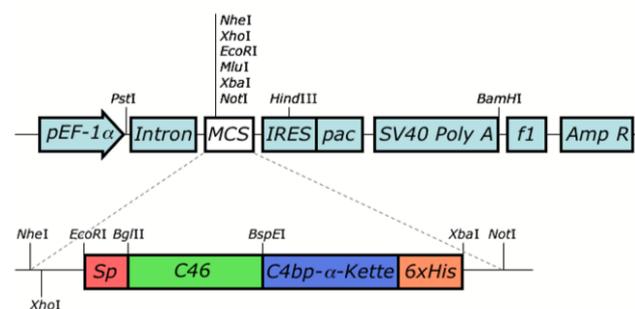


*pEF1α*: humaner Elongationsfaktor 1α; Intron: chimäres Intron; *MCS*: multiple Klonierungsstelle; *IRES*: internal ribosomal entry site; *pac*: Puromycin-Resistenz-Gen; *SV40 Poly A*: SV40 Terminations- und Polyadenylierungs-Signal; *f1*: Phage f1 Ursprung; *Amp R*: Ampicillin-Resistenz-Gen

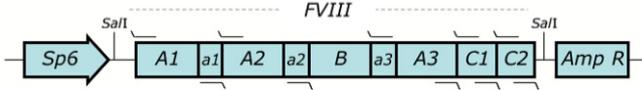
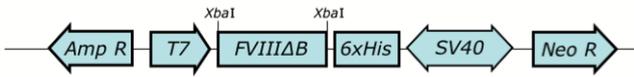
364H

pEF-IRESp mit inserierter genetischer Information für das C46-Peptid sowie der C-terminale Multimerisationsdomäne der α-Kette des humanen C4-Bindeproteins (C4bp<sub>α</sub>). Der Vektor wurde zur stabilen Expression von multimerem C46-Peptid in Säugerzellen genutzt. Das C46-Peptid und C4bp<sub>α</sub> sind durch den Linker -SG<sub>4</sub>S- getrennt. Der Vektor diente als Basis zur Klonierung aller Konstrukte dieser Arbeit.

Dervillez *et al.*, 2006



*Sp*: Signalpeptid von LNGFR (*low-affinity nerve growth factor*); *6xHis*: Hexa-Histidin-Markierung

Bezeichnung	Beschreibung / Verwendungszweck	Referenz
pSP64-FVIII	In den Vektor pSP64 (Promega, Madison, WI, USA) wurde FVIII-cDNA über die Restriktionsschnittstelle <i>SalI</i> eingefügt. Der Vektor fungierte als Matrize zur Amplifikation der einzelnen, Domänen-kodierenden DNA-Abschnitte mittels PCR.	Toole <i>et al.</i> , 1984 (ATCC #39812)
	 <p><i>Sp6</i>: Sp6-Promotor; <i>A1</i>: A1-Domäne; <i>a1</i>: a1-Spacer; <i>A2</i>: A2-Domäne; <i>a2</i>: a2-Domäne; <i>B</i>: B-Domäne; <i>a3</i>: a3-Spacer; <i>A3</i>: A3-Domäne; <i>C1</i>: C1-Domäne; <i>C2</i>: C2-Domäne; <i>Amp R</i>: Ampicillin-Resistenz-Gen; <math>\sphericalangle</math>: Oligonukleotide zur Amplifikation der Domänen-kodierenden DNA-Abschnitte (<i>A1</i>, <i>A2</i>, <i>A3</i>, <i>C1</i> und <i>C2</i>)</p>	
pcDNA 3.1-FVIII $\Delta$ B	B-Domänen deletierte ( $\Delta$ B)FVIII-cDNA wurde zunächst über die Schnittstelle <i>SalI</i> kloniert (pSP64-FVIII $\Delta$ B) und anschließend in den Expressionsvektor pcDNA 3.1 (Invitrogen GmbH, Karlsruhe, Deutschland) über die Schnittstelle <i>XbaI</i> eingefügt.	Becker <i>et al.</i> , 2004
	 <p><i>Amp R</i>: Ampicillin-Resistenz-Gen; <i>T7</i>: T7 Promotor; <i>MCS</i>: Multiple Klonierungsstelle; <i>6xHis</i>: Hexa-Histidin-Markierung; <i>SV40</i>: SV40 Promotor; <i>Neo R</i>: Neomycin-Resistenz-Gen</p>	
pEF-IRESp-F8A1	Zur Expression der A1-Domäne von FVIII in Säugerzellen	Diese Arbeit
pEF-IRESp-F8A2	Zur Expression der A2-Domäne von FVIII in Säugerzellen	Diese Arbeit
pEF-IRESp-F8A3	Zur Expression der A3-Domäne von FVIII in Säugerzellen	Diese Arbeit
pEF-IRESp-F8C1	Zur Expression der C1-Domäne von FVIII in Säugerzellen	Diese Arbeit
pEF-IRESp-F8C2	Zur Expression der C2-Domäne von FVIII in Säugerzellen	Diese Arbeit
pEF-IRESp-C4bp $\alpha$ -12C6	Zur Expression von multimerem Peptid 12C6 (12C6 <sub>M</sub> ) in Säugerzellen	Diese Arbeit
pEF-IRESp-C4bp $\alpha$ -12C6A	Zur Expression von multimerem Peptid 12C6A (12C6A <sub>M</sub> ) in Säugerzellen	Diese Arbeit
pEF-IRESp-C4bp $\alpha$ -12H10	Zur Expression von multimerem Peptid 12H10 (12H10 <sub>M</sub> ) in Säugerzellen	Diese Arbeit
pEF-IRESp-C4bp $\alpha$ -12H10A	Zur Expression von multimerem Peptid 12H10A (12H10A <sub>M</sub> ) in Säugerzellen	Diese Arbeit
pEF-IRESp-C4bp $\alpha$ -p107	Zur Expression von multimerem Peptid p107 (p107 <sub>M</sub> ) in Säugerzellen	Diese Arbeit
pEF-IRESp-C4bp $\alpha$ -C	Zur Expression von multimerem Kontrollpeptid C (C <sub>M</sub> ) in Säugerzellen	Diese Arbeit
pcDNA 3.1 V5-FVIII $\Delta$ B*	Zur Expression von mutiertem FVIII $\Delta$ B in Säugerzellen Folge Aminosäuren wurden jeweils gegen Alanin ausgetauscht: E589, I591, N597, P596, P598, K2227, E2228, W2229, D2267, H2269, Q2270, W2271, R2307, H2309	Diese Arbeit

\*Die einzelnen Vektoren für jede FVIII-Mutante sind nicht angegeben



am 3'-Ende. Das resultierende PCR-Produkt wurde zur Klonierung des Vektors pEF-IRESp-F8A2 verwendet.

#### FVIII A3 FOR

5'-gct gagctcgaggaaatagaagtcacctgggcaaagcaagg-3'

#### FVIII A3 6xHis REV

5'-gctgaggcggcccctaataatgatggatggatgacacttattgctgtacacc-3'

- PCR-Oligonukleotide zur Amplifikation der für die A3-Domäne von FVIII kodierenden cDNA Sequenz aus pSP64-FVIII unter Einführung einer *XhoI*-Restriktionsschnittstelle am 5'-Ende und einer *NotI*-Schnittstelle sowie einer 6x-Histidin-Markierung (6xHis) am 3'-Ende. Das resultierende PCR-Produkt wurde zur Klonierung des Vektors pEF-IRESp-F8A3 verwendet.

#### FVIII C1 FOR

5'-gctgagctcgagctgggaatggcttctggacacattag-3'

#### FVIII C1 6xHis REV

5'-gctaaggcggcccctagtggtggatggatgatttaaacacagccatcaa-3'

- PCR-Oligonukleotide zur Amplifikation der für die C1-Domäne von FVIII kodierenden cDNA Sequenz aus pSP64-FVIII unter Einführung einer *XhoI*-Restriktionsschnittstelle am 5'-Ende und einer *NotI*-Schnittstelle sowie einer 6x-Histidin-Markierung (6xHis) am 3'-Ende. Das resultierende PCR-Produkt wurde zur Klonierung des Vektors pEF-IRESp-F8C1 verwendet.

#### FVIII C2 FOR

5'-gctaagctcgagagttgcagcatgccattgggaatggagag-3'

#### FVIII C2 6xHis REV

5'-gctacggcggcccctagtgatggatggatggatggcctgtgaatcgagcccag-3'

- PCR-Oligonukleotide zur Amplifikation der für die C2-Domäne von FVIII kodierenden cDNA Sequenz aus pSP64-FVIII unter Einführung einer *XhoI*-Restriktionsschnittstelle am 5'-Ende und einer *NotI*-Schnittstelle sowie einer 6x-Histidin-Markierung (6xHis) am 3'-Ende. Das resultierende PCR-Produkt wurde zur Klonierung des Vektors pEF-IRESp-F8C2 verwendet.

## 12C6 FOR

5'-gatctaaccctgggagaacatgatggaccgacagccagt-3'

## 12C6 REV

5'-ccggactggctgtcgcggtccatcatgttctccacggggta-3'

- Oligonukleotide zur Herstellung von dsDNA kodierend für das Peptid 12C6. Nach Phosphorylierung und Hybridisierung wird die DNA über die Restriktionsschnittstellen *Bgl*III am 5'-Ende und *Bsp*EI am 3'-Ende in den Vektor pEF-IRESp-C4bp<sub>α</sub> kloniert.

## 12C6A FOR

5'-gatetgcccgcgcccaacatgatggaccgacagccagt-3'

## 12C6A REV

5'-ccggactggctgtcgcggtccatcatgttgccggcggcgca-3'

- Oligonukleotide zur Herstellung von dsDNA kodierend für das Peptid 12C6A. Nach Phosphorylierung und Hybridisierung wird die DNA über die Restriktionsschnittstellen *Bgl*III am 5'-Ende und *Bsp*EI am 3'-Ende in den Vektor pEF-IRESp-C4bp<sub>α</sub> kloniert.

## 12H10 FOR

5'-gatctcaatctccttggcagacctggtcaccagggcctgt-3'

## 12H10 REV

5'-ccggacagggcctggtgaaccaggtctgccaaggagattga-3'

- Oligonukleotide zur Herstellung von dsDNA kodierend für das Peptid 12H10. Nach Phosphorylierung und Hybridisierung wird die DNA über die Restriktionsschnittstellen *Bgl*III am 5'-Ende und *Bsp*EI am 3'-Ende in den Vektor pEF-IRESp-C4bp<sub>α</sub> kloniert.

## 12H10A FOR

5'-gatct caatctcctgccgcccgccttcaccagggcctgt-3'

## 12H10A REV

5'-ccggacagggcctggtgaaggcggcggcggcaggagattg a-3'

- Oligonukleotide zur Herstellung von dsDNA kodierend für das Peptid 12H10A. Nach Phosphorylierung und Hybridisierung wird die DNA über die Restriktionsschnittstellen *Bgl*III am 5'-Ende und *Bsp*EI am 3'-Ende in den Vektor pEF-IRESp-C4bp<sub>α</sub> kloniert.

## p107 FOR

5'-gatcttgccacgctggtccaaccgcccacactgct-3'

## p107 REV

5'-ccggagcaggtgctggcggttgaccaggcgtggcaa-3'

- Oligonukleotide zur Herstellung von dsDNA kodierend für das Peptid p107. Nach Phosphorylierung und Hybridisierung wird die DNA über die Restriktionsschnittstellen *Bgl*III am 5'-Ende und *Bsp*EI am 3'-Ende in den Vektor pEF-IRESp-C4bp<sub>α</sub> kloniert.

## C FOR

5'-gatctagcggaggcggaggcagcggaggcggaggcagcggat-3'

## C REV

5'-ccggatccgctgcctccgctccgctgcctccgctccgcta-3'

- Oligonukleotide zur Herstellung von dsDNA kodierend für das Kontrollpeptid C. Nach Phosphorylierung und Hybridisierung wird die DNA über die Restriktionsschnittstellen *Bgl*III am 5'-Ende und *Bsp*EI am 3'-Ende in den Vektor pEF-IRESp-C4bp<sub>α</sub> kloniert.

## pEF-IRESp-Seq

5'-actcccagttcaattacag-3'

- Oligonukleotid zur Ansequenzierung des in pEF-IRESp insertierten DNA-Bereichs aus Richtung des Signalpeptides.

## CpG ODN 2006

5'-tcgtcgttttgctgttttgctgtt-3'

- Oligonukleotid zur Stimulierung von B-Zellen über TLR-9. Die einzelnen Nukleotide sind über Phosphorothioat-Bindungen verbunden, was die Stabilität des Oligonukleotids sowie die Aufnahme in die Zellen verbessert (Hartmann *et al.*, 2000).

**2.1.9 Synthetische Peptide**

12C6: NH<sub>2</sub>-NPVENMMDRDSQSGGGSHHHHHH-COOH

- Synthetisches Peptid korrespondierend zu einem phagenpräsentierten Peptid aus dem Phage Display-Screening des Plasmas von Patient 1. Das Peptid ist durch den Spacer – SG<sub>3</sub>S- von einer 6x-Histidin-Markierung getrennt.

12C6I: NH<sub>2</sub>-NPIENMMDRDSQSGGGSHHHHHH-COOH

- Eine Variante von Peptid 12C6 mit einem Austausch des Valins gegen Isoleucin (V3I).

12C6A: NH<sub>2</sub>-AAAANMMDRDSQSGGGSHHHHHH-COOH

- Austausch des NPVE-Motivs in Peptid 12C6 gegen Alanine.

12C6, *Alanine Scan*

- In Peptid 12C6 wurde jede Aminosäure einzeln gegen Alanin ausgetauscht. Die daraus resultierenden 12 Peptide sind hier nicht einzeln aufgelistet.

12H10: NH<sub>2</sub>-QSPWQTFTRALSGGGSHHHHHH-COOH

- Synthetisches Peptid korrespondierend zu einem phagenpräsentierten Peptid aus dem Phage Display-Screening des Plasmas von Patient 2. Das Peptid ist durch den Spacer –SG<sub>3</sub>S- von einer 6x-Histidin-Markierung getrennt.

12H10A: NH<sub>2</sub>-QSPAAAFTRALSGGGSHHHHHH-COOH

- Austausch des WQTW-Motivs in Peptid 12H10 gegen Alanine.

12H10, *Alanine Scan*

- In Peptid 12H10 wurde jede Aminosäure einzeln gegen Alanin ausgetauscht. Die daraus resultierenden 12 Peptide sind hier nicht einzeln aufgelistet.

p107: NH<sub>2</sub>-CHAWSNRRTCSGGGSHHHHHH-COOH

- Synthetisches Peptid (Villard *et al.*, 2003) mit Spezifität für den monoklonalen Antikörper BO2C11, welcher an die C2-Domäne von FVIII bindet. Das Peptid ist durch den Spacer –SG<sub>3</sub>S- von einer 6x-Histidin-Markierung getrennt.

C: NH<sub>2</sub>-SGGGSGGGSGSGGGSHHHHHH-COOH

- Synthetisches Kontroll-Peptid, welches durch den Spacer –SG<sub>3</sub>S- von einer 6x-Histidin-Markierung getrennt ist.

12C6-K: NH<sub>2</sub>-NPVENMMDRDSQSGGKLAKLAKLAKLAK-COOH

- Synthetisches Peptid 12C6, welches an ein aus D-Aminosäuren (*kursiv*) bestehendes, proapoptotisches Peptid (Ellerby *et al.*, 1999) fusioniert wurde.

C-K: NH<sub>2</sub>-SGGGGSGGGGSGSGGKLA~~KLAK~~LA~~KLAK~~-COOH

- Synthetisches Kontroll-Peptid, welches an ein aus D-Aminosäuren (*kursiv*) bestehendes, proapoptotisches Peptid (Ellerby *et al.*, 1999) fusioniert wurde.

### 2.1.10 Bakterienstämme

*E. coli* ER2738

F' *proA*<sup>+</sup>*B*<sup>+</sup> *lacI*<sup>f</sup>  $\Delta$ (*lacZ*)*M15* *zzf::Tn10*(Tet<sup>R</sup>)/*fhuA2 glnV*  $\Delta$ (*lac-proAB*) *thi-1*  $\Delta$ (*hsdS-mcrB*)5

*E. coli* TOP10

F- *mcrA*  $\Delta$ (*mrr-hsdRMS-mcrBC*)  $\phi$ 80*lacZ* $\Delta$ *M15*  $\Delta$ *lacX74 deoR nupG recA1 araD139*  $\Delta$ (*ara-leu*)7697 *galU galK rpsL*(Str<sup>R</sup>) *endA1*  $\lambda$

### 2.11 Zelllinien

Bezeichnung	Beschreibung / Verwendungszweck	Referenz
293T	Humane, embryonale Nierenepithelzellen. 293T-Zellen sind ein Derivat von HEK293-Zellen, welche zusätzlich das große T-Antigen des Simian Virus 40 (SV40) enthalten. Dies ermöglicht eine Amplifikation von Vektoren mit diesem Replikationsursprung.	Numa <i>et al.</i> , 1995
293T-F8A1	Mit dem Vektor pEF-IRESp-F8A1 stabil transfizierte 293T-Zellen zur Expression der A1-Domäne von FVIII	Diese Arbeit
293T-F8A2	Mit dem Vektor pEF-IRESp-F8A2 stabil transfizierte 293T-Zellen zur Expression der A2-Domäne von FVIII	Diese Arbeit
293T-F8A3	Mit dem Vektor pEF-IRESp-F8A3 stabil transfizierte 293T-Zellen zur Expression der A3-Domäne von FVIII	Diese Arbeit
293T-F8C1	Mit dem Vektor pEF-IRESp-F8C1 stabil transfizierte 293T-Zellen zur Expression der C1-Domäne von FVIII	Diese Arbeit
293T-F8C2	Mit dem Vektor pEF-IRESp-F8C2 stabil transfizierte 293T-Zellen zur Expression der C2-Domäne von FVIII	Diese Arbeit
293T-12C6 <sub>M</sub>	Mit dem Vektor pEF-IRESp-C4bp <sub>α</sub> -12C6 stabil transfizierte 293T-Zellen zur Expression von multimerem 12C6 (12C6 <sub>M</sub> )	Diese Arbeit
293T-12C6A <sub>M</sub>	Mit dem Vektor pEF-IRESp-C4bp <sub>α</sub> -12C6 stabil transfizierte 293T-Zellen zur Expression von multimerem 12C6A (12C6A <sub>M</sub> )	Diese Arbeit
293T-12H10 <sub>M</sub>	Mit dem Vektor pEF-IRESp-C4bp <sub>α</sub> -12H10 stabil transfizierte 293T-Zellen zur Expression von multimerem 12H10 (12H10 <sub>M</sub> )	Diese Arbeit

<b>Bezeichnung</b>	<b>Beschreibung / Verwendungszweck</b>	<b>Referenz</b>
293T-12H10 <sub>M</sub>	Mit dem Vektor pEF-IRESp-C4bp <sub>α</sub> -12C6 stabil transfizierte 293T-Zellen zur Expression von multimerem 12H10A (12H10A <sub>M</sub> )	Diese Arbeit
293T-p107 <sub>M</sub>	Mit dem Vektor pEF-IRESp-C4bp <sub>α</sub> -p107 stabil transfizierte 293T-Zellen zur Expression von multimerem p107 (p107 <sub>M</sub> )	Diese Arbeit
293T-C <sub>M</sub>	Mit dem Vektor pEF-IRESp-C4bp <sub>α</sub> -C stabil transfizierte 293T-Zellen zur Expression von multimerem Kontrollpeptid C (C <sub>M</sub> )	Diese Arbeit
293T-12C6/12H10 <sub>M</sub>	Mit dem Vektor pEF-IRESp-C4bp <sub>α</sub> -12C6 und pEF-IRESp-C4bp <sub>α</sub> -12H10 stabil cotransfizierte 293T-Zellen zur Expression des 12C6/12H10-Heteromultimers (12C6 <sub>M</sub> /12H10 <sub>M</sub> )	Diese Arbeit

## 2.12 PDB-Dateien

<b>PDB-Datei</b>	<b>Quelle</b>
3CDZ, FVIII Kristallstruktur	Ngo <i>et al.</i> , 2008 <a href="http://www.rcsb.org/pdb/explore/explore.do?structureId=3CDZ">http://www.rcsb.org/pdb/explore/explore.do?structureId=3CDZ</a>
C4bp <sub>α</sub> -12C6	Diese Arbeit, <i>de novo</i> Struktur gemäß Protinfo Structure Prediction Server
C4bp <sub>α</sub> -12C6A	Diese Arbeit, <i>de novo</i> Struktur gemäß Protinfo Structure Prediction Server
C4bp <sub>α</sub> -12H10	Diese Arbeit, <i>de novo</i> Struktur gemäß Protinfo Structure Prediction Server
C4bp <sub>α</sub> -12H10A	Diese Arbeit, <i>de novo</i> Struktur gemäß Protinfo Structure Prediction Server
C4bp <sub>α</sub> -p107	Diese Arbeit, <i>de novo</i> Struktur gemäß Protinfo Structure Prediction Server
7x C4bp <sub>α</sub> -12C6	Diese Arbeit, <i>de novo</i> Struktur gemäß ClusPro-Docking Server
7x C4bp <sub>α</sub> -12H10	Diese Arbeit, <i>de novo</i> Struktur gemäß ClusPro-Docking Server
2x C4bp <sub>α</sub> -12H10	Diese Arbeit, <i>de novo</i> Struktur gemäß ClusPro-Docking Server
C4bp <sub>α</sub> -12C6 / C4bp <sub>α</sub> -12H10	Diese Arbeit, <i>de novo</i> Struktur gemäß ClusPro-Docking Server

## 2.2 Methoden

### 2.2.1 Patienten

In dieser Arbeit wurde mit Plasma und Zellen von 16 HA-Patienten gearbeitet, von welchen 15 (1-15) Inhibitor-positiv waren. Zur Erreichung der gesetzten Ziel wurde sich jedoch primär auf zwei Patienten (1 und 2) beschränkt. Eine HA wurde im Fall von Patient 1 im ersten Lebensjahr festgestellt. Inhibitoren wurden erstmals 20 Tage nach Erstexposition von FVIII diagnostiziert. Der Inhibitortiter lag in der Spitze bei 1562 BE/ml. Diverse ITI-Versuche basierend auf dem Bonn- sowie Malmö-Protokoll scheiterten. Im Angesicht gravierender, lebensbedrohlicher Blutungen wurde ein neues Protokoll etabliert, welches eine Depletion der B-Zellen durch sieben Rituximab-Infusionen ( $375\text{mg}/\text{m}^2$ ) beinhaltete (Linde *et al.*, 2001). Im Fall von Patient 2 wurde eine HA erst mit 1.9 Jahren diagnostiziert. Nach Verabreichung eines rFVIII-Präparates war nach 3.75 Jahren erstmals inhibitorische Aktivität detektierbar. Der Inhibitortiter stieg unter Substitution mit pdFVIII in der Spitze bis auf 4500 BE/ml. In der Folge wurde der Patient auf eine aPPC (FEIBA)-Prophylaxe eingestellt.

#### 2.2.1.1 Inhibitor- sowie $\text{CD}20^+$ Zellverläufe

Die inhibitorische Aktivität in den einzelnen Plasmaproben der Patienten wurde mittels des Bethesda-Tests im Zuge der Routinediagnostik gemessen. Ebenso erfolgte die durchflußzytometrische Quantifizierung der  $\text{CD}20^+$ -Zellen im peripheren Blut von Patient 1 im Rahmen von Routinetests (FACSCalibur™).

#### 2.2.1.2 Gewinnung von Patientenplasmen

Zur Gewinnung von Plasma wurde Citratblut aus Routineanalysen fünfzehn Minuten bei 4000rpm zentrifugiert (Rottina 48R). Die obere Plasmafraktion wurde abgenommen und 30 Minuten bei  $56^\circ\text{C}$  im Wasserbad hitzeinaktiviert. Anschließend wurde das Plasma aliquotiert und bei  $-20^\circ\text{C}$  gelagert.

## 2.2.2 Arbeiten mit *Escherichia coli*

### 2.2.2.1 Kulturbedingungen von *E. coli*

Die *E. coli*-Stämme TOP10 und ER2738 wurde in LB-Medium kultiviert. Transformierte TOP10 *E. coli* wurden in Gegenwart von Antibiotikum kultiviert. Entsprechend dem verwendeten Resistenzgen wurde den Nährmedien bzw. Agarplatten Ampicillin (100µg/ml) zugesetzt. Zur Anzucht von *E. coli* ER2738 wurde LB-Medium bzw. Agarplatten mit Tetrazyklin (10µg/ml) verwendet.

### 2.2.2.2 Herstellung chemisch-kompetenter *E. coli*

Hierzu wurden Bakterien auf einer LB-Agarplatte vereinzelt und bei 37°C inkubiert (15h). Mit einem Einzelklon wurden 4ml LB-Medium angeimpft und bei 37°C auf einem Schüttler über Nacht inkubiert. Mit 1ml dieser Lösung wurden 400ml LB-Medium inokuliert und bei 37°C auf einem Schüttler inkubiert, bis die optische Dichte (OD<sub>600</sub>) des Mediums zwischen 0.4 und 0.6 lag. Anschließend wurde das Wachstum der Bakterien gestoppt, indem die Suspension auf Eis gekühlt wurde. Im nächsten Schritt wurden die Bakterien durch Zentrifugation pelletiert (10min, 6000rpm). Anschließend wurden sie in 100ml eiskaltem 50mM CaCl<sub>2</sub> resuspendiert und auf Eis inkubiert (15min). Die Zellen wurden dann wie oben beschrieben erneut pelletiert und in 20ml 50mM CaCl<sub>2</sub>/10% (v/v) Glycerin aufgenommen. Nach Inkubation (4h, 4°C) wurden die Bakterien à 200µl aliquotiert und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die Lagerung erfolgte bei -80°C.

### 2.2.2.3 Transformation chemisch-kompetenter *E. coli*

Für einen Transformationsansatz wurden 50µl chemisch-kompetenter Bakterien verwendet. Die Bakterien wurden auf Eis aufgetaut und dann mit der DNA eines Ligationsansatzes versetzt. Nachdem die Bakterien auf Eis inkubiert wurden (30min), erfolgte ein Hitzeschock bei 42°C (35sec). Anschließend wurden die Bakterien auf Eis abgekühlt (2min). Danach wurden sie in 500µl LB-Medium aufgenommen, im Schüttler inkubiert (1h, 37°C, 220rpm), anschließend auf Ampicillin-haltigen LB-Agarplatten ausplattiert und angezüchtet (über Nacht, 37°C).

#### 2.2.2.4 Anzucht von Einzelklonen (analytische Plasmidpräparation)

Am Folgetag der Transformation wurden mehrere Einzelkolonien von den LB-Agarplatten für weitere Analysen ausgewählt und in 2ml LB-Ampicillin-Medium für eine analytische Plasmid-Minipräparation angezüchtet.

#### 2.2.2.5 Anzucht von Einzelklonen (präparative Plasmidpräparation)

Für eine präparative Plasmidpräparation wurden 30ml Ampicillin-haltiges LB-Medium mit jeweils einem Einzelklon angeimpft und im Schüttler angezüchtet (über Nacht, 37°C, 220rpm).

#### 2.2.2.6 *E. coli* ER2738 Vorkultur

Von dem *E.coli*-Stamm ER2738 wurde auf einer LB-Agarplatte mit 100µg/ml Tetrazyklin ein Vereinzelausstrich angefertigt und im Brutschrank inkubiert (37°C, über Nacht). Am Folgetag wurde LB-Medium (100µg/ml Tetrazyklin) mit einer einzelnen Kolonie angeimpft und im Schüttler inkubiert (über Nacht, 37°C, 220rpm).

#### 2.2.2.7 Lagerung von *E. coli*

Um die Bakterien dauerhaft zu lagern wurden Glyzerinstocks angelegt. Hierfür wurden die Zellen in 200ml Ampicillin-haltigem LB-Medium über Nacht bei 37°C auf einem Schüttler inkubiert. Die Bakterien wurden pelletiert (10min, 6000rpm), der Überstand verworfen und die Bakterien im Restmedium resuspendiert. Die Suspension wurde mit derselben Menge 80% (v/v) Glyzerin gemischt und bei -80°C gelagert.

### 2.2.3 Arbeiten mit Bakteriophagen

#### 2.2.3.1 Phage Display-Selektion (Biopanning)

Für das Biopanning wurden paramagnetische Kügelchen (*Beads*) mit einem biotinylierten Ziege anti-Human IgG (Fc<sub>γ</sub>-spezifisch) beschichtet. Für ein Biopanning wurden 100µl beschichtete Beads benötigt (20µl je Selektionsschritt). Je Plasmaprobe wurden sechs unabhängige Biopannings durchgeführt. Zur Beschichtung wurden die Beads zunächst dreimal in 500µl Biopanning Puffer A gewaschen. Je 100µl Beads wurden 5µg Antikörper zugegeben (entspricht 100% Überschuss gegenüber der maximalen Bindekapazität) und in einem Endvolumen von 500µl Puffer A unter Rotation (MACSmix) inkubiert (über Nacht,

4°C). Am Folgetag wurden die Beads fünfmal in 500µl Puffer A gewaschen und anschließend im Ursprungsvolumen mit Puffer A resuspendiert. Vor jedem Selektionsschritt wurde sowohl die benötigte Menge Beads als auch das verwendete 2ml Reaktionsgefäß in einem Endvolumen von 500µl Puffer B geblockt (MACSmix, 30min, RT). Die korrekte Bindung von anti-Human IgG Antikörpers an die Beads wurde mittels einem FITC-markierten Kaninchen anti-Ziege Antikörper im Fluoreszenzmikroskop exemplarisch überprüft.

Die Anreicherung spezifischer Phagen für anti-FVIII Antikörper erfolgte über verschiedene, sich wiederholende Selektionsschritte mit der Phage Display-Methode. Für die positive Selektion wurden die Plasmaproben der zu untersuchenden Patienten verwendet, für die negative Selektion eine Mischung (1:1) aus Plasma eines gesunden Spenders sowie einem polyklonalen Immunglobulinpräparat (Beriglobin®). Ein komplettes Screening (Biopanning) einer phagenpräsentierten Peptidbibliothek gegen das Zielprotein umfasste drei positive Selektionen, zwei negative Selektionen sowie zwei Amplifikationen.

Für die durchzuführenden Biopannings wurden die zuvor beschichteten paramagnetischen Beads verwendet. Für die erste positive Selektion wurde je Elutionstechnik (pH-shift oder Kompetition mit FVIII) für jede der drei verwendeten Phagenbibliotheken (Ph.D.<sup>TM</sup>-7, Ph.D.<sup>TM</sup>-C7C, Ph.D.<sup>TM</sup>-12) ein eigener Ansatz vorbereitet. Je 20µl der beschichteten und geblockten Beads wurden auf sechs 2ml Reaktionsgefäße verteilt. Je Ansatz wurden die Beads mit 5µl Patientenplasma, 50µl Biopanning Puffer C und 445µl ddH<sub>2</sub>O rotiert (60min, RT, MACSmix). Im Anschluss wurden die Beads fünfmal mit Puffer A gewaschen. Je Ansatz wurden 10µl der Originalphagenbibliothek sowie 50µl Puffer C und 440µl dH<sub>2</sub>O zugegeben und inkubiert (über Nacht, 4°C, MACSmix).

Am Folgetag wurden die Überstände verworfen und die Beads zehnmal mit je 500µl Puffer A gewaschen. Je Ansatz wurden die gebundenen Phagen anschließend mittels pH-shift oder Kompetition mit FVIII eluiert. Für die Elution mittels pH-shift wurde je Ansatz ein 2ml Reaktionsgefäß mit 15µl Neutralisationspuffer vorbereitet. Die Beads wurden in je 100µl Elutionspuffer fünf Minuten bei Raumtemperatur und Rotation inkubiert. Der Überstand wurde abgenommen und sofort in die vorbereiteten Reaktionsgefäße mit Neutralisationspuffer überführt. Für die kompetitive Elution der gebundenen Phagen mittels hochdosiertem FVIII wurden je Ansatz 5µl FVIII (1000 IE/ml) sowie 20µl Puffer C und 175µl dH<sub>2</sub>O zugegeben und inkubiert (30min, RT, MACSmix). Die zugegebene Menge an FVIII-Molekülen ( $10^{15}$ ) entspricht einem 100fachen Überschuss gegenüber den theoretisch vorhandenen Antigenbindungsstellen aller plasmatischen Antikörper auf den Beads ( $2 \cdot 10^{13}$ ). Im Anschluss

wurden die Überstände abgenommen und ebenso wie die Eluate aus der pH-shift-Elution bei 4°C gelagert.

Für die negative Selektion wurden paramagnetische Beads wie bereits beschrieben beschichtet. Je 20µl der Beads wurden mit je 100µl der Eluate aus der pH-Elution bzw. sowie 50µl Puffer C und 350µl ddH<sub>2</sub>O inkubiert. Von den Eluatzen der kompetitiven Selektion wurden je 190µl sowie 31µl Puffer C und 279µl ddH<sub>2</sub>O mit den beschichteten Beads gemischt und inkubiert (über Nacht, 4°C, MACSmix).

Am Folgetag wurden die Überstände abgenommen und bei 4°C gelagert. Zur Amplifikation der Phagen wurde eine Übernachtskultur von *E. coli* ER2738 1:100 verdünnt und je 495µl der Selektionsansätze wurden mit je 25ml der verdünnten Vorkultur anschließend im Schüttler inkubiert (5min, RT dann 4.5h, 37°C). Anschließend wurden die Kulturen in 50ml Röhrchen überführt und die Bakterien pelletiert (10min, 6000rpm). Die Überstände wurden in neue 50ml Röhrchen überführt und die verbliebenen Bakterien erneut abzentrifugiert. Die Überstände wurden erneut in neue 50ml Röhrchen überführt und mit ¼ des Volumens 50%PEG/5M NaCl gemischt. Die Phagen wurden über Nacht bei 4°C ausgefällt.

Am Folgetag wurden die ausgefällten Phagen pelletiert (15min, 4°C, 13000rpm). Die Überstände wurden vollständig abgenommen und verworfen. Die Phagenpellets wurden in 1.5ml 1xPBS resuspendiert und die Phagensuspensionen anschließend in 2ml Reaktionsgefäße überführt. Durch erneute Zentrifugation (3min, 13000rpm) wurden restliche Bakterien pelletiert. Der Überstände wurden in neuen 2ml Reaktionsgefäß mit je 500µl 50%PEG/5M NaCl gemischt und die Ansätze inkubiert (1h, auf Eis). Die ausgefallenen Phagen wurden pelletiert (15min, 13000rpm). Die Überstände wurden verworfen und die Phagenpellets in je 200µl Phagen-Lagerungspuffer resuspendiert und bei 4°C aufbewahrt.

In der folgenden zweiten positiven Selektion wurden mit Patientenplasma beschichtete Beads mit je 100µl der amplifizierten Phagen sowie 50µl Puffer C und 350µl ddH<sub>2</sub>O gemischt und wie beschrieben inkubiert. Elution, zweite negative Selektion sowie zweite Amplifikation wurden analog zu den beschriebenen Vorgängen durchgeführt. In die dritte positive Selektion wurden wiederholt 100µl Phagen aus der zweiten Amplifikation eingesetzt. Die in den Eluatzen der dritten positiven Selektion enthaltenen Phagen wurden vereinzelt (getitert).

#### 2.2.3.2 Vereinzlung von Phagen (Titern)

Zur weiteren Analyse in einem ELISA-Format wurden die selektionierten Phagen vereinzelt (getitert). Hierzu wurden je 200µl einer *E. coli* ER2738 Übernachtskultur mit je 10µl einer Verdünnungsreihe ( $10^{-2}$  bis  $10^{-5}$ ) des Eluats nach der dritten positiven Selektion fünf Minuten

bei Raumtemperatur inkubiert. 210µl der infizierten Bakterienkultur wurden mit je 3ml 45°C warmen Topagar, welcher zuvor mit 20µl Xgal und 15µl IPTG versetzt wurde, untergemischt und der Topagar auf einen vorgewärmte (37°C) LB-Platte ausgegossen. Nach dem Erkalten des Topagars wurden die Platten invertiert und im Brutschrank inkubiert (über Nacht, 37°C). Am Folgetag waren die durch einzelne Phagenklone infizierten Bakterien als blaue Plaques auf der Platte erkennbar. Diese konnten zur Bestimmung des Phagentiters (*plaque forming units*, pfu/ml) gezählt werden.

### 2.2.3.3 Anzucht von Einzelklonen

Zur Analyse der vereinzelt Phagenklone wurde diese in 96-Loch-Kulturplatten amplifiziert. Hierzu wurden je Phagenbibliothek und Elutionstechnik je 200µl LB-Medium in die Vertiefungen einer 96-Loch-Platte (Masterplate) vorgelegt. Einzelne blaue Plaques (siehe 2.2.3.2) wurden mittels einer sterilen Pipettenspitze ausgestochen und diese in eine Mediumbefüllte Vertiefung der jeweiligen 96-Loch-Platte überführt. Je Phagenbibliothek und Elutionstechnik wurden auf diese Weise 96 einzelne Klone gepickt. Die Platten wurden anschließend (nicht luftdicht) abgedeckt und im Schüttler inkubiert (über Nacht, 30°C, 150rpm). Am Folgetag wurden die gewachsenen Bakterien in den Platten pelletiert (10min, 2000rpm). Die Überstände wurden in den Phagen ELISA eingesetzt. Die Masterplates wurden luftdicht verschlossen und zur erneuten Anzucht von Phagen bis zu einer Woche bei 4°C gelagert.

Anzucht von Phagen in größerem Maßstab erfolgte analog zu den beschriebenen Amplifikationen im Zuge der Biopannings. Zur weiteren Analyse positiver Klone aus dem Phagen-ELISA (siehe 2.2.5.2) wurden die mit diesen Klonen infizierten Bakterien aus der Masterplate resuspendiert und 50µl in 10ml Röhrchen mit jeweils 2ml LB-Medium überführt und diese auf dem Schüttler inkubiert (5h, 37°C, 225rpm). Anschließend wurden die Kulturen in 2ml Reaktionsgefäße überführt und die Bakterien pelletiert (5min, 4°C, 13000rpm). 1.8ml des Überstands wurden in ein neues 2ml Reaktionsgefäß transferiert und verbliebenen Bakterien erneut wie beschrieben pelletiert. Im Anschluss wurden 1.6ml des Überstands mit je ¼ des Gesamtvolumens 50%PEG/5M NaCl gemischt und die Phagen ausgefällt (1h, auf Eis). Die ausgefällten Phagen pelletiert (15min, 4°C, 13000rpm). Der Überstand wurde verworfen und das Phagenpellet in 200µl Lagerungspuffer resuspendiert. Die so generierten Phagenstocks wurden bei 4°C gelagert.

#### 2.2.3.4 Konzentrationsbestimmung von Phagen

Die Konzentrationsbestimmung von Phage erfolgte außer durch das bereits beschriebene, zeitaufwendige Titern auch photometrisch (Bio Rad Smartspec 3000). Die Phagen wurden zuvor zweimal mit 50%PEG/5MNaCl gefällt. Diese wurde in 700µl 1xPBS 1:100 verdünnt und in einer 10mm Quarzküvette einem Absorptionsscan von 240nm bis 320nm unterzogen. Die regionalen Peaks bei  $A_{269}$  und  $A_{320}$  wurden verwendet um einen korrigierten Absorptionswert ( $A_{269}^*$ ) für die Formel zu errechnen:  $A_{269}^* = A_{269} - A_{320}$

Daraus ergibt sich:  $Phagenpartikel/ml = \frac{A_{269}^* \cdot 6 \cdot 10^{16}}{7223}$

### 2.2.4 Molekularbiologische Methoden

#### 2.2.4.1 Analytische Plasmidpräparation

Eine Plasmidpräparation im analytischen Maßstab erfolgte mithilfe des E.Z.N.A. Plasmid Miniprep Kit gemäß dem High Copy Protokoll des Herstellers

#### 2.2.4.2 Präparative Plasmidpräparation

Eine Plasmidpräparation im präparativen Maßstab erfolgte mithilfe des Nucleobond® PC100 AX Kit gemäß dem High Copy Protokoll des Herstellers.

#### 2.2.4.3 Gelelektrophorese von DNA

Zur Überprüfung von Restriktionen und zur Präparation von DNA-Fragmenten wurden diese auf Agarosegelen elektrophoretisch aufgetrennt. Zur Herstellung der Gele wurde Agarose in TAE-Puffer gelöst und in einem Mikrowellenofen erhitzt. Nachdem die Lösung auf ca. 50°C abgekühlt war, wurde sie in eine Flachbettform gegossen. Die DNA wurde durch Ethidiumbromid (4µl Stammlösung/100ml Gel) bei UV-Bestrahlung sichtbar gemacht. Vor dem Gellauf wurde die DNA-Proben mit 2µl 6xProbenpuffer gemischt und anschließend in die Geltaschen geladen. Der Gellauf erfolgte bei 100V.

#### 2.2.4.4 Isolierung und Reinigung von DNA-Fragmenten

Während der Klonierungen wurden die Vektor- und DNA-Inserts mit dem E.N.Z.A. Cycle pure Kit über eine Silicagematrix nach dem Protokoll des Herstellers aufgereinigt und in 25-50µl 65°C-warmen HPLC-H<sub>2</sub>O eluiert. Um spezifische DNA-Fragmente zu isolieren und für

nachfolgende Reaktionen zu verwenden, wurde der jeweilige Restriktionsverdau oder PCR-Ansatz auf einem Agarosegel aufgetrennt. Der Bereich des Agarosegels, welcher das gewünschte Fragment enthielt, wurde ausgeschnitten. Anschließend erfolgte die Aufreinigung der DNA mithilfe des E.Z.N.A. Gel Extraction Kits nach Angaben des Herstellers.

#### 2.2.4.5 Isolierung von ssDNA aus Phagen

Zur Isolierung von ssDNA zur Sequenzierung wurden 50µl der Einzelphagenpräparationen in ein neues 1.5ml Reaktionsgefäß überführt, mit 25µl Phenol-Chloroform gemischt und inkubiert (2min, RT). Die wässrige Phase mit der ssDNA wurde abgeschieden (15min, 4°C, 13000rpm). 40µl dieser oberen Phase wurden in ein neues 1.5ml Reaktionsgefäß überführt und mit 90µl eiskaltem, reinen Ethanol sowie 4µl 4M NaOAc gemischt. Zur Ausfällung der ssDNA wurden die Ansätze über Nacht bei -20°C belassen. Am Folgetag wurde die ssDNA pelletiert (15min, 4°C, 13000rpm). Die ssDNA-Pellets wurden in 200µl 70% Ethanol resuspendiert und erneut wie beschrieben pelletiert. Das überstehende Ethanol wurde vorsichtig abgenommen und die Pellets durch Zentrifugation unter Vakuum getrocknet. Die ssDNA-Pellets wurden in 20µl ddH<sub>2</sub>O resuspendiert und bei -20°C gelagert.

#### 2.2.4.6 Sequenzierungen

Sequenzierungen erfolgten an einem ABI-PRISM 3100-Avant Genetic Analyzer mit fluoreszenzmarkierten dNTPs. Für eine Sequenzierung der Phagen-ssDNA zur Analyse der präsentierten Peptide wurden für einen PCR-Ansatz 4µl ssDNA, 1µl M13-96 Oligonukleotid, 10µl HPLC H<sub>2</sub>O, 2µl Premix und 3µl 5x Sequenzpuffer gemischt. Zur Aufreinigung wurden dem Ansatz anschließend 100µl ddH<sub>2</sub>O, 10µl 3M NaOAc, sowie 250µl absolutes Ethanol beigegeben. Die Amplifikate wurden pelletiert (15min, 15000rpm), in 250µl 70% Ethanol gewaschen und erneut wie beschrieben zentrifugiert. Der Überstände wurden verworfen, die Pellets getrocknet und in 20µl Formamid resuspendiert oder bis zur Sequenzierung bei -20°C gelagert. Für sonstige Sequenzierungen wurden ca. 0.5µg DNA mittels des pEF-IRESp-Seq Oligonukleotids (10µM/µl) versetzt.

#### PCR-Programm M13-ssDNA-Sequenzierung

96°C	10sec	} 25 Zyklen
45°C	5sec	
60°C	4min	

#### 2.2.4.7 Phosphorylierung von Oligonukleotiden

Die Phosphorylierung von Oligonukleotiden erfolgte nach dem aufgeführten Ansatz und Inkubation im Brutschrank (90min, 37°C.) Die phosphorylierten Oligonukleotide wurden bei -20°C gelagert.

Ansatz
2µl Oligonukleotid 1
2µl Oligonukleotid 2
2µl ATP
12µl ddH <sub>2</sub> O
2µl T4 PNK

#### 2.2.4.8 Hybridisierung von Oligonukleotiden

Zur Hybridisierung wurden äquimolare Mengen der phosphorylierten, komplementären Oligonukleotide in einem Ansatz in PCR-Puffer gemischt, im Heizblock drei Minuten auf 95°C erhitzt und anschließend über 1.5 Stunden auf Raumtemperatur abkühlen lassen

#### 2.2.4.9 PCR-Amplifikation einzelner FVIII-Domänen

Die einzelnen Domänen-kodierenden DNA-Abschnitte von pSP64-FVIII (2.1.7) wurden mit den unter Abschnitt 2.1.8 angegebenen Oligonukleotiden nach dem unten aufgeführten Protokoll PCR-amplifiziert. Über die eingesetzten Oligonukleotide wurden die Domänen-kodierenden DNA-Abschnitte mit den für die Klonierung relevanten Schnittstellen sowie der genetischen Information für eine C-terminale 6x-Histidin (6xHis)-Markierung versehen. Die PCR-Produkte wurden auf einem 1.5% Agarosegel aufgetrennt aufgereinigt.

PCR-Ansatz	PCR-Programm	
2µl Vektor pSP64-FVIII (1µg/µl)	95°C	3min
1µl Oligonukleotid 1 (10pmol/µl)	95°C	30sec
1µl Oligonukleotid 2 (10pmol/µl)	54°C	30sec
5µl <i>Pfu</i> -10x-Puffer	72°C	6min
2µl dNTPs (10mM)	72°C	8min
11µl ddH <sub>2</sub> O	} 25 Zyklen	
1µl <i>Pfu</i> -Polymerase		

#### 2.2.4.10 Umklonierung der Signalpeptid-DNA in 364H

Aufgrund der Restriktionsschnittstellen in der DNA der FVIII-Domänen-DNA wurde vor deren Klonierung der für das Signalpeptid kodierende DNA-Abschnitt im Vektor 364H (2.1.7) verschoben. Signalpeptid-dsDNA wurde durch Hybridisierung von zuvor phosphorylierten Oligonukleotiden (2.1.8) generiert. Der Vektor 364H wurde mit den

Restriktionsenzymen *XhoI* und *NheI* geschnitten, dephosphoryliert, und über ein 1.5%iges Agarosegel aufgetrennt. Die Bande mit dem verdauten Vektor wurde ausgeschnitten und die DNA aus dem Gel eluiert. Der Vektor wurde mit unterschiedlichen Konzentrationen der Signalpeptid-dsDNA in die Ligation eingesetzt. Die Ligationsansätze wurden in chemisch-kompetente *E.coli* TOP10 transformiert. Am Folgetag erfolgte eine analytische Plasmidpräparation gewachsener Klone, die Plasmid-DNA wurden mit den Restriktionsenzymen *NheI* und *XhoI* verdaut. Anschließend wurden die Ansätze auf einem 1.5%igen Agarosegel analysiert. DNA der in der Gelanalyse korrekten Klone wurden sequenziert. Von korrekten Klonen erfolgte eine präparative Plasmidpräparation. Ein Klon wurde für die Klonierung der PCR-Fragmente der einzelnen FVIII-Domänen ausgewählt (364H-S10).

<b>Verdau von 364H</b> 10µl Vektor 364H (1µg/µl) 2µl <i>XhoI</i> 2µl <i>NheI</i> 2µl 10xBSA 2µl Puffer 2 (NEB) 2µl ddH <sub>2</sub> O > 2h 37°C, 20min 65°C	<b>Ligation der Signalpeptid-dsDNA in 364H</b> 1µl Vektor 364H (1µg/µl) 1-3µl Signalpeptid dsDNA (10ng/µl) 4µl 10x T4 Ligase-Puffer 4µl 50% PEG 26-28µl ddH <sub>2</sub> O 1µl T4 Ligase > 2h 22°C, 10min 65°C
<b>Dephosphorylierung von 364H</b> + 3µl Antarctic Phosphatase Puffer + 4µl ddH <sub>2</sub> O + 3µl Antarctic Phosphatase > 2h 37°C, 5min 65°C	

#### 2.2.4.11 Klonierung der FVIII-Domänen

Der Vektor 364H-S10 als auch die PCR-Produkte wurden mit den Restriktionsenzymen *XhoI* und *NotI* geschnitten und aufgereinigt. Dadurch ging aus dem Vektor 364H-S10 der Vektor pEF-IRESp-S10 hervor. Der Vektor pEF-IRESp-S10 wurde wie beschrieben dephosphoryliert, mit den PCR-Produkten ligiert und in chemisch-kompetente *E.coli* TOP10 transformiert. 10µl DNA aus einer analytischen Plasmidpräparation wurden mit den Restriktionsenzymen *XhoI* und *NotI* verdaut und anschließend auf einem 1%igen Agarosegel aufgetrennt. Weitere 5µl DNA wurden sequenziert (pEF-IRESp-Seq). Von korrekten Klonen erfolgte eine präparative Plasmidpräparation.

Verdau PCR-Produkte / 364H-S10	Ligation der PCR-Produkte in pEF-IRESp-S10
30µl PCR-Produkt / 10µl Vektor 364H-S10 (1µg/µl)	1µl Vektor pEF-IRESp-S10 (1µg/µl)
1µl <i>XhoI</i>	1-3µl PCR-Produkt(10ng/µl)
1µl <i>NotI</i>	4µl 10x T4 Ligase-Puffer
4µl 10xBSA	4µl 50% PEG
4µl Puffer 3 (NEB)	26-28µl ddH <sub>2</sub> O
10µl ddH <sub>2</sub> O (nur 364H-S10-Verdau)	1µl T4 Ligase
> 2h 37°C, 20min 65°C	> 2h 22°C, 10min 65°C

#### 2.2.4.12 Fusion selektierter Peptidliganden an C4bp<sub>α</sub>

Für die Klonierung der Peptid-kodierenden DNA wurden zunächst entsprechende Oligonukleotide (2.1.8), welche für eine Proteinexpression in einem eukaryotischen System Codon-optimiert und von den Restriktionsschnittstellen *BglII* und *BspEI* flankiert wurden, phosphoryliert und anschließend hybridisiert. Die generierte dsDNA wurden dann in den Vektor 364HΔC46 kloniert. Hierzu wurde der Vektor 364H zunächst mit den Restriktionsenzymen *BglII* und *BspEI* geschnitten, dephosphoryliert, gelelektrophoretisch aufgetrennt und aufgereinigt. Dadurch wurde das C46-Insert entfernt und somit der Vektor 364HΔC46 generiert. Anschließend wurde der Vektor 364HΔC46 mit ansteigenden Konzentrationen der Peptid-DNA in die Ligation eingesetzt. Die Ligrationsansätze wurden in chemisch-kompetente *E. coli* TOP10 transformiert und gewachsene Klone für eine analytische Plasmidpräparation hochgezogen. Je 10µl der DNA aus der analytischen Plasmidpräparation wurden in einen Restriktionsverdau mit den Enzymen *XbaI* und *EcoRI* eingesetzt und gelelektrophoretisch aufgetrennt. Weitere 5µl der DNA wurden sequenziert. Von korrekten Klonen erfolgt eine präparative Plasmidpräparation.

Verdau von 364H	Ligation der Peptid-dsDNA in 364HΔC46
10µl Vektor 364H-S10 (1µg/µl)	1µl Vektor 364H (1µg/µl)
2µl <i>BglII</i>	1-5µl Peptid-dsDNA (10ng/µl)
2µl <i>BspEI</i>	4µl 10x T4 Ligase-Puffer
2µl Puffer 3 (NEB)	4µl 50% PEG
4µl ddH <sub>2</sub> O	26-28µl ddH <sub>2</sub> O
> 2h 37°C, 20min 80°C	1µl T4 Ligase
	> 2h 22°C, 10min 65°C

## 2.2.5 Proteinbiochemische Methoden

### 2.2.5.1 FVIII-spezifischer Subklassen-Verläufe

Zur Ermittlung der FVIII-spezifischen Subklassen-Verläufe wurden 4nM FVIII (Kogenate<sup>®</sup>) in den Vertiefungen einer 96-Loch-ELISA-Platte immobilisiert (über Nacht, 4°C). Am Folgetag wurde die Platte mit 1%BSA in 1xPBS geblockt (2h, 37°C) und anschließend mit 1:1000 Verdünnungen der zu testenden Plasmaproben in Triplikaten inkubiert (2h, 37°C). Die Platte wurde im ELISA-Washer mit 300µl ELISA-Waschpuffer je Vertiefung gewaschen und anschließend mit 1:2000 Verdünnungen der biotinylierten anti-Human IgG<sub>1-4</sub> Antikörpern inkubiert (über Nacht, 4°C). Am Folgetag wurde die Platte wie beschrieben gewaschen und im Anschluss mit einer 1:5000-Verdünnung von Streptavidin-HRP in 1xPBS inkubiert (2h, 37°C). Nach erneutem Waschen wurden die Platten durch Zugabe von 100µl OPD-Lösung je Vertiefung und siebenminütiger Inkubation im Dunkeln entwickelt. Die Farbumschlagsreaktion wurde anschließend durch Zugabe von 100µl 0.5M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> gestoppt. Die Auswertung des ELISAs erfolgte mittels ELISA-Readers bei 495nm (Absorption von OPD) und 620nm (Referenzwellenlänge) Die Konzentrationen der im Plasma enthaltenen FVIII-spezifischen IgG-Subklassen wurde jeweils mittels Eichgeraden mit humanem IgG<sub>1-4</sub> bestimmt.

### 2.2.5.2 Bestimmung der FVIII-Konzentration für eine kompetitive Elution

Mit Patientenplasma beschichtete Beads (20µl/Ansatz) wurden mit Phagen ( $10^9$  pfu/µl) aus der zweiten Amplifikation inkubiert (über Nacht, 4°C). Am Folgetag wurden die Beads wie beschreiben gewaschen und es erfolgte eine kompetitive Elution mit FVIII- bzw. FIX- (Mononine<sup>®</sup>) Konzentrationen von 0-240nM. Eine ELISA-Platte wurde mit den Eluaten beschichtet (über Nacht, 4°C), gewaschen und mit ELISA-Blockpuffer geblockt (2h, 37°C). Der Blockpuffer wurde dekantiert und die Die Detektion gebundener Phagen erfolgte mittels 100µl/Loch einer 1:5000 Verdünnung eines Meerrettichperoxidase (HRP)-markierten Maus anti-M13-Antikörpers. Die Platten wurden inkubiert (2h, 37°C), gewaschen, entwickelt und mittels eines ELISA-Readers ausgelesen.

### 2.2.5.3 ELISA mit Phagenpopulationen aus einzelnen Selektionsschritten

Die Phagenkonzentration in der Phagenbibliothek sowie den einzelnen Elutionen wurde wie beschreiben photometrisch bestimmt. Eine ELISA-Platte wurde mit identische Phagenkonzentrationen je Vertiefung ( $10^9/100\mu\text{l}$ ) beschichtet (über Nacht, 4°C). Am

Folgetag wurde die Platte gewaschen, mit ELISA-Blockpuffer geblockt und Patientenplasma sowie Plasma eines gesunden Spenders in einer 1:1000 Verdünnung zugegeben und inkubiert (2h, 37°C). Die Platte wurde gewaschen und anschließend mit einer 1:5000 Verdünnung eines HRP-markierten Ziege anti-Human IgG Antikörpers inkubiert (2h, 37°C). Die Platte wurde gewaschen, entwickelt und ausgelesen.

#### 2.2.5.4 Phagen-ELISA

Im Phagen-ELISA wurden die vereinzelt Phagenklone auf ihre Spezifität für die anti-FVIII-Antikörper im jeweils verwendeten Patientenplasma getestet. Hierzu wurde je Masterplate eine 96-Loch-ELISA-Platte mit 100µl/Loch einer 1:1000 Verdünnung des jeweiligen Patientenplasmas und eine ELISA-Platte (Kontrolle) mit einer 1:1 Mischung bestehend aus einer 1:16000 Verdünnung von Beriglobin und einer 1:1000 Verdünnung des Plasmas eines gesunden Spenders beschichtet (über Nacht, 4°C). Auf diese Weise konnten gleichzeitig 95 Klone je Phagenbibliothek und Elutionstechnik auf ihre Spezifität für anti-FVIII-Antikörper getestet werden. In Vertiefung 96 (G12) wurde Wildtypphage als Kontrolle eingesetzt. Am Folgetag wurden die Platten gewaschen und mit ELISA-Blockpuffer geblockt (2h, 37°C). Der Blockpuffer wurde dekantiert und je Phagenklon wurden 30µl Überstand aus der Masterplate in die korrespondierenden Vertiefungen der mit Patientenplasma beschichteten ELISA-Platte und der Kontroll-ELISA-Platte überführt. Die Vertiefungen wurden anschließend mit LB-Medium auf 100µl aufgefüllt und die Platten inkubiert (über Nacht, 4°C). Am Folgetag wurden die Platten gewaschen. Die Detektion gebundener Phagen erfolgte mittels 100µl/Loch einer 1:5000 Verdünnung eines Meerrettichperoxidase (HRP)-markierten Maus anti-M13-Antikörpers. Die Platten wurden inkubiert (2h, 37°C), gewaschen, entwickelt und mittels eines ELISA-Readers ausgelesen.

#### 2.2.5.5 ELISA mit ausgewählten Phagenklonen

Ausgesuchte Phagenklone wurden für einen vergleichenden Phagen-ELISA im 50ml-Maßstab exprimiert, gefällt sowie deren Konzentration bestimmt. Ebenso wurde mit dem M13-Wildtyp-Phage verfahren. Die Vertiefungen einer 96-Loch-ELISA-Platte wurden je Klon in Triplikaten mit jeweils  $10^{11}/100/\mu\text{l}$  Phagenpartikeln beschichtet (über Nacht, 4°C). Die weitere Vorgehensweise erfolgte wie beschrieben (2.2.5.3).

#### 2.2.5.6 *Inhibitionstest mit ausgewählten Phagenklonen*

Um festzustellen ob ausgewählte Phagenklone aufgrund des exprimierten Peptides in der Lage sind, die Bindung von anti-FVIII Antikörpern im Patientenplasma an FVIII zu unterbinden, wurden diese zunächst im 200ml Format amplifiziert und anschließend wie beschrieben gefällt und quantifiziert. Eine 96-Loch-ELISA-Platte wurde mit 4nM rFVIII je Vertiefung beschichtet (über Nacht, 4°C) und am Folgetag zweimal mit Waschpuffer gewaschen, geblockt und anschließend erneut dreimal gewaschen. Eine 1:1000 Verdünnung von Patientenplasma wurde in Triplikaten mit ansteigenden Konzentrationen von Phagen vorinkubiert (1h, 37°C) und anschließend auf die FVIII-beschichtete Platte gegeben. Die Platte wurde inkubiert (2h, 37°C) und anschließend sechsmal gewaschen. Die Detektion der Bindung von anti-FVIII Antikörpern an FVIII erfolgt wie beschrieben. Der Prozentsatz der Inhibition der Bindung der anti-FVIII Antikörper an FVIII wurde im Verhältnis zu Ansätzen ohne Phagen errechnet.

#### 2.2.5.7 *Relative Konzentrationsangleichung exprimierter FVIII-Domänen*

Vor dem Einsatz der exprimierten FVIII-Domänen zur Epitopkartierung wurde deren korrekte Faltung durch die Bindung von domänenspezifischen, monoklonalen Antikörpern untersucht. Hierzu wurden die Vertiefungen einer 96-Loch-ELISA-Platte jeweils mit Kulturüberstand von 293T-F8A1, -F8A2, -F8A3, -F8C1 und -F8C2 beschichtet (über Nacht, 4°C). Als Negativkontrolle fungierte der Überstand einer nicht transfizierten 293T-Kultur. Die Platten wurden geblockt und anschließend mit einer 1:500 Verdünnung der unterschiedlichen monoklonalen Antikörper inkubiert (2h, 37°C). Dabei wurde jede Domäne in Triplikaten mit jeweils allen monoklonalen Antikörpern inkubiert. Die Platte wurde wie beschrieben im ELISA-Washer gewaschen und anschließend mit einer 1:1000 Verdünnung eines HRP-markierten Ziege anti-Maus IgG Antikörpers inkubiert (2h, 37°C). Im Anschluss wurde die Platte gewaschen, entwickelt und ausgelesen. Die Konzentrationen der im Kulturüberstand enthaltenen Domänen wurde jeweils mittels Eichgeraden mit rFVIII (Kogenate®) bestimmt.

#### 2.2.5.8 *Untersuchung der Domänenspezifität von Patienten-IgG*

Zur Untersuchung der Domänenspezifität von anti-FVIII Antikörpern in Patientenplasmen mittels ELISA wurden Kulturüberstände mit äquivalenten Konzentrationen an FVIII-Domänen eingesetzt und die Vertiefungen einer 96-Loch-ELISA-Platte mit diesen beschichtet (über Nacht, 4°C). Die Platte wurde geblockt und mit einer 1:100 Verdünnung des jeweiligen Patientenplasmas sowie Plasma eines gesunden Spenders inkubiert (2h, 37°C). Daraufhin

wurde die Platte gewaschen und eine 1:1000 Verdünnung eines HRP-markierten Ziege anti-Human IgG Antikörper zugegeben. Die Platte wurde inkubiert (2h, 37°C), gewaschen, entwickelt und ausgelesen.

#### *2.2.5.9 Untersuchung der Subklassenverteilung auf FVIII-Domänen*

Die Vertiefungen einer 96-Loch-ELISA-Platte wurden mit Kulturüberstände mit äquivalenten Konzentrationen an FVIII-Domänen beschichtet (über Nacht, 4°C). Die Platte wurde geblockt und mit einer 1:100 Verdünnung des jeweiligen Patientenplasmas sowie Plasma eines gesunden Spenders inkubiert (2h, 37°C). Daraufhin wurde die Platte gewaschen und die Detektion von IgG<sub>1</sub> und IgG<sub>4</sub> erfolgte wie in 2.2.5.1 beschrieben.

#### *2.2.5.10 ELISA mit synthetischen Peptiden*

Zur Immobilisierung synthetischer Peptide in den Vertiefungen einer 96-Loch-ELISA-Platte wurden diese zunächst mit einem Kaninchen anti-6xHis-Tag Antikörper (50ng/Vertiefung) beschichtet (über Nacht, 4°C). Die Platte wurde zweimal mit Waschpuffer gewaschen und geblockt. Die Peptide wurden in Konzentrationen von 10µg bis 1ng/Vertiefung zugegeben und die Platte inkubiert (1h, 37°C). Anschließend wurde die Platte gewaschen und Plasma in einer 1:1000 Verdünnung in 1% MPBST zugegeben. Die Platte inkubiert (2h, 37°C), gewaschen und die Bindung der Antikörper im Plasma wurde wie beschrieben detektiert.

#### *2.2.5.11 Inhibitionstest mit synthetischen Peptiden*

Die Austestung der Fähigkeit synthetischer Peptide die Bindung von anti-FVIII Antikörpern an FVIII zu blockieren erfolgt in einem ELISA-Format analog zur Inhibition mit Phagen.

#### *2.2.5.12 ELISA mit multimeren Proteinen*

Analog zu den ELISAs mit synthetischen Peptiden wurden die multimeren Proteine über die 6xHis-Markierung auf einer 96-Loch-ELISA-Platte immobilisiert. Die Platte wurde daher zunächst wie beschrieben mit einem Kaninchen anti-6xHis Antikörper (50ng/Vertiefung) beschichtet, gewaschen und geblockt. Anschließend wurde eine Verdünnungsreihe der Zellkulturüberstände in Triplikaten zugegeben und inkubiert (2h, 37°C). Anschließend wurde die Platte dreimal im ELISA-Washer gewaschen und Plasma in einer 1:1000 Verdünnung in 1% MPBST zugegeben. Die Platte wurde inkubiert (2h, 37°C), gewaschen und die Bindung der Antikörper im Plasma wurde wie beschrieben detektiert. ELISAs mit aufgereinigten Multimeren erfolgten analog.

#### *2.2.5.13 Inhibitionstest mit multimeren Proteinen*

Die Austestung der Fähigkeit aufgereinigter multimeren Proteinen die Bindung von anti-FVIII Antikörpern an FVIII zu blockieren erfolgt in einem ELISA-Format analog zur Inhibition mit Phagen.

#### *2.2.5.14 ELISA mit Überständen stimulierter Zellen*

Die Detektion von sekretiertem Gesamt-IgG, Tetanus-spezifischem IgG, sowie FVIII-spezifischem IgG durch stimulierte Zellen erfolgte mit unterschiedlichen Kulturüberstandsverdünnungen analog zur Detektion IgG-sekretierender Zellen im ELISPOT (2.2.6.12). Die relative IgG-Konzentration wurde mit einer IgG-Eichgerade (Behringlobin®) bestimmt.

#### *2.2.5.15 Bethesda-Test mit synthetischen Peptiden*

Die Fähigkeit der synthetischen Peptide die Funktion von FVIII im Patientenplasma wiederherzustellen wurde in einem Bethesda-Test ermittelt. Hierzu wurde das Citratplasma zunächst so verdünnt, das es in einem Bethesda-Test eine inhibitorische Aktivität von ca. einer Bethesda-Einheit (1 BE/ml) aufwies, was einer Restaktivität von FVIII von ca. 50% entsprach. Zu dem so verdünnten Plasma wurden unterschiedliche Konzentrationen der synthetischen Peptide gegeben und die Ansätze vorinkubiert (1h, 37°C). Anschließend wurden verschiedene Verdünnungen (unverdünnt, 1:2, 1:4, 1:8) der Ansätze 1:1 mit FVIII-haltigem Normalplasma (1 IE/ml) gemischt, im Wasserbad inkubiert (2h, 37°C) und die Koagulation photo-optisch detektiert (BCT®).

#### *2.2.5.16 Polyacrylamid Gelelektrophorese (PAGE)*

Zur Überprüfung der korrekten Expression der rekombinanten Proteine (FVIII-Domänen, Multimere) durch die selektionierten Einzelklone wurden Kulturüberstände und Zelllysate zunächst gelelektrophoretisch aufgetrennt. Zelllysate wurden von gleiche Zellzahlen mit RIPA Lysis Puffer nach Angaben des Herstellers generiert. Die Elektrophorese wurde mit einem 12%igen Trenngel und 4%igen Sammelgel nach Herstellerangaben durchgeführt (Mini-PROTEAN® 3). Zunächst wurden Zellkulturüberstände sowie Zelllysate durch Zugabe von 5µl reduzierendem Probenpuffer je Probe und anschließendem fünfminütigem Aufkochen vorbereitet. Zur Überprüfung der korrekten Expression der multimeren Peptide wurden Zellkulturüberstände sowie Zelllysate jeweils unter reduzierendem und nicht-reduzierendem Bedingungen analysiert. Die Taschen des Gels wurden mit den so vorbereiteten Proben

beladen und die Gelkammer mit Laufpuffer befüllt. Der Gellauf erfolgt bei 100V (Power Pac Basic).

#### 2.2.5.17 Western Blot

Für den anschließenden Western Blot wurden Gel, Nitrozellulose-Membran, Whatman-Papier und *Fiberpads* mit Transferpuffer getränkt. Der Transfer wurde nach dem *Semi-Dry* Verfahren durchgeführt (Mini-PROTEAN<sup>®</sup> 3). Die Proteine wurden auf die Nitrocellulose-Membran transferiert (1h, 4°C, 400mA). Im Anschluss wurde die Membran in Blockpuffer geblockt (1h, RT). Die Membran wurde in einer 1:1000 Verdünnung mit einem Kaninchen anti-6xHis Antikörper in 1% MPBST inkubiert (über Nacht, 4°C). Am Folgetag wurde die Membran dreimal für jeweils 20min in Waschpuffer gewaschen. Es folgt die Inkubation (1h, RT) der Membran mit einem HRP-markierten Ziege anti-Kaninchen Antikörper (1:2000 in 1% MPBST). Anschließend wurde die Membran wie beschrieben gewaschen und nach einem weiteren Waschschrift mit ddH<sub>2</sub>O mit ECL-Lösung auf einem ECL Plus Film entwickelt (ECL<sup>™</sup> Western Blotting System).

#### 2.2.5.18 Aufreinigung und Charakterisierung multimerer Proteine

Die Aufreinigung multimerer Proteine erfolgte aus 500ml Kulturüberstand mittels HisTrap<sup>™</sup> HP-Säulen über eine elektronische, peristaltische Pumpe. Die Kulturüberstände wurden zunächst über einen 0.45µm-Filter gefiltert. Die Säulen (HisTrap<sup>™</sup>) wurde mit 15ml Bindungs-Puffer gewaschen und der Proteingehalt von 1ml-Fractionen des Durchflusses photometrisch bestimmt (NanoDrop, OD<sub>280</sub>). Die Proteine wurden mit 6ml 0.5M Imidazol in 1ml-Fractionen eluiert. Der Proteingehalt der Fractionen wurde wie beschrieben ermittelt. Die Konzentration an 6xHis-markierten Proteinen in jeder Fraction wurde im ELISA mit Hilfe einer Eichgerade mit p53-6xHis bestimmt. Die Fractionen mit den höchsten Konzentrationen an 6x-HiS-markierten Proteinen wurden gepoolt über 48 Stunden gegen mehrere Wechsel 1xPBS dialysiert (Slide-A-Lyzer). Die Konzentration der aufgereinigten Multimere wurde anschließend erneut im ELISA bestimmt, sowie die absolute Proteinkonzentration photometrisch ermittelt (NanoDrop, OD<sub>280</sub>). Die aufgereinigten Proteine wurden aliquotiert und bei -20°C gelagert. Um den multimeren Charakter der aufgereinigten Multimere näher zu untersuchen wurden diese vor dem Gellauf mit einem β-Mercaptoethanol-Gradienten (0-5mM) in Probenpuffer inkubiert, gelelektrophoretisch aufgetrennt und im Western Blot detektiert.

### 2.2.5.19 Stabilitätstest mit multimeren Proteinen und Peptiden

Für einen vergleichenden Stabilitätstest von synthetischen Peptiden und multimeren Proteinen wurden äquivalente Konzentrationen von 12C6 und 12C6<sub>M</sub> in humanem Plasma und 1xPBS über sieben Tage bei 37°C inkubiert. An jedem Versuchstag wurde ein Aliquot bei -20°C gelagert. 10µl jedes Aliquots wurden mit 5µl nicht-reduzierendem Probenpuffer aufgeköcht, gelelektrophoretisch aufgetrennt und die 6xHis-markierten Multimere im Western Blot detektiert. Die Fähigkeit der Multimere zur Bindung von anti-FVIII Antikörpern im Patientenplasma im Vergleich zu den synthetischen Peptiden wurde im ELISA detektiert.

### 2.2.5.20 Markierung von FVIII mit Fluorescein-5-isothiocyanat

Für die Anfärbung von FVIII-spezifischen Gedächtnis-B-Zellen und deren durchflußzytometrische Analyse wurde FVIII zunächst mit Fluorescein-5-isothiocyanat (FITC) markiert. Hierzu wurden 1000 IE FVIII (Kogenate®) in 800µl ddH<sub>2</sub>O über 15 Minuten unter leichtem Schütteln bei Raumtemperatur gelöst. Der gelöste Faktor wurde gegen 500ml Bicarbonat-Puffer in Slide-A-Lyzer-Kammern (MWCO 10kDa) dialysiert (2h, 4°C). Der Puffer wurde nach einer Stunde ausgetauscht. Im Anschluss wurde die dialysierte FVIII-Suspension mit 50µl frisch gelöstem FITC (in DMSO, 2mg/ml) bei leichtem Schütteln im Dunkeln inkubiert (8h, 4°C). Anschließend wurde das FVIII/FITC-Gemisch im Dunkeln gegen 1xPBS dialysiert (über Nacht, 4°C). Der FITC-markierte Faktor wurde aliquotiert und bei -20°C im Dunkeln gelagert. Die Konzentration wurde sowohl im ELISA als auch photometrisch bestimmt. Die FITC-Markierung wurde im Fluoreszenzmikroskop, die strukturelle Integrität von FVIII durch die Bindung von monoklonalen anti-FVIII Antikörpern im ELISA überprüft.

## 2.2.6 Zellkultur

### 2.2.6.1 Isolierung von PBMCs aus Blut

Die Gewinnung von peripheren mononukleären Zellen (PBMCs) der Patienten erfolgte aus Restblut der Routineuntersuchungen. Hierzu wurden ca. 10ml Citratblut wie beschrieben vom Plasma getrennt. Das verbleibende Blut wurde im Verhältnis 1:1 mit 1xPBS verdünnt. In ein 50ml Röhrchen wurden 15-20ml Ficoll (Biocoll) vorgelegt und das verdünnte Blut vorsichtig darauf pipettiert. Die Ansätze wurden anschließend bei minimaler Beschleunigung und ohne Bremse zentrifugiert (30min, 2000rpm). Aus dem Vier-Phasen-Gradient wurde die gräuliche

Interphase, welche die PBMCs enthielt, mit einer Pipette vorsichtig abgenommen. Diese Phase wurde in 10ml 1xPBS suspendiert und anschließend zentrifugiert (20min, 800rpm). Der Überstand wurde vorsichtig restlos abgenommen und die pelletierten Zellen erneut wie beschrieben in 1xPBS gewaschen. Anschließend wurden die pelletierten Zellen in 1ml Zellkultur-Kryo-Medium resuspendiert und eine 1:10 Verdünnung der Zellen gezählt.

#### 2.2.6.2 Bestimmung der Zellzahl

Zur Bestimmung der Zellzahl wurden 10 $\mu$ l der Zellen mit 90 $\mu$ l Trypanblau-Lösung gemischt (Verdünnungsfaktor df) und 10 $\mu$ l In eine Zählkammer gegeben. Im Lichtmikroskop wurden neun Großquadrate ausgezählt und der Mittelwert ( $\bar{x}$ , überstrichen) errechnet. Die Zellzahl errechnet sich aus:

$$\bar{x} \cdot df \cdot 10000 = \text{Zellzahl/ml}$$

#### 2.2.6.3 Anlegen von Kryokulturen

Zellen wurden pelletiert und Zellzahlen von 10<sup>6</sup>-10<sup>7</sup> Zellen wurden in FCS/10%DMSO (v/v) resuspendiert und zunächst über Nacht bei -20°C gelagert. Am Folgetag wurden die Zellen bei -80°C eingelagert.

#### 2.2.6.4 Auftauen von Zellen

Kryopräservierte Zellen wurden unter leichtem Schwenken in einem Wasserbad (37°C) aufgetaut und in der Folge mehrfach mit dem jeweiligen Kulturmedium gewaschen (5min, 2000rpm).

#### 2.2.6.5 Kultivierung von PBMCs

PBMCs wurden zur Aussaat in ein 15 ml Röhrchen überführt und durch fünfminütige Zentrifugation bei 2000rpm pelletiert. Das Zellpellet wurde im Anschluss in frischem RPMI<sub>sup</sub> resuspendiert und mehrfach gewaschen. Die Zellzahl wurde ermittelt und die Zellen in erforderliche Dichte (2.2.6.11) in einem neuen Kulturgefäß ausgesät.

#### 2.2.6.6 Kultivierung von 293T-Zellen

Die adhärente Zelllinie 293T wurde subkonfluent in DMEM<sub>sup</sub> gehalten und maximal bis zu einer Dichte von ca. 70-80% wachsen lassen, bevor sie passagiert wurden. Dabei wurde das verbrauchte Medium entfernt. Die Zellen wurden mit sterilem 1xPBS gewaschen. Es wurde eine Mindestmenge (Bedeckung des Kulturflaschen-/Schalenbodens) Trypsin EDTA

zugegeben und für maximal eine Minute unter leichtem Schwenken inkubiert. Die Zellen wurden durch mehrmaliges Pipettieren vereinzelt. Danach wurden die Zellen in frischem Kulturmedium verdünnt (je nach Wachstumsgeschwindigkeit 1:4-1:10) und in neue Kulturgefäße überführt.

#### 2.2.6.7 *Transiente Transfektion*

293T-Zellen wurden mit Kalziumphosphat mit DNA transfiziert (Caphos Transfection Kit). Am Vorabend wurden je Transfektionsansatz  $6 \cdot 10^5$  Zellen in 10cm Zellkulturschalen ausgesät. Am Folgetag wurden je Transfektion 30µg DNA (1µg/µl), 50µl Kalziumphosphat und 430µl ddH<sub>2</sub>O in einem 1.5ml Reaktionsgefäß gemischt. Weiterhin wurden je Transfektion 500µl HEPES-Puffer in ein 15ml Röhrchen vorgelegt und anschließend der DNA/Kalziumphosphat-Ansatz durch Luftestrom vorsichtig untergemischt. Nach Inkubation bei Raumtemperatur (exakt 20min/Ansatz) wurden die Ansätze auf die Zellen getropft und diese anschließend im Brutschrank inkubiert.

#### 2.2.6.8 *Expression von FVIII-Domänen in 293T-Zellen*

Zur Expression der einzelnen Domänen von FVIII wurden 293T-Zellen mit den Vektoren pEF-IRESp-F8A1, pEF-IRESp-F8A2, pEF-IRESp-F8A3, pEF-IRESp-F8C1 und pEF-IRESp-F8C2 transfiziert. Zur Generierung stabiler, proteinexprimierender Zelllinien erfolgte 24 Stunden nach Transfektion ein Austausch des Kulturmediums gegen DMEM<sub>Puro</sub>. Die Zellen wurden solange in puromycinhaltigem Medium kultiviert, bis im Lichtmikroskop die Ausbildung resistenter Klone erkennbar war. Diese wurden mittels Trypsin vom Boden der Kulturschale abgelöst, gezählt und in Minimal Dilutions in DMEM<sub>Puro</sub> in 96-Loch-Zellkulturplatten ausgesät. Die Platten wurden solange im Brutschrank inkubiert, bis das Auswachsen von je einem Einzelklon je Vertiefungen der Platte im Lichtmikroskop beobachtet wurde. Diese Klone wurden zur weiteren Expansion in 48-Loch-Zellkulturplatten überführt und nach Analyse der Proteinexpression weiter expandiert.

#### 2.2.6.9 *Expression von C4bp<sub>α</sub>-Peptid-Multimeren in 293T-Zellen*

293T-Zellen wurden jeweils mit pEF-IRESp-C4bp<sub>α</sub>-12C6, pEF-IRESp-C4bp<sub>α</sub>-12H10, pEF-IRESp-C4bp<sub>α</sub>-12C6A, pEF-IRESp-C4bp<sub>α</sub>-12H10A, pEF-IRESp-C4bp<sub>α</sub>-p107 oder pEF-IRESp-C4bp<sub>α</sub>-C transfiziert. Die Generierung von Heteromultimeren erfolgte durch Co-Transfektion äquivalenter Konzentrationen von pEF-IRESp-C4bp<sub>α</sub>-12HC6 und pEF-IRESp-C4bp<sub>α</sub>-12H10. Stabile, proteinexprimierende Zelllinien wurden wie beschrieben generiert.

#### 2.2.6.10 Färbung von B-Zellen mit FVIII-FITC

Kryopräservierte PBMCs von Patienten und gesunden Spendern wurden aufgetaut, gewaschen und gezählt. Es wurden zwischen  $5 \cdot 10^4$  und  $1 \cdot 10^5$  Zellen je Färbung eingesetzt und in FACS-Röhrchen überführt. Die Zellen wurden zunächst mit 250ng Maus anti-Human IgG sowie 0.5-5 $\mu$ l FVIII-FITC (0.6 $\mu$ g/ml) in 100 $\mu$ l FACS-Puffer inkubiert (1h, 4°C). Anschließend wurden die Ansätze zweimal durch Zugabe von je 2ml FACS-Puffer und fünfminütiger Zentrifugation bei 2000rpm gewaschen. Weiterhin wurden die Zellen mit je 20 $\mu$ l APC-markiertem Maus anti-CD19 Antikörper sowie 10 $\mu$ l PerCP-Cy5.5-markiertem Streptavidin (1:400 Verdünnung) in 100 $\mu$ l FACS-Puffer inkubiert (30min, 4°C). Im Anschluss wurden die Zellen zweimal gewaschen und abschließend in 300 $\mu$ l FACS-Puffer für die Analyse im Durchflußzytometer (FACSCalibur™) resuspendiert.

#### 2.2.6.11 Färbung und durchflußzytometrische Analyse von B-Zellen mit Peptiden

Kryopräservierte PBMCs von Patienten und gesunden Spendern wurden aufgetaut, gewaschen und gezählt. Zwischen  $5 \cdot 10^4$  und  $1 \cdot 10^5$  Zellen wurden mit 0.5-5 $\mu$ l Peptiden (10 $\mu$ g/ $\mu$ l) inkubiert (1h, 4°C). Die Ansätze wurden gewaschen und anschließend mit FITC-markierten Kaninchen anti-6xHis Antikörper (1:100 Verdünnung), 20 $\mu$ l APC-markiertem Maus anti-CD19 Antikörper sowie 10 $\mu$ l PerCP-Cy5.5-markiertem Streptavidin (1:400 Verdünnung) in 100 $\mu$ l FACS-Puffer inkubiert (30min, 4°C). Im Anschluss wurden die Zellen wie beschrieben zweimal gewaschen und abschließend in 300 $\mu$ l FACS-Puffer für die Analyse im Durchflußzytometer resuspendiert.

#### 2.2.6.12 Polyklonale Stimulation von B-Zellen in PBMCs

Kryopräservierte PBMCs wurden aufgetaut, zweimal in RPMI<sub>Stim</sub> gewaschen und gezählt. Je Vertiefung wurden  $1.5 \cdot 10^6$  Zellen in 6-Loch-Zellkulturplatten eingesät. Zur Stimulation wurden folgende Mixturen ausgetestet:

- PMW 1:100000 (Endkonzentration), 10 $\mu$ g SpA, 3 $\mu$ g CpG OD2006
- F(ab')<sub>2</sub>-Fragment Ziege anti-Human IgG, 1 $\mu$ l Maus anti-Human CD40 Klon S2C6
- F(ab')<sub>2</sub>-Fragment Ziege anti-Human IgG/IgM/IgA, 1 $\mu$ l Maus anti-Human CD40 Klon S2C6

Zusätzlich wurden alle Ansätze wahlweise noch mit IL-2, IL-4 sowie IL-10 versetzt. Die Zellen wurden anschließend für sechs Tage im Brutschrank inkubiert (37°C, 5% CO<sub>2</sub>). Im Anschluss wurden die Zellen in 2ml Reaktionsgefäße überführt und dreimal mit je 2ml

RPMI<sub>Stim</sub> gewaschen. Die Zellen wurden erneut gezählt und anschließend in den ELISPOT-Test eingesetzt.

#### 2.2.6.13 ELISPOT

96-Loch Filterplatten wurden zur Detektion von IgG-sekretierenden Zellen mit 100µl (4µl/ml) Ziege anti-Human Ig Antikörpern, zur Detektion von Tetanus-spezifischen, IgG-sekretierenden Zellen mit 100µl unverdünntem Tetanol und zur Detektion von FVIII-spezifischen, IgG-sekretierenden Zellen mit 50µg/ml FVIII (Kogenate<sup>®</sup>) beschichtet (über Nacht, 4°C). Am Folgetag wurden die Platten dreimal mit 1xPBS gewaschen und anschließend mit 1%BSA in 1xPBS geblockt (2h, 37°C). Die Platten wurden erneut wie beschrieben gewaschen und im Anschluss maximal  $1 \cdot 10^5$  der stimulierten und gewaschenen Zellen je Vertiefung zugegeben. Die Platten wurden absolut erschütterungsfrei im Brutschrank inkubiert (5h, 37°C). Anschließend wurden die Platten mit 1%BSA/0.1% Tween-20 (w/v) sechsmal gewaschen und je Vertiefung mit 100µl (1µg/ml) biotinyliertem Maus anti-Human IgG Antikörper inkubiert (über Nacht, 4°C). Am Folgetag wurden die Platten dreimal mit 1xPBS/0.1% Tween-20 gewaschen und im Anschluss mit 100µl (1:5000 Verdünnung) Streptavidin-HRP inkubiert (2h, 37°C). Die Platten wurden erneut dreimal gewaschen und nach Angaben des Herstellers entwickelt (AEC Staining Kit). Nach dem Trocknen wurden die Platten fotografiert und die Spots gezählt. Ein Spot repräsentiert dabei eine IgG sekretierende Zelle.

#### 2.2.6.14 Differenzierung stimulierter Zellen

Kryopräservierte PBMCs ( $1 \cdot 10^5$ ) wurden vor und nach Stimulation mit 20µl APC-markiertem Maus anti-CD19 Antikörper, 20µl PE-markiertem Maus anti-CD27 Antikörper bzw. 20µl PE-markiertem anti-CD38 Antikörper inkubiert (30min, 4°C), anschließend dreimal in FACS-Puffer gewaschen, in 300µl FACS-Puffer aufgenommen und durchflußzytometrisch analysiert.

#### 2.2.6.15 Detektion der Zellproliferation

Zur Detektion der Zellproliferation nach Stimulation wurden PBMCs vor Stimulation mit CFSE nach Angaben des Herstellers gefärbt (CellTrace<sup>™</sup> CFSE Detection) und durchflußzytometrisch analysiert.

## 2.2.7 *In silico*-Analysen

### 2.2.7.1 *Epitopkartierung*

Zur Identifizierung von FVIII-Inhibitor Epitopen wurden zunächst die für die präsentierten Peptide kodierenden DNA-Bereiche mittels Lasergene<sup>®</sup>-Software in die entsprechende Aminosäuresequenzen übersetzt und diese hinsichtlich des Auftretens von Konsensussequenzen analysiert. Gefundene Konsensusmotive wurden zunächst mittels des ClustalW-Servers ([www.ebi.ac.uk/clustalw/](http://www.ebi.ac.uk/clustalw/)) mit der primären FVIII-AS-Sequenz verglichen. Anschließend erfolgt anhand der gefundenen Motive mittels 3DEX-Software (Schreiber *et al.*, 2005) die Suche nach konformationellen Epitopen auf der Kristallstruktur von B-Domänen deletiertem FVIII (Ngo *et al.*, 2008). Dabei wurde primär nach Analogien zwischen AS-Motiven mit vier Aminosäuren und C<sub>α</sub>-Atomabständen zwischen sechs und acht Ångström (Å) gesucht. Die anhand von 3DEX identifizierten Bereiche auf FVIII wurden mittels PyMOL<sup>®</sup>-Software (DeLano Scientific, San Francisco, CA, USA) visualisiert.

### 2.2.7.2 *Klonierungsplanung und Sequenzanalyse*

Zur Planung von Klonierungen wurden die Programme Clone Manager 5.0 sowie EnzymeX 3.1 genutzt. Sequenzanalysen wurden mittels Lasergene<sup>®</sup>- bzw. 4Peaks-Software sowie dem ExPASy Translate tool (<http://www.expasy.ch/tools/dna.html>) durchgeführt. Kladogrammanalysen erfolgten mittels des ClustalW-Servers

### 2.2.7.3 *Strukturvorhersagen und Modellierungen*

Für Strukturvorhersagen wurden mittels des Protinfo Structure Prediction Servers (Hung *et al.*, 2003, 2005; <http://protinfo.compbio.washington.edu/>) Protein Data Bank- (PDB-) Dateien generiert. Vorhersagen von Multimerisierungen wurden mit dem ClusPro-Docking Server (Comeau *et al.*, 2004, 2005; <http://nrc.bu.edu/cluster/>) erstellt.

### 2.2.7.4 *Durchflußzytometrie-Daten*

Die Analyse von durchflußzytometrischen Daten erfolgte mit der CellQuest<sup>™</sup> Pro-Software.

### 2.2.7.5 *Statistik*

Statistische Analysen wurden mittels GraphPad-Software (<http://www.graphpad.com/>) vorgenommen.

## 3. Ergebnisse

### 3.1 Phage Display-Selektion Inhibitor-spezifischer Peptide und Epitopkartierung

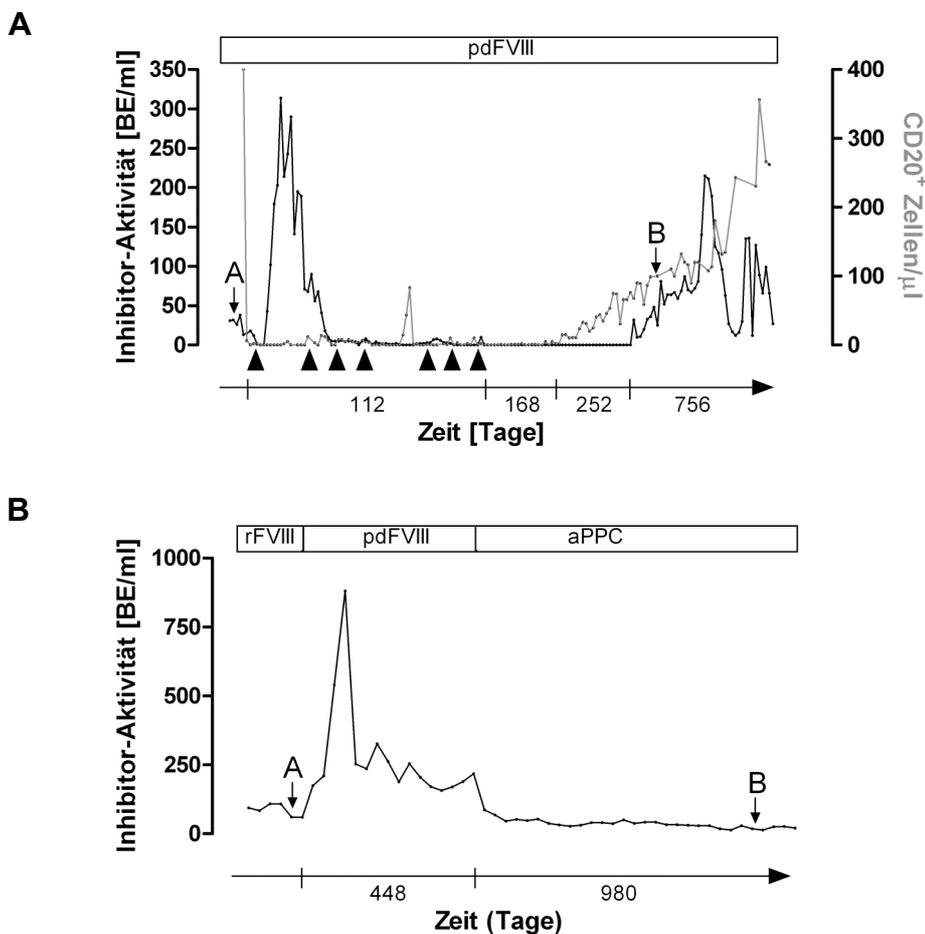
Durch Phage Display-Selektionen sollen Phagenklone mit Spezifität für anti-FVIII IgG in polyklonalen Patientenplasmen angereichert werden. Anhand der Sequenzen der präsentierten Peptide sollen Epitopkartierungen der anti-FVIII Antikörper vorgenommen werden, während die präsentierten Peptide selektierter Klone als Basis für synthetische Liganden dienen sollen.

#### 3.1.1 Inhibitorverläufe der HA Patienten

Zur Erreichung der formulierten Ziele der vorliegenden Arbeit wurde sich zur Selektion von Peptidliganden primär auf Proben von zwei Patienten beschränkt, welche im Folgenden näher vorgestellt werden. Ein Kriterium bei der Auswahl dieser Patienten bestand in der Untersuchung des Einflusses der unterschiedlichen Therapieregime auf die Epitopspezifität der anti-FVIII Antikörper. Ein weiteres Kriterium bestand in dem möglichen Potential selektierter Peptidliganden mit Spezifität für neutralisierende anti-FVIII Antikörper, welche unterschiedlich stimulierten Immunsystemen entstammen.

Im Fall von Patient 1 wurde nach mehreren ITI-Fehlschlägen mittels des Bonn- und Malmö-Protokolls mit der Gabe des anti-CD20 Antikörpers Rituximab zur Depletion der B-Zellen (CD20<sup>+</sup>) ein neuer Therapieansatz etabliert. Bereits nach der initialen Infusion mit Rituximab wurde die Konzentration von CD20<sup>+</sup> Zellen im peripheren Blut von 400 auf <10 Zellen/ $\mu$ l reduziert und waren nach weiteren 20 Tagen nicht mehr durchflußzytometrisch detektierbar (**Abb. 3.1 A**). Dennoch stieg der Inhibitortiter auf annähernd 300 BE/ml an. In Folge der zweiten Rituximab Infusion fiel der Titer auf <5 BE/ml und war von da an lediglich transient nachweisbar. Weitere fünf Rituximab Infusionen wurden verabreicht, jeweils sobald CD20<sup>+</sup> Zellen im peripheren Blut oder FVIII-Inhibitoren detektiert werden konnten. Die Gesamtdauer der Therapie mit Rituximab erstreckte sich über einen Zeitraum von 112 Tagen. Im Anschluss an die letzte Infusion waren sowohl FVIII Inhibitoren als auch CD20<sup>+</sup> Zellen für eine Dauer von 168 Tagen nicht nachweisbar. Anschließend begann die B-Zellrepopulation im peripheren Blut wobei FVIII Inhibitoren trotz kontinuierlicher Verabreichung von pdFVIII für weitere 252 Tage nicht detektierbar waren. Im Anschluss an diese Zeitspanne stieg der Inhibitortiter wieder stark an und erreichte dabei ähnliche Level wie vor Therapie. Zur Selektion von inhibitorspezifischen Peptidliganden sowie der

Kartierung von Inhibiterepitopen wurden Patientenplasmen vor Therapie (Probe A: 23 BE/ml) und im Zuge des Inhibitorrezidivs (Probe B: 38 BE/ml) ausgewählt. Im Fall von Patient 2 wurde nach Substitution von pdFVIII und beobachteten Inhibitortitern von bis 4500 BE/ml Umstellung auf eine aPPC (FEIBA<sup>®</sup>)-Prophylaxe vorgenommen (**Abb. 3.1 B**). Daraufhin ging die inhibitorische Aktivität zwar zurück, ein Inhibitor persistierte jedoch weiterhin. Zur Selektion von inhibitor-spezifischen Peptidliganden sowie der Kartierung von Inhibiterepitopen wurden Plasmen vor Substitution mit pdFVIII (Probe A: 60 BE/ml) und im Zuge der aPPC-Prophylaxe (Probe B: 26 BE/ml) ausgewählt.



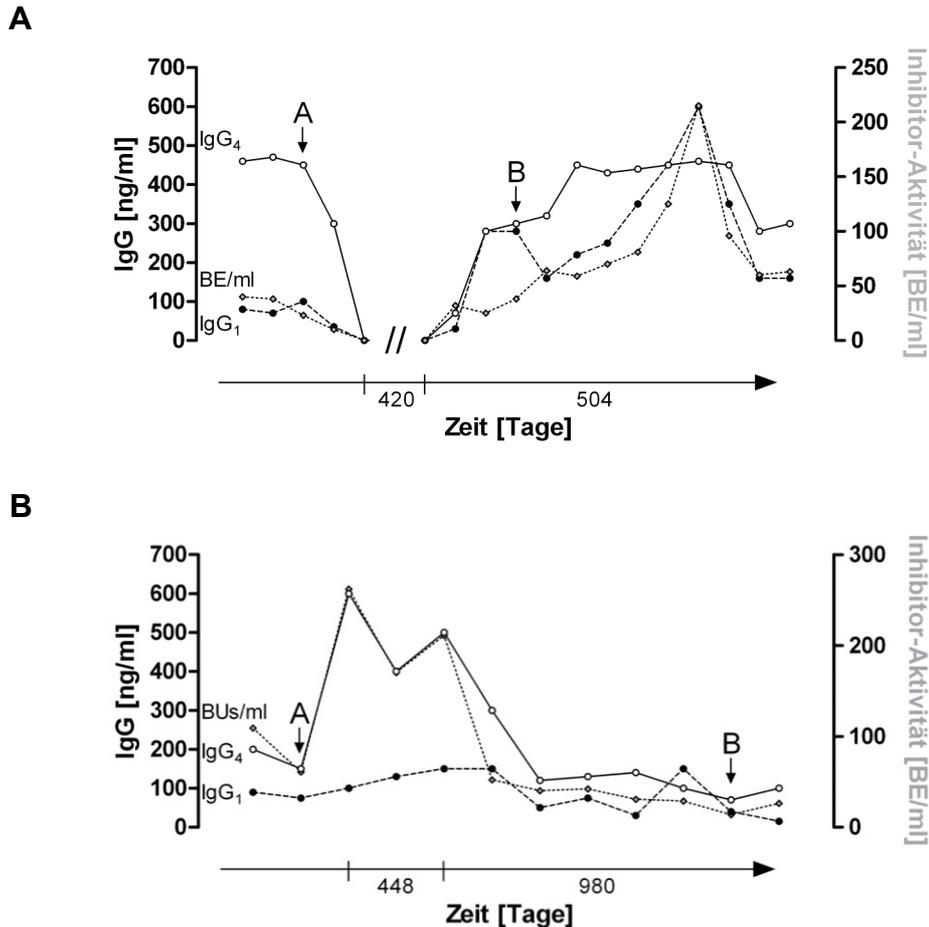
**Abb. 3.1 Inhibitorverläufe.** (A) Es ist der Inhibitorverlauf von Patient 1 in Verbindung mit der Anzahl der CD20<sup>+</sup> Zellen im peripheren Blut im Zeitraum vor und nach den verabreichten Rituximab Infusionen (▲) dargestellt. Zur Selektion Inhibitor-spezifischer Peptidliganden sowie der Epitopkartierung von anti-FVIII Antikörpern wurde Patientenplasma von einem Zeitpunkt A vor und B nach Therapie ausgewählt. (B) Es ist der Inhibitorverlauf von Patient 2 in Folge mehrerer Präparatwechsel dargestellt. Zur Selektion Inhibitor-spezifischer Peptidliganden sowie der Epitopkartierung von anti-FVIII Antikörpern wurde Patientenplasma von einem Zeitpunkt A vor der Umstellung auf pdFVIII und zum Zeitpunkt B der Substitution mit aPPCs gewählt.

### 3.1.2 Patientenplasmen enthalten FVIII-spezifisches IgG<sub>1</sub>- sowie IgG<sub>4</sub>

Die polyklonale IgG-Population der FVIII neutralisierenden Antikörper ist meist der IgG<sub>4</sub>- sowie IgG<sub>1</sub>-Klasse zuzuordnen. Die FVIII-spezifische Subklassenverteilung kann einen serologischer Indikator für die immunmodulatorischen Auswirkungen einer ITI darstellen und ist somit in Verbindung mit den durchzuführenden Epitopkartierungen im Therapieverlauf von Interesse. In diesem Kontext wurden die relativen, antigenspezifischen IgG-Subklassenverläufe beider Patienten für ausgewählte Plasmaproben im ELISA detektiert.

Vor der initialen Rituximab-Infusion wurde bei Patient 1 deutlich mehr FVIII-spezifisches IgG<sub>4</sub> gegenüber IgG<sub>1</sub> nachgewiesen ( $p < 0.003$ ; **Abb. 3.2 A**). Im Zuge des Inhibitorrezidivs stiegen antigenspezifisches IgG<sub>1</sub> und IgG<sub>4</sub> in den ersten 56 Tagen mit zunehmendem Inhibitor-titer parallel an. Im Anschluss stellte sich zunächst ein Überschuss von IgG<sub>4</sub> gegenüber IgG<sub>1</sub> ein, wonach die IgG<sub>4</sub> Konzentrationen konstant blieben ( $p < 0.05$ ). Die IgG<sub>1</sub> Konzentration stieg hingegen mit progressiver inhibitorischer Aktivität weiter an. Trotz deutlich erhöhter inhibitorischer Aktivität gegenüber den Messwerten vor Therapie ( $p < 0.001$ ) konnte insgesamt keine entsprechende Zunahme von antigenspezifischen IgG<sub>1</sub> und IgG<sub>4</sub> beobachtet werden. Mit fallendem Inhibitor-titer stellte sich anschließend wieder ein Überschuss von IgG<sub>4</sub> gegenüber IgG<sub>1</sub> ein.

Der relative Verlauf FVIII-spezifischer Subklassen wies im Fall von Patient 2 trotz starker Schwankungen des Inhibitor-titers keine signifikanten Änderungen auf (**Abb. 3.2 B**). Die antigenspezifische Subklassenverteilung wird nahezu vollständig durch einen Überschuss von IgG<sub>4</sub> gegenüber IgG<sub>1</sub> dominiert ( $p < 0.05$ ). Die während Substitution mit pdFVIII beobachteten hohen IgG<sub>4</sub>-Konzentrationen korrelierten mit der inhibitorischen Aktivität der anti-FVIII Antikörper. Die detektierten IgG<sub>1</sub>-Konzentrationen blieben hingegen im Therapieverlauf annähernd konstant. Nach Umstellung auf ein aPPC-Präparat gingen auch die IgG<sub>4</sub>-Konzentrationen mit fallendem Inhibitor-titer stark zurück und näherten sich im Zuge der aPPC-Prophylaxe den ebenfalls leicht reduzierten IgG<sub>1</sub>-Konzentrationen an. Sowohl für Patient 1 als auch für Patient 2 konnte keine Bindung von IgG<sub>2</sub> und IgG<sub>3</sub> an FVIII nachgewiesen werden.



**Abb. 3.2 FVIII-spezifische IgG-Subklassenverläufe.** (A) Es ist der relative, antigenspezifische Subklassenverlauf von Patient 1 im Verhältnis zum Inhibitortiter dargestellt. Der Verlauf wird durch die 420tägige Inhibitor freie Zeit im Zuge der B-Zell Depletion mittels Rituximab unterbrochen. (B) Der relative, antigenspezifische Subklassenverlauf von Patient 2 ist im Verhältnis zum Inhibitortiter dargestellt. Wie bereits in Abb. 3.2 sind auch hier nochmals die für das Biopanning verwandten Plasmaproben A und B angegeben.

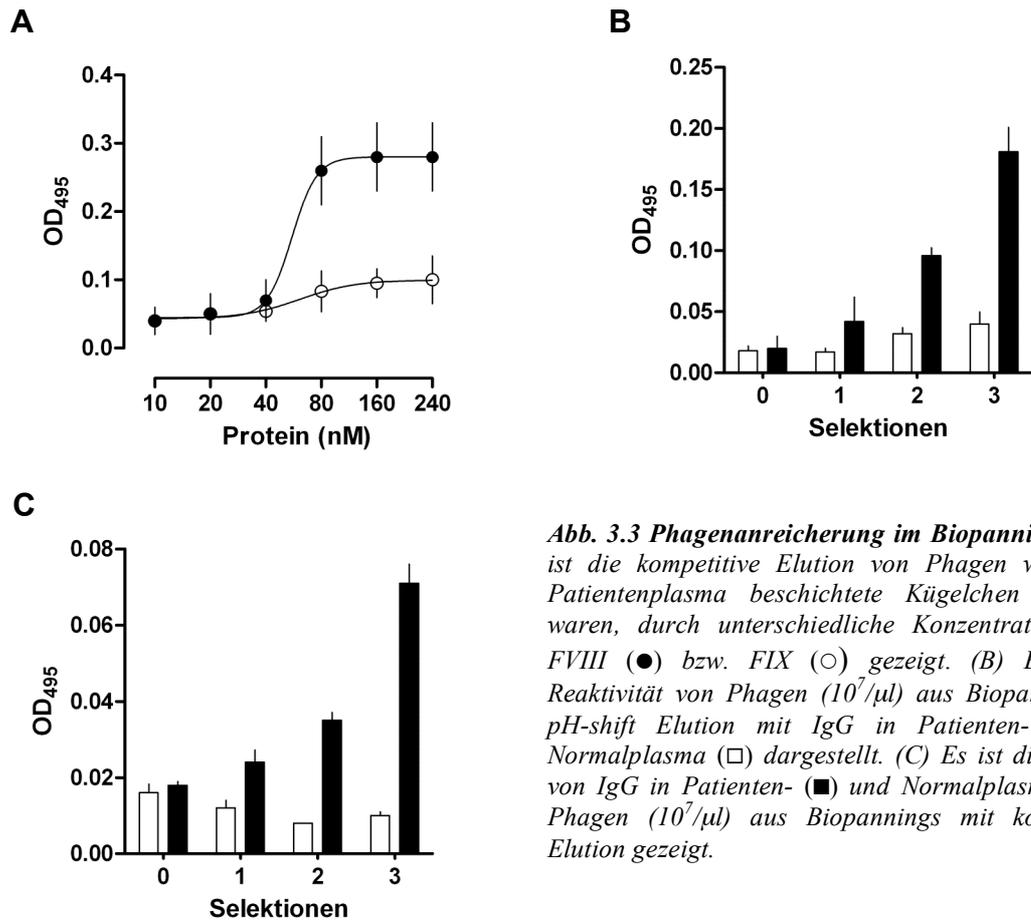
### 3.1.3 Anreicherung von Phagenpopulationen mit Spezifität für IgG in Patientenplasmen

Die Selektion von Peptidliganden für Inhibitoren erfolgte durch das *Screening* von phagenpräsentierten Peptidbibliotheken mit Patientenplasmen in Biopannings. Für diese wurde zunächst IgG aus Patienten- bzw. Normalplasma auf magnetischen Kügelchen immobilisiert und dies mit einem FITC-markierten anti-Human Antikörper im Fluoreszenzmikroskop bestätigt. In einem Biopanning erfolgten in Summe drei positive Selektion auf immobilisiertem IgG aus Patientenplasma im Wechsel mit zwei Negativselektionen mit IgG aus Normalplasma sowie zwei Amplifikationen der jeweils selektierten Phagenpopulationen in *E. coli*. In den Positivselektionen gebundene Phagen wurden je der im Biopanning eingesetzten Phagenbibliothek (Ph.D.<sup>TM</sup>-7, Ph.D.<sup>TM</sup>-C7C,

Ph.D.<sup>TM</sup>-12) sowohl durch pH-Erniedrigung als auch Konkurrenz mit FVIII eluiert. Daraus ergab sich die Durchführung von sechs unabhängigen Biopannings je Plasmaprobe.

Für eine kompetitive Elution mit FVIII wurde basierend auf der theoretisch möglichen Anzahl antigenbindender Determinanten der immobilisierten IgGs eine FVIII-Konzentration von 78nM errechnet. Im Anschluss an die zweite Amplifikation wurde die Phagen-Elution durch die errechnete FVIII-Menge analysiert. Verschiedene Ansätze mit Inhibitor-positivem Plasma beschichteter magnetischer Kügelchen wurden mit einer definierten Phagenpartikelzahl inkubiert. Nicht gebundene Phagen wurden gewaschen und die Kügelchen im Anschluss mit unterschiedlichen FVIII-Konzentrationen inkubiert. Die eluierten Phagen wurden im ELISA mittels eines anti-M13 Antikörpers detektiert. Mittels ansteigender FVIII-Konzentrationen konnten zunehmend mehr Phagen von Patientenplasma-beschichteten Kügelchen eluiert werden (**Abb. 3.3 A**). Ab einer FVIII-Konzentration von 80nM war keine signifikante Steigerung der eluierten Phagenmenge mehr zu beobachten ( $p < 0.05$ ). Diese Konzentration entsprach nahezu der berechneten theoretischen FVIII-Menge, welche für eine effektive Elution nötig war. Durch äquivalente Konzentrationen von FIX wurde keine Phagen-Elution erreicht.

Im Anschluss an die dritte positive Selektion wurde die Anreicherung von Phagen mit Spezifität für IgG in den Patientenplasmen überprüft. Identische Phagenpartikelzahlen aus Phagenbibliothek sowie erster bis dritter pH-shift bzw. kompetitiven Elution wurden auf einer ELISA-Platte immobilisiert und mit Patienten- sowie Normalplasma inkubiert. Gebundenes IgG wurde mittels eines entsprechenden Peroxidase-markierten, sekundären Antikörpers detektiert (**Abb. 3.3 B, C**). In drei Positivselektionen konnte mit beiden Elutionsmethoden eine deutliche Anreicherung von Patientenplasma-spezifischen Phagenklonen erreicht werden ( $p < 0.01$ ). Trotz der gezeigten, effektiven Elution von Phagen durch die eingesetzte FVIII-Konzentration wiesen kompetitiv eluierte Phagenklone nach drei Selektionsrunden, im Vergleich zu Phagenklonen aus der pH-shift Elution (**Abb. 3.3 B**), eine geringere Reaktivität mit IgG in Patientenplasma auf ( $p = 0.024$ ; **Abb. 3.3 C**). Die Reaktivität der kompetitiv eluierten Phagenpopulation mit Normalplasma war sehr gering. Durch pH-shift Elution angereicherte Phagenklone wiesen eine vergleichsweise stärkere Bindung an IgG in Normalplasma auf.

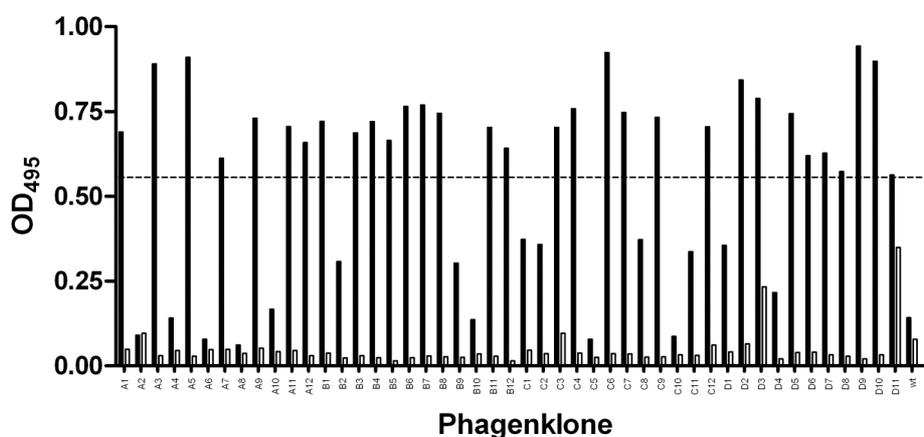


**Abb. 3.3 Phagenanreicherung im Biopanning.** (A) Es ist die kompetitive Elution von Phagen welche, an Patientenplasma beschichtete Kügelchen gebunden waren, durch unterschiedliche Konzentrationen von FVIII (●) bzw. FIX (○) gezeigt. (B) Es ist die Reaktivität von Phagen ( $10^7/\mu\text{l}$ ) aus Biopannings mit pH-shift Elution mit IgG in Patienten- (■) und Normalplasma (□) dargestellt. (C) Es ist die Bindung von IgG in Patienten- (■) und Normalplasma (□) an Phagen ( $10^7/\mu\text{l}$ ) aus Biopannings mit kompetitiver Elution gezeigt.

### 3.1.4 Selektierte Einzelklone sind spezifisch für IgG in Patientenplasmen

Für die gesamten Phagenpopulationen konnte eine Zunahme der Spezifität für Antikörper in den verwendeten Patientenplasmen im Verlauf der Biopannings gezeigt werden (Abb. 3.3 B, C). Zur Analyse der Spezifität der selektierten Phagen auf klonaler Ebene wurden diese zunächst im Anschluss an die letzte Elution in einer Blau/Weiß-Selektion vereinzelt. Der Phagentiter (*plaque forming units, pfu*) lag im Anschluss an die Biopannings je nach verwendeter Phagenbibliothek und Elutionstechnik zwischen  $10^3$ - $10^6$  pfu/ $\mu\text{l}$ . In der Folge wurden einzelne blaue Klone in LB-Medium im 96-Loch-Format angezogen. Die in den Überständen enthaltenen Phagen sowie der M13-Wildtyp wurden anschließend im ELISA auf ihre Bindung an immobilisiertes Patienten- sowie Normalplasma getestet. In Abb. 3.4 ist exemplarisch ein solcher, charakteristischer Phagen-ELISA dargestellt. Die gemessene Reaktivität ( $\text{OD}_{495}$ ) fast aller Klone mit den Plasmen war ca. drei bis sechsfach höher als die des M13-Wildtyps. Klone deren  $\text{OD}_{495}$  mindestens dreifach über der des Wildtyps lag, wurden als ELISA-positiv definiert. Ein großer Anteil der analysierten Einzelklone wies nach Abschluss der Biopannings eine deutliche Spezifität für die jeweils in der Selektion

verwendeten Patientenplasmen auf. Die Reaktivität der analysierten Phagenklone lag zumeist zwischen fünf und 15fach über der mit Normalplasma. Je Patient wurden 282 Einzelklone analysiert. Screening der drei randomisierten Phagenbibliotheken mit Plasmaprobe A von Patient 1 bzw. Plasmaprobe B von Patient 2 ergab vornehmlich ELISA-positive Klone, welche der linearen 7mer und 12mer Phagenbibliothek angehörten. Im Fall des Screenings der Plasmaprobe B von Patient 1 bzw. der Probe A von Patient 2 fanden sich zudem Klone, welche der zyklischen 7mer Phagenbibliothek zuzuordnen waren. Aus Biopannings mit Plasmaprobe A sowie B von Patient 1 konnten mit pH-shift Elution 97 (33%) bzw. 28 (10%) ELISA-positive Klone isoliert werden. Durch Konkurrenz mit FVIII wurden aus Biopannings mit diesen Plasmaproben 16 (6%) bzw. 22 (8%) positive Klone selektioniert. Aus den Biopannings mit Plasmaprobe A und B von Patient 2 konnten 39 (14%) bzw. 18 (6%) ELISA-positive Klone mit pH-shift Elution gewonnen werden. Die Konkurrenz mit FVIII in Biopannings mit diesen Plasmen erbrachte 10 (4%) bzw. 30 (10%) positive Klone. Bis auf das Screening mit Probe B von Patient 2 konnten demnach aus den Biopannings mit pH-shift Elution mehr ELISA-positive Klone isoliert werden.



**Abb. 3.4 Phagen-ELISA.** Exemplarisch ist die Reaktivität von 47 einzelnen, selektierten Phagenklonen aus der Ph.D.<sup>TM</sup>-12 Phagenbibliothek mit immobilisiertem Plasma (■) von Patient 1 sowie Normalplasma (□) dargestellt. Phagenklone, deren  $OD_{495}$  mindestens dreifach über der des wt lag (---), wurden als ELISA-positiv definiert und zur weiteren Analyse ausgewählt.

### 3.1.5 Die AS-Sequenzen der selektierten Peptide weisen Konsensusmotive auf

Die Nutzung der selektierten Phagenklone zur Epitopkartierung erfordert eine Analyse der AS-Sequenzen der am N-Terminus des pIII-Hüllproteins präsentierten Peptide. Die ssDNA aller ELISA-positiven Klone aus allen durchgeführten Biopannings wurde extrahiert und sequenziert. Es wurden 99 (88%) bzw. 37 (74%) der ELISA-positiven Einzelklone aus den

Biopannings mit Plasmen A und B von Patient 1 erfolgreich sequenziert. Von den positiven Einzelklonen aus den Screenings mit Plasmaproben A und B von Patient 2 ergaben alle bzw. 36 (95%) Klone lesbare Sequenzen. Die AS-Sequenzen der Peptidinserts wurden hinsichtlich des Auftretens von Konsensus-Motiven sowie der AS-Frequenz analysiert. Die Sequenzen, welche Konsensusmotiv aufwiesen, sind für Patient 1 in Tabelle 3.1 und für Patient 2 in Tabelle 3.2 zusammengefasst.

**Tabelle 3.1 Sequenzen ELISA-positiver Klone mit Konsensusmotiv aus dem Screening von Patient 1**

Elution	Probe A	Probe B
pH	NPVEW <b>FMSTVNT</b> <sup>†</sup> (16)	NPVE <b>ALLRPLGS</b>
	NPVEN <b>MMDRDSQ</b> <sup>‡</sup> (32)	NPVEN <b>MMDRDSQ</b> <sup>‡</sup>
	NPVEHAVN <b>ALRP</b> (2)	NPVE <b>RL</b> LSALA
	NPVE <b>TYTGLYHV</b> (2)	NPVEW <b>LMSTVNT</b> <sup>†</sup>
	NPVE <b>GMLTVLAR</b>	NPVE <b>HMM</b> <sup>¶</sup> (2)
	NPVEI <b>AL</b> TVPTR	NPVEN <b>LT</b>
	NPVESW <b>L</b> TH <b>TRI</b> (10)	NPVE <b>TQV</b> <sup>§</sup>
	NPVE <b>HFLSAKLW</b>	
	NELV <b>I</b> PNIT <b>PAR</b>	
	NP <b>IEALM</b>	
	NPVE <b>TQV</b> <sup>§</sup>	
	NPVE <b>MLL</b>	
	NPVE <b>HMM</b> <sup>¶</sup>	
	NPVES <b>LL</b> <sup>‡</sup>	
	CPEV <b>DRATC</b>	
	Kompetition	N <b>MI</b> ES <b>MLRTASH</b>
NPVEW <b>FMSTVNT</b> <sup>†</sup>		N <b>PI</b> E <b>QLLRASYN</b>
N <b>PI</b> ES <b>MLRTASH</b> <sup>‡</sup>		N <b>PI</b> EN <b>ALGVREI</b>
NPVE <b>LLL</b>		NPVE <b>HMM</b> <sup>¶</sup>
NPVE <b>LGI</b> <sup>§</sup>		NPVE <b>LGI</b> <sup>§</sup>
		NPVE <b>FHT</b>
		NPVE <b>SLL</b> <sup>‡</sup>

*Häufigkeit der gefundenen Sequenz in Klammern; Konsensusmotiv in verschiedenen, auftretenden Varianten grau hinterlegt; Andere, frequente Aminosäuren fett gedruckt; Unterschiedliche Klone, welche im Screening von Probe A und B auftraten <sup>†,‡,§,¶,‡,‡,‡</sup>.*

Ein sehr prominentes Konsensusmotiv unter den Sequenzen Phagen-präsentierter Peptide, welche aus den Biopannings mit Plasmen von Patient 1 isoliert wurden, umfasste die Aminosäuren NPV/IE (**Tab 3.1**). Das Motiv trat in 76% der pH-eluierten ELISA-positiven Klone und in 31% der kompetitiv eluierten Klone aus dem Screening mit Plasmaprobe A auf. Im Fall des Screenings mit Probe B wurde das Motiv in 32% der pH-shift sowie kompetitiv

eluierten ELISA-positiven Klone gefunden. Vor allem aus dem Screening mit Probe A wurden einige Phagenklone in hoher Frequenz isoliert. Die Peptid-kodierenden DNA-Sequenzen dieser Klone waren identisch. Einige Klone konnten sowohl aus dem Biopanning mit Plasmaprobe A als auch Probe B isoliert werden. Neben dem Konsensusmotiv traten noch weitere Aminosäuren wie Alanin (A), Arginin (R), Aspartat (D), Leucin (L), Methionin (M), Threonin (T) und Valin (V) häufiger auf. Vor allem Leucin, Arginin und Alanin ((L)LR(T)A) fanden sich dabei wiederholt in wechselnder Abfolge und Kombination mit anderen Aminosäuren.

**Tabelle 3.2 Sequenzen ELISA-positiver Klone mit Konsensusmotiv aus dem Screening von Patient 2**

Elution	Probe A	Probe B
pH	KMSVPHDRHWRM	<b>GSPWSEWLIQHY</b> <sup>+</sup> (4)
	KQFPPIANAHWRT	SDTWKTW <b>FQALR</b> <sup>+</sup>
	HWRDRV <b>SPSPE</b> <sup>+</sup>	ASTWTEWFNFHH
	HWRDYTT <b>KPLGS</b>	D <b>LAWKEWYALKT</b>
	HWRD <b>ALR</b> <sup>+</sup> (6)	<b>QSPWQTWETRAL</b> <sup>++</sup>
	HWRD <b>LLR</b> <sup>+</sup> (2)	SPAS <b>SPWKLWYLL</b> <sup>+</sup>
	HWRDK <b>LS</b>	
	CRDWAENTC (2)	
	C <b>PNK</b> DHWRC	
	CGLGHWR <b>LC</b>	
	C <b>PGK</b> HWRAC	
	C <b>PPF</b> HWRMC	
	CETRHHWR <b>C</b> (5)	
	CF <b>P</b> ITHWR <b>C</b>	
	CN <b>PP</b> THWR <b>C</b>	
	CE <b>D</b> PHHWRC	
	CMN <b>PQ</b> HWRC	
	CN <b>PPS</b> HWRC	
	C <b>PSA</b> SHWR <b>C</b> <sup>+</sup>	
	CEGRAHWRC	
CT <b>PQ</b> GHWR <b>C</b>		
CQ <b>PP</b> NHWRC		
CE <b>S</b> IHHWR <b>C</b>		
C <b>SP</b> LHWRC <sup>+</sup>		
Kompetition	CF <b>P</b> ITHWR <b>C</b>	<b>SWQEW</b> FSSRFYD
	CE <b>D</b> PHHWRC	<b>SPWRD</b> WYAQILT <sup>+</sup>
		<b>GSPWSEWLIQHY</b> <sup>+</sup> (7)
		ELTWLEW <b>Y</b> SKLG (5)
		GE <b>SWQ</b> TWAMRML
	ATMDTWQAW <b>FLR</b> <sup>+</sup> (3)	

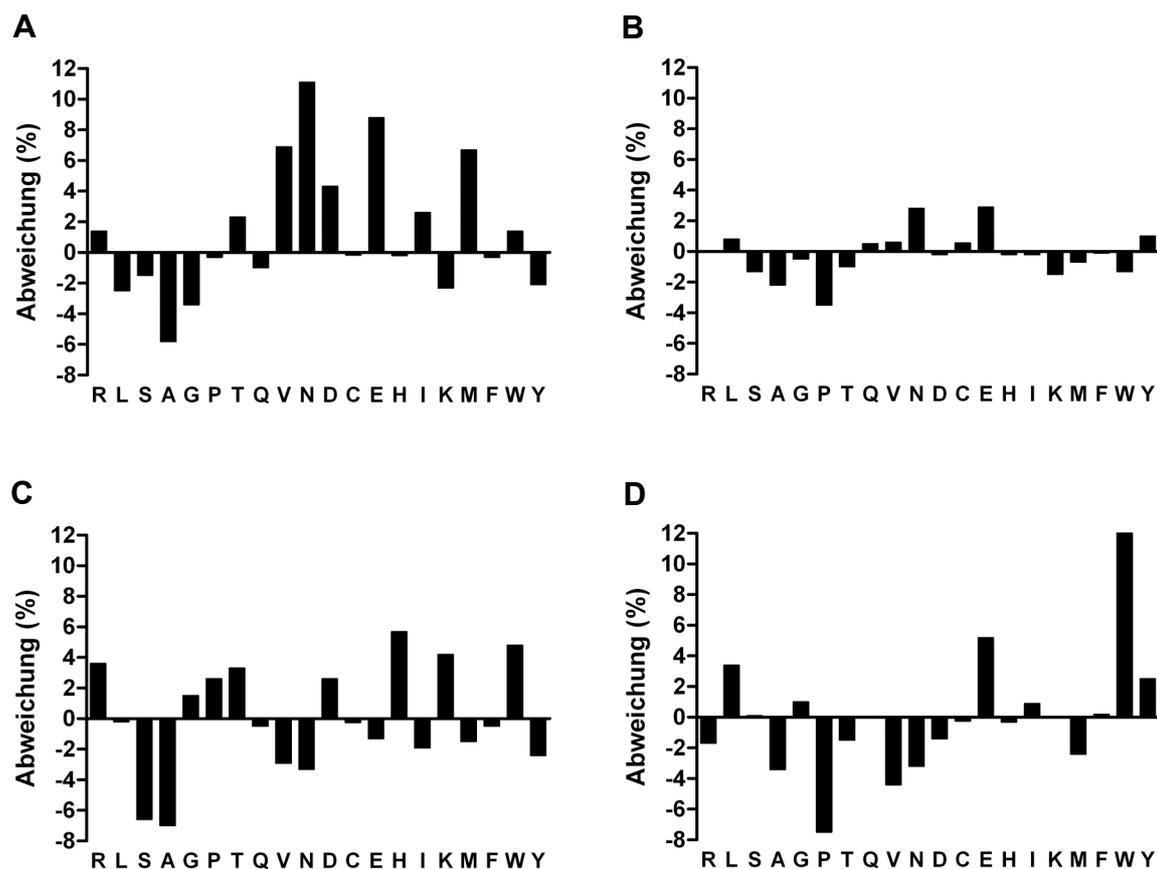
*Häufigkeit der gefundenen Sequenz in Klammern; Konsensusmotiv in verschiedenen, auftretenden Varianten grau hinterlegt; Andere, frequente Aminosäuren fett gedruckt; Klone mit Sequenzanalogien <sup>++</sup>*

Unter den Peptidsequenzen der ELISA-positiven Klone, welche aus den Biopannings mit den Plasmaproben A und B von Patient 2 isoliert wurden, konnten zwei unterschiedliche, wenn auch ähnliche Konsensusmotive identifiziert werden. Das Motiv, welches in den Peptidsequenzen aus den Biopannings mit Probe A identifiziert werden konnte, umfasst die Aminosäuren HWR(D) und fand sich in 35 (9%), bzw. 2 (20%) der pH-shift sowie kompetitiv eluierten, ELISA-positiven Klone (**Tab 3.2**). Die homologen AS-Abfolgen, welche sich unter den Peptiden der ELISA-positiven Klone aus Screenings von Probe B fanden, ließen sich auf das Konsensusmotiv (SP)WxEW(F/Y) reduzieren, worunter die Aminosäuren WSEW am häufigsten auftraten. Das Konsensusmotiv fand sich in 9 (50%) der Klone aus den Biopannings mit pH-shift Elution und 17 (57%) der ELISA-positiven Klone aus der kompetitiven Elution. In den Sequenzen aus den Biopannings mit Plasmaprobe A fand sich neben dem Konsensusmotiv häufig Proline (P) und Serine (S) sowie Alanine, Leucine und Arginine (R). Serin und Prolin fanden sich auch in den Sequenzen aus den Screenings mit Plasmaprobe B und machten damit eine Sequenzanalogie zwischen den isolierten Klonen aus den Biopannings mit beiden Plasmen aus. Eine weitere Analogie bestand in dem Auftreten von Leucin, Alanin und Arginin (LAR). Die Ähnlichkeit zwischen den identifizierten Konsensusmotiven HWR(D) und (SP)WxEW(F/Y) zeigte sich am deutlichsten an Peptid SPWRDWYQAQILT, welches Elemente beider Motive beinhaltet.

Zur weiteren Analyse der Sequenzen wurden multiple Sequenz-Abgleiche (*multiple sequence alignments*) durchführen. In Kladogrammanalysen lassen sich evolutionäre Beziehungen zwischen den Sequenzen darstellen und somit eventuelle, weitere Analogien identifizieren. Entsprechende Daten zu den selektierten Sequenzen befinden sich im Anhang dieser Arbeit (**6.1**). Anhand der Kladogrammanalysen der multiplen Sequenzabgleiche ließen sich die Sequenzen der Peptide, welche aus den Biopannings der Plasmaproben A (**6.1.1**) und B (**6.1.2**) von Patient 1 isoliert wurden, in 5 Gruppen einteilen: Duodecamere sowie heptamere Sequenzen mit und ohne NPV/IE-Konsensusmotiv sowie Sequenzen aus der C7C-Phagenbibliothek. Innerhalb dieser Gruppen ließen sich jedoch keine weiteren Gemeinsamkeiten in den Peptidsequenzen ELISA-positiver Klone feststellen. Außer dem prominenten NPV/IE-Motiv und den wiederholt auftretenden Kombinationen von Alanin, Leucin und Arginin (LAR) (**Tab 3.1**) konnten lediglich das häufigere Auftreten von Glutamat und Serin (QS) unter den Peptidsequenzen aus dem Biopannings mit Plasmaprobe B beobachtet werden. Das Kladogramm der Sequenzen aus den Screenings mit Plasmaprobe A von Patient 2 ließ sich in vier Gruppen einteilen (**6.1.3**). Es ließen sich lediglich duodecamere sowie heptamere Sequenzen mit dem HWR(D)-Konsensus sowie heptamere Sequenzen ohne

Konsensus gruppieren. Außerdem bilden die zyklischen Heptamere mit dem Konsensus-Motiv eine weitere Gruppe. Die Sequenzen aus den Biopannings mit Plasmaprobe B (**6.1.4**) ließen sich lediglich in Sequenzen mit und ohne Konsensusmotiv differenzieren. Auch für die Kladogramm-Analyse der Sequenzen aus den Biopannings mit Plasmen von Patient 2 galt, dass sich außer den bereits dargestellten Konsensus-Motiven und Analogien (**Tab 3.2**) keine weiteren konservierten Aminosäuren identifizieren ließen.

Eine weitere Möglichkeit der Analyse Phage Display selektionierter AS-Sequenzen bestand in dem Vergleich der prozentuale Differenz zwischen der AS-Frequenz in den selektierten Peptiden mit der Häufigkeit jeder Aminosäure in der gesamten, jeweils verwendeten Phagenbibliotheken (nach Angaben des Herstellers). Dabei lassen sich Abweichungen von der AS-Frequenz in den Phagen-präsentierten Peptiden der Original-Phagenbibliothek und den durch das Selektionsverfahren mit unterschiedlichem Probenmaterial generierten Phagenpopulationen identifizieren. Diese Analyse wurde mit den isolierten Peptiden aus den Biopannings mit den Plasmaproben A und B von Patient 1 bzw. 2 durchgeführt. Aus dem Vergleich mit der Aminosäureverteilung in den Phagenbibliotheken ging hervor, dass neben den Aminosäuren des Konsensusmotivs (NV/IE) im Fall des Screenings mit Plasmaprobe A von Patient 1 (**Abb. 3.5 A**) Arginin (R), Threonin, (T) sowie Aspartat (D) in Peptidsequenzen der selektierten Klone überrepräsentiert waren ( $p < 0.05$ ). Im Fall der Biopannings mit Plasmaprobe B (**Abb. 3.5 B**) war dies für die Aminosäuren Arginin (R), Leucin (L), Glutamin (Q) und Tyrosin (Y) zutreffend ( $p < 0.05$ ). Somit war Arginin die einzige Aminosäure, die neben den Aminosäuren des Konsensusmotivs in den isolierten Peptiden überrepräsentiert war. Obwohl Prolin ein Bestandteil des Konsensusmotivs war, blieb es aufgrund der hohen Frequenz von Prolinen in den verwendeten Phagenbibliotheken stets unterrepräsentiert. Die für die Sequenzen aus Screenings mit Plasmaprobe B beobachtete, geringere, prozentuale Abweichungen ist durch die geringere Anzahl selektierter Klone zu erklären. Die Analyse der Phagenklone, welche aus den Biopannings mit Plasmaprobe A und B von Patient 2 isoliert wurden, ergab, dass in den Sequenzen der ELISA-positiven Klone aus den Screenings mit Probe A neben den Aminosäuren des Konsensusmotivs HWR(D) Glycin (G), Prolin (P), Threonin (T) und Lysin (K) überrepräsentiert waren ( $p < 0.05$ ; **Abb. 3.5 C**). Im Fall der Biopannings mit Plasmaprobe B traf dies neben den Aminosäuren des frequenten WSEW-Motivs außerdem für Leucin (L), Serin (S), Glycin, Isoleucin (I), Penylalanin (F) sowie Tyrosin (Y) zu ( $p < 0.05$ ; **Abb. 3.5 D**). Neben dem in beiden Konsensusmotiven auftretenden Tryptophan (W) bestand in Glycin die einzige, weitere Gemeinsamkeit zwischen den Peptidsequenzen aus allen Biopannings mit Plasmen von Patient 2.



**Abb. 3.5 Abweichung der AS-Verteilung.** Exemplarisch ist die prozentuale Abweichung der AS-Verteilung in den Sequenzen der ELISA-positiven Klone aus dem Screening der Ph.D.<sup>TM</sup>-12 Phagenbibliothek mit den Plasmaproben A und B von Patient 1 (A, B) und Patient 2 (C, D) im Vergleich zur Häufigkeit der einzelnen AS in der gesamten 12mer Phagenbibliothek dargestellt.

### 3.1.6 Epitopkartierungen der Konsensusmotive identifizieren konformationelle Epitope in der A2- und C2-Domäne

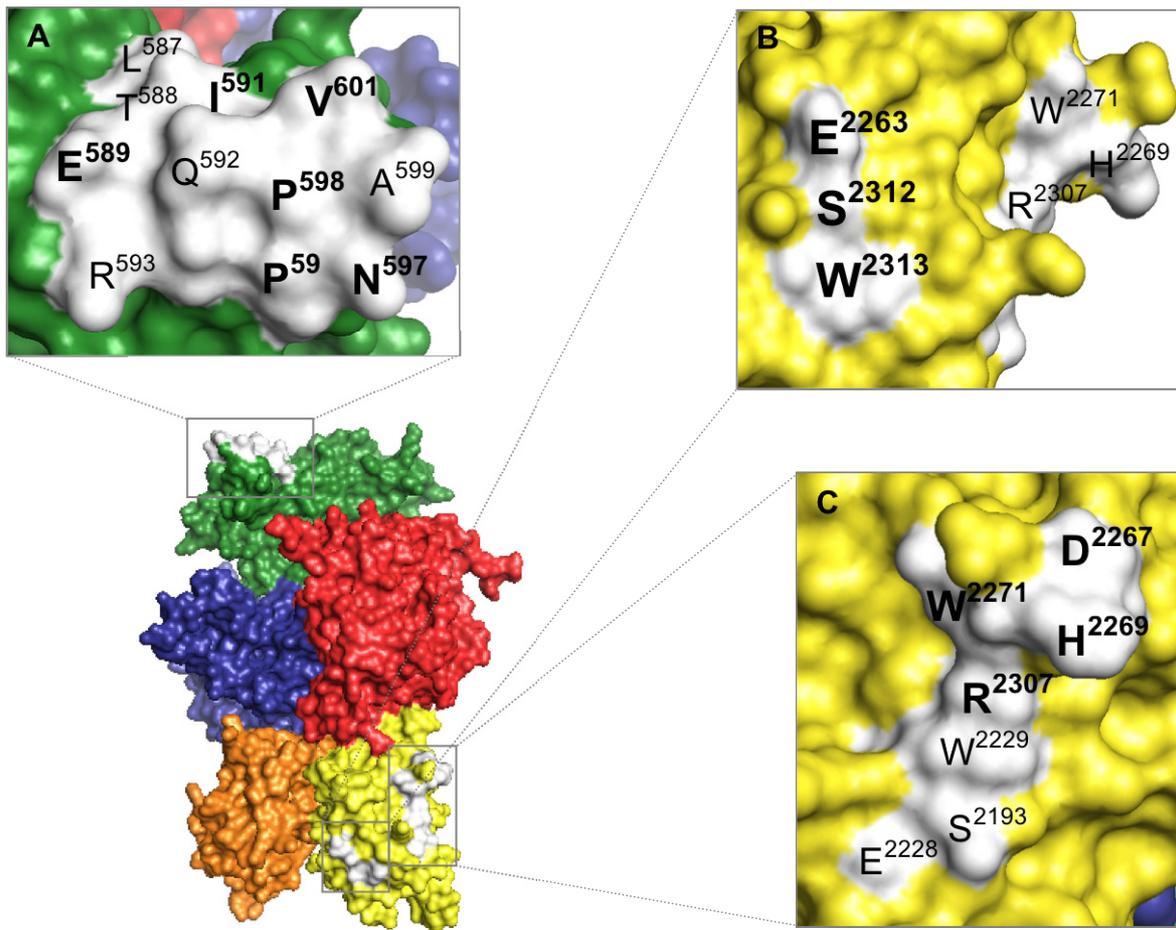
Die Kartierung konformationeller Epitope wurde durch das Vorhandensein der Kristallstruktur von FVIII (Ngo *et al.*, 2008) ermöglicht. Die identifizierten AS-Konsensusmotive wurden zunächst mit der FVIII-Primärsequenz und anschließend mittels 3DEX-Software (Schreiber *et al.*, 2005) mit den PDB-Strukturdaten der Kristallstruktur verglichen. Eine Überprüfung der Oberflächenpräsenz der Ergebnisse aus den 3DEX-Analysen erfolgte mit Hilfe der PyMOL-Software.

Der Vergleich der Konsensusmotive aus den Biopannings mit Plasmen von Patient 1 und 2 mit der primären AS-Sequenz von FVIII lieferte geringfügige Sequenzübereinstimmungen. Für das NPV/IE-Konsensusmotiv wurde eine die Aminosäuren N, P und E betreffende Analogie zu Aminosäuren der C2-Domäne festgestellt (N<sup>2225</sup>, P<sup>2226</sup>, E<sup>2228</sup>). Allerdings wurde mittels der PyMOL-Software für diese Aminosäuren nur eine schwache

Oberflächenexposition auf der Kristallstruktur von FVIII nachgewiesen. Der Vergleich der HWR(D)- sowie (SP)WxEW(F/Y)-Motive mit der FVIII-Primärsequenz resultierte lediglich in Übereinstimmungen WS ( $W^{1341}S^{1342}$ ) und EW-Elementen ( $E^{1580}W^{1581}$ ) der B-Domäne. Der Vergleich der gefundenen Konsensusmotive mit der Kristallstruktur von FVIII mittels der 3DEX-Software ermöglichte die Identifikation einer Vielzahl von Homologien mit  $C_{\alpha}$ -Atomabständen zwischen sechs und acht Angström. Mittels der PyMOL-Software wurde die Oberflächenexposition dieser diskontinuierlichen Bereiche verifiziert. Somit konnte für Patient 1 ein mögliches anti-FVIII Antikörperepitop in der A2-Domäne und für Patient 2 Epitope in der C2-Domäne lokalisiert werden (**Abb. 3.6**).

Der Vergleich des NPV/IE-Motivs aus den Biopannings mit Plasmen von Patient 1 mit der Kristallstruktur von FVIII mittels der 3DEX-Software resultierte in Homologien mit einem Bereich in der A2-Domäne. Der Abstand der  $C_{\alpha}$ -Atome der identifizierten, in der Struktur benachbarten Aminosäuren  $E^{589}$ ,  $I^{591}$ ,  $N^{597}$ ,  $P^{598}$  und  $V^{601}$  betrug sechs Angström. In unmittelbarer Nähe der Aminosäuren E, I, V, P und N konnten einige weitere Aminosäuren, wie die in den analysierten Sequenzen wiederholt auftretenden Aminosäuren (Q)LR(T)A ( $Q^{592}$ ,  $L^{587}$ ,  $R^{593}$ ,  $T^{588}$ ,  $A^{599}$ ) identifiziert werden (**Abb. 3.6 A**).

Der Vergleich des Konsensusmotivs HWRD sowie des primären Konsensusmotivs WESW aus den Biopannings mit Plasmen von Patient 2 mit der Kristallstruktur von FVIII resultierte in zwei möglichen konformationellen Epitopen in der C2-Domäne, welche in der Struktur in räumlicher Nähe (**Abb. 3.6 B**) bzw. unmittelbarer Nachbarschaft (**Abb. 3.6 C**) zueinander lagen. Die  $C_{\alpha}$ -Atome der identifizierten Aminosäuren  $D^{2267}$ ,  $H^{2269}$ ,  $W^{2271}$  und  $R^{2307}$  lagen in einem Abstand von acht Angström (**Abb. 3.6 C**). Die Kartierung des WSEW-Motivs ergab mehrere mögliche Epitope in der A1, A2 und C2 Domäne, wobei lediglich die Aminosäuren  $S^{2193}$ ,  $E^{2228}$  und  $W^{2229}$  (**Abb. 3.6 C**) sowie  $E^{2263}$ ,  $S^{2312}$  und  $W^{2313}$  (**Abb. 3.6 B**) in C2 oberflächenpräsent waren. Der Abstand der  $C_{\alpha}$ -Atome der strukturell benachbarten Aminosäuren betrug in beiden Fällen sechs Angström. In räumlicher Nähe zu den angegebenen möglichen Epitopen konnte eine Reihe weiterer Aminosäuren identifiziert werden ( $K^{2227}$ ,  $Q^{2311/2270}$ ,  $T^{2272}$ ,  $L^{2273}$ ), welche mit dem Konsensusmotiv (SP)WxEW(F/Y) auftraten und aus Gründen der Übersichtlichkeit nicht graphisch dargestellt wurden.



**Abb. 3.6 Epitopkartierung.** Es sind die mittels 3DEX-sowie PyMOL-Software identifizierte Homologien zu den Konsensusmotiven aus den Biopannings mit den Plasmen von Patient 1 und 2 auf der Oberfläche der FVIII-Kristallstruktur mit ihrer Position in der FVIII-Primärsequenz angegeben. (A) Es sind die Homologien zum NPV/IE-Motiv (fett) auf der Oberfläche der A2-Domäne sowie zusätzlich identifizierte Aminosäuren dargestellt. (B) Es sind die AS-Analogien zu dem WSEW-Motiv (fett) sowie HWR(D)-Motiv gezeigt. (C) Es sind die Homologien zu dem HWR(D)-Motiv (fett) sowie WSEW-Motiv auf der Oberfläche der C2-Domäne dargestellt.

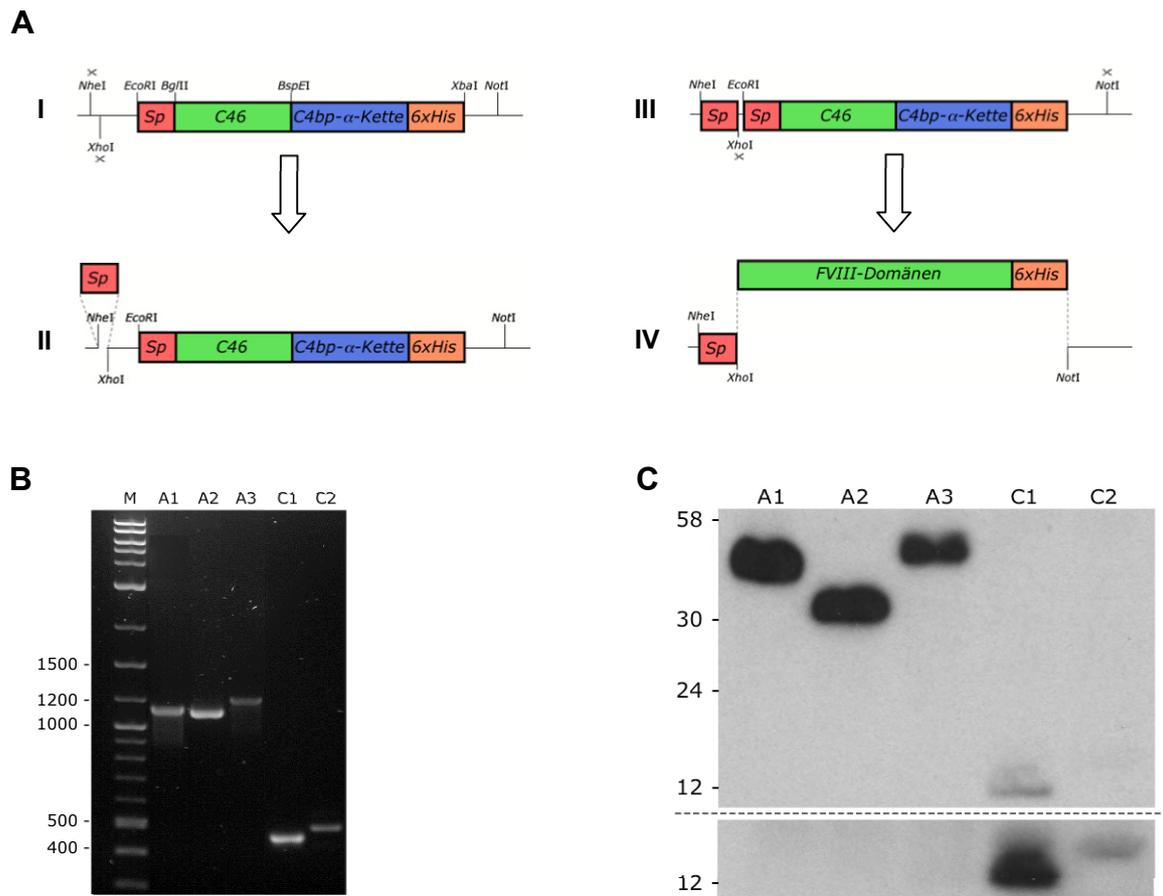
### 3.1.7 Bestätigung der Domänenspezifität der *in silico*-Epitopkartierung

Trotz der vielfach erwiesenen Präzision von Epitopkartierungen, welche auf die Selektion von Peptiden aus Phage Display-Bibliotheken zurückgehen, bedarf es einer Validierung der auf diesem Weg generierten Epitopdaten. Eine hierzu angewandte Methode bestand in der ortsspezifischen Mutation der identifizierten Aminosäuren im nativen Antigen. In dem Vektor pcDNA 3.1-FVIIIΔB wurden in FVIII-kodierender DNA ortsgerechte Mutationen eingeführt, durch welche ein Austausch der Aminosäuren E<sup>589</sup>, I<sup>591</sup>, N<sup>597</sup> und P<sup>596/598</sup> in dem möglichen A2-Epitop sowie K<sup>2227</sup>, E<sup>2228</sup>, W<sup>2229</sup>, D<sup>2267</sup>, H<sup>2269</sup>, Q<sup>2270</sup>, W<sup>2271</sup>, R<sup>2307</sup> und H<sup>2309</sup> in den C2-Epitopen gegen Alanine erfolgte. Die AS-Austausche wurden mittels Sequenzierung überprüft und die Konstrukte jeweils in 293T-Zellen transfiziert. Allerdings war es auch nach

wiederholten Transfektionen und folgenden Neomycin-Selektionen nicht möglich eine Proteinexpression in Zelllysaten und Überständen im Western Blot oder ELISA nachzuweisen.

Daher erfolgte eine Verifizierung der durch die *in silico*-Kartierung vorgegebenen Domänenspezifitäten der anti-FVIII Antikörper durch die Untersuchung der Reaktivität von IgG in Patientenplasmen mit einzelnen FVIII-Domänen. Hierfür wurden diese zunächst kloniert und rekombinant exprimiert. Die für die Domänen A1, A2, A3, C1 und C2 kodierenden DNA Abschnitte aus FVIII-cDNA in pSP64-FVIII wurden PCR-amplifiziert und über die verwendeten Oligonukleotide mit einer C-terminalen 6xHis-Markierung versehen. Aufgrund der in der Domänen-DNA vorliegenden Restriktionsschnittstellen wurde zunächst das Signalpeptid in dem Ausgangsvektor 364H versetzt und anschließend der für das C46-Peptid und C4bp<sub>α</sub>-kodierende Bereich entfernt (**Abb. 3.7 A**). Die Klonierung der PCR-Produkte (**Abb. 3.7 B**) von A1 (1130bp), A2 (1095bp), A3 (1206bp), C1 (444bp) und C2 (474bp) in den Vektor pEF-IRESp-S10 wurde durch Verdau sowie Sequenzierung kontrolliert. Die Konstrukte pEF-IRESp-F8A1, -F8A2, -F8A3, -F8C1, -F8C2 wurden anschließend in 293T-Zellen transfiziert. Durch Zusatz von Puromycin erfolgte die Selektion resistenter Klone, welche anschließend subkloniert wurden. Der Nachweis der Expression der einzelnen 6xHis-markierten FVIII-Domänen sowie deren Präsenz im Kulturüberstand erfolgten mittels Polyacrylamid-Gelelektrophorese unter reduzierenden Bedingungen und nachfolgendem Western Blot. In Zelllysaten gleicher Zellzahlen sowie Kulturüberständen subklonierter 293T-Einzelklone waren Proteine entsprechend der Größe aller klonierten FVIII-Domänen nachweisbar. Die A1 (37.6 kDa), A2 (36.5 kDa) und A3 Domäne (40.2 kDa) wurden gut, C1 (14.8 kDa) und C2 (15.8 kDa) deutlich schwächer exprimiert. Eine deutliche Expression der C1- und C2-Domäne war nach Verdopplung der Expositionszeit des Western Blots nachweisbar (**Abb. 3.7 C**).

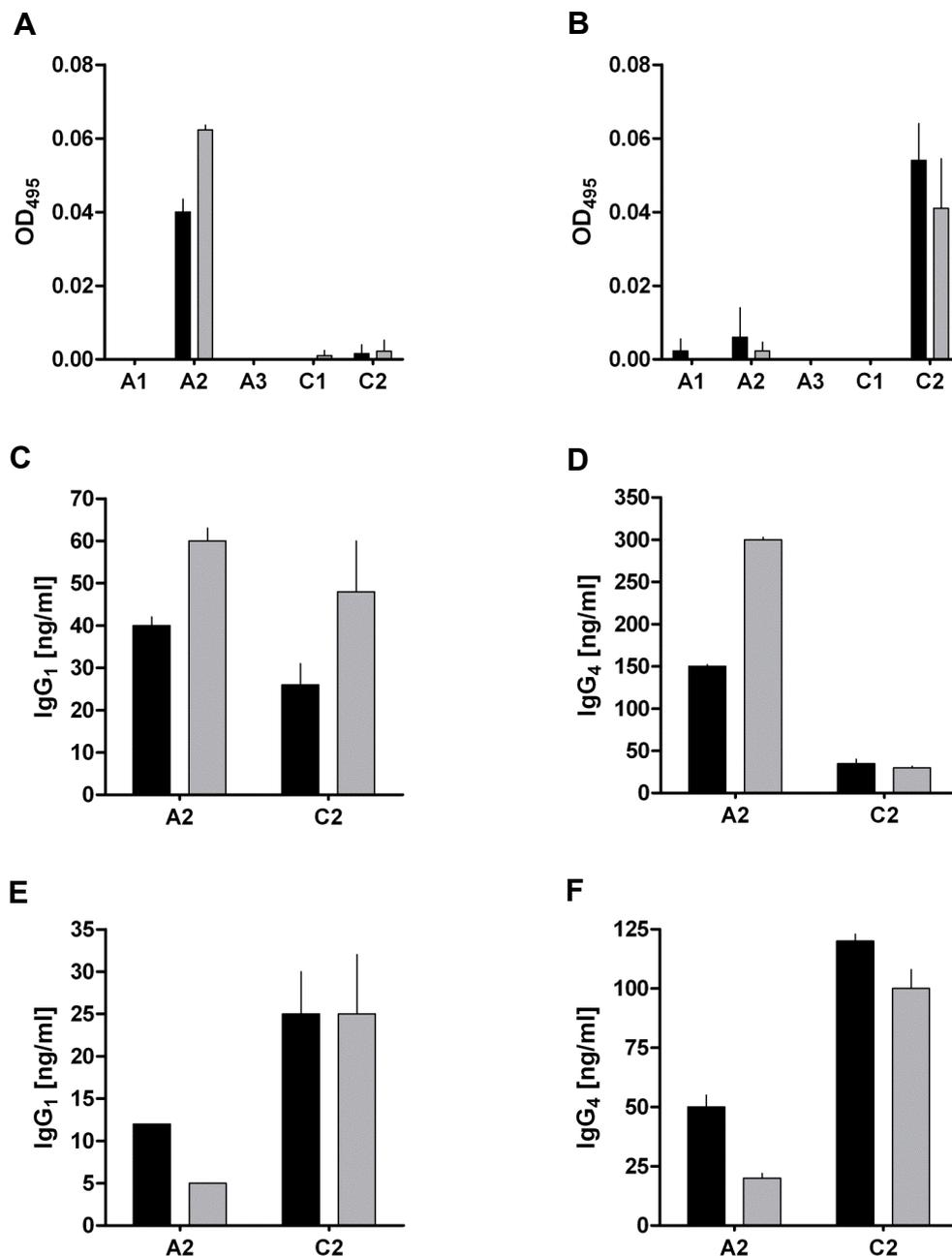
Für eine Analyse der Domänen-Spezifität der anti-FVIII Antikörper im Patientenplasma musste zunächst eine annähernde konformationelle Übereinstimmung zwischen den einzeln exprimierten Domänen und deren Struktur im FVIII-Protein nachgewiesen werden. Hierzu wurde die Bindung von A1-, A2-, A3-, C1- sowie C2-spezifischen, murinen, monoklonalen Antikörpern an die einzelnen FVIII-Domänen im ELISA überprüft. Für alle Domänen konnte dabei eine Reaktivität mit den monoklonalen Antikörpern nachgewiesen werden. Die 6xHis-Markierung der Domänen wurde nur unter reduzierenden Bedingungen im Western Blot von entsprechenden Antikörpern erkannt und eignete sich daher nicht zur Aufreinigung und Quantifizierung der exprimierten Proteine.



**Abb. 3.7 Klonierung und Expression einzelner FVIII-Domänen.** (A) Schematisch ist die Vorbereitung des Vektors 364H sowie die Klonierung der FVIII-Domänen dargestellt. (B) PCR-Produkte der FVIII-Domänen A1, A2, A3, C1 und C2 wurden vor der Klonierung in pEF-IRESp-S10 auf einem Agarosegel analysiert und aufgereinigt. (C) Die Konstrukte pEF-IRESp-F8A1, -F8A2, -F8A3, -F8C1, -F8C2 wurden in 293T-Zellen transfiziert und die Proteinexpression von Einzelklonen in den Kulturüberstand im Western Blot mittels eines anti-6xHis Antikörpers detektiert. Es sind die entsprechenden Blots nach einer Expositionszeit von 30 Sekunden sowie einer Minute dargestellt.

Eine relative Konzentrationsangleichung der einzelnen Domänen in Kulturüberständen erfolgte mittels der monoklonalen Antikörper anhand einer FVIII-Eichgerade im ELISA. In der Folge wurde die Reaktivität von IgG in Patientenplasmen mit den einzelnen Domänen untersucht. IgGs in den gestesteten Plasmaproben A (23 BE/ml) und B (38 BE/ml) von Patient 1 wiesen eine Bindung an die A2-Domäne auf ( $p < 0.003$ ), deren Intensität mit den gemessenen inhibitorischen Aktivitäten korrelierte (**Abb. 3.8 A**). Außerdem konnte eine schwache, nicht signifikante Reaktivität mit der C1- und C2-Domäne beobachtet werden. IgGs in den Plasmaproben A (60 BE/ml) und B (26 BE/ml) von Patient 2 zeigten eine starke Reaktivität mit der C2-Domäne ( $p < 0.006$ ), wobei die Bindungsintensität, wie schon für Patient 1 beobachtet, mit dem Inhibitortiter korrelierte (**Abb. 3.8 B**). Zudem konnten nicht signifikante, schwache Bindungen an die A1- und A2-Domäne detektiert werden. Diese

Ergebnisse entsprachen somit den durch die *in silico*-Epitopkartierungen vorgegebenen Domänenspezifitäten der anti-FVIII Antikörper in den Patientenplasmen.



**Abb. 3.8 Domänen-Spezifität der anti-FVIII Antikörper in Patientenplasmen.** Es ist die Bindung von IgG in den Plasmaproben A (■) und B (▒) der Patienten 1 (3.8 A) und 2 (3.8 B) an die einzelnen FVIII-Domänen dargestellt. Weiterhin ist die Bindung von IgG<sub>1</sub> und IgG<sub>4</sub> in den Plasmaproben A (■) und B (▒) der Patienten 1 (3.8 C, D) und 2 (3.8 E, F) an die A2 und C2-Domäne gezeigt.

Entsprechend den bereits vorgenommenen Untersuchungen hinsichtlich FVIII-spezifischer Subklassenverteilungen (Abb. 3.2), wurde die Erkennung der A2- sowie C2-Domäne durch

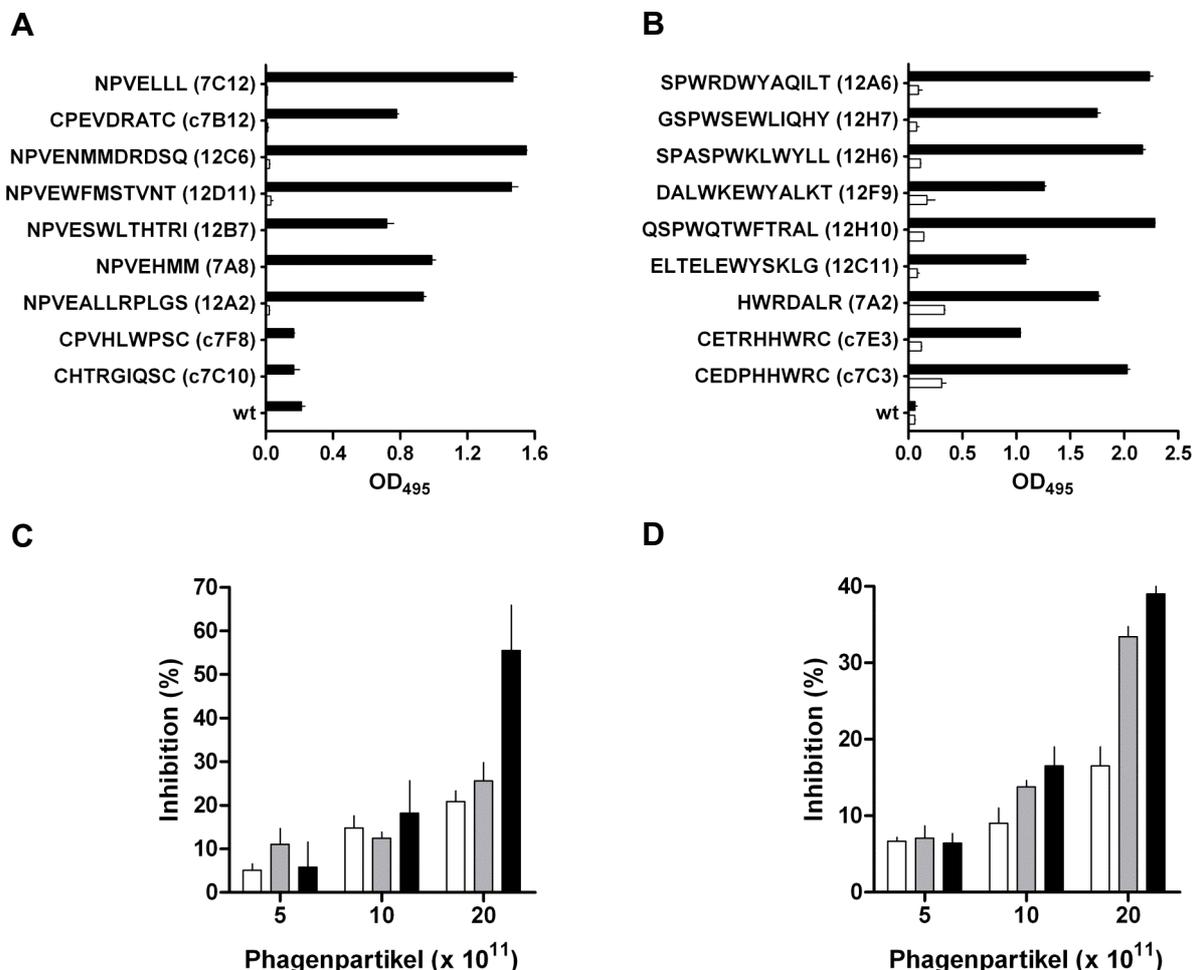
IgG<sub>1</sub> sowie IgG<sub>4</sub> in den Patientenplasmen analysiert. Vor und nach Therapie erfolgte die Erkennung der A2-Domäne im Plasma von Patient 1 primär durch IgG<sub>4</sub> ( $p < 0.001$ ; **Abb. 3.8 D**). IgG<sub>1</sub> wies sowohl vor als auch nach erfolgter B-Zell Depletion eine deutlich schwächere Reaktivität mit der A2-Domäne auf (**Abb. 3.8 C**). Vor Therapie wurde diese von IgG<sub>1</sub> gegenüber der C2-Domäne zudem signifikant besser erkannt ( $p = 0.0145$ ). Nach Therapie war dies nicht der Fall. Auch in den analysierten Plasmen von Patient 2 wurde die C2-Domäne primär von IgG<sub>4</sub> gebunden ( $p < 0.002$ ; **Abb. 3.8 F**). IgG<sub>1</sub>-Antikörper zeigten eine deutlich geringere Reaktivität mit den Domänen, wobei das Bindungsprofil aber dem von IgG<sub>4</sub> entsprach (**Abb. 3.8 E**). Die Subklassenverteilung von IgG<sub>1</sub> und IgG<sub>4</sub> auf der A2- und C2-Domäne im Plasma beider Patienten entsprach den relativen FVIII-spezifischen Subklassenverläufe (**Abb. 3.2. A, B**). Lediglich die relative Verteilung von IgG<sub>4</sub> im Plasma von Patient 1 vor und nach Therapie korrelierte nicht mit den auf den Domänen detektierten Verhältnissen.

### 3.1.8 Selektierte Phagenklone binden anti-FVIII Antikörper

Neben der Verwendung von rekombinanten Domänen wurden die selektierten Phagenklone für eine Bestätigung der *in silico* generierten Epitopdaten eingesetzt. Hierzu wurden aus der Menge der selektierten Klone zunächst über vergleichende Bindungsstudien die Phagenklone mit der stärksten Reaktivität mit IgG in den Patientenplasmen ausgewählt. Anschließend wurden diese Klone auf ihre Fähigkeit hin überprüft, die Antikörper-Bindung an FVIII zu blockieren.

Aus den ELISA-positiven Phagenklonen der durchgeführten Biopannings wurden basierend auf deren initialen Absorptionswerten ( $OD_{495}$ ) sowie Sequenzanalysen Klone für weitere Tests ausgewählt. Diese wurden zunächst in *E.coli* vermehrt und aufgereinigt. Im Anschluss wurde eine definierte Phagenpartikel-Konzentration ( $10^9/\mu\text{l}$ ) je Klon immobilisiert und im ELISA auf Reaktivität mit IgG in Patienten- sowie Normalplasma getestet. Alle Phagenklone aus den Biopannings mit Plasmen von Patient 1, welche das NPVE-Konsensusmotiv aufwiesen, zeigten deutliche Reaktivität mit IgG in den autologen Plasmen ( $p < 0.002$ ; **Abb. 3.9 A**). Auch für den Phagenklon c7B12, dessen präsentiertes Peptid einen Teil des Konsensusmotivs beinhaltete, war eine deutliche Bindung von IgG im Plasma von Patient 1 zu beobachten ( $p = 0.0013$ ). Die Aminosäuren, welche neben dem Konsensusmotiv in den phagenpräsentierten Peptiden auftraten, schienen die IgG-Bindung maßgeblich zu beeinflussen. Allerdings war hierfür kein Muster zu beobachten. Phagenklon 12C6 wies die

beste Bindung an IgG im Plasma von Patient 1 auf ( $p=0.001$ ), gefolgt von Klon 7C12 ( $p=0.002$ ). Phagenklon 12C6 wurde aus Biopannings mit pH-shift Elution isoliert, während Klon 7C12 in Screenings mit kompetitiver Elution auftrat. Beide Klone wurden für weiterführende Tests ausgewählt. Die Reaktivitäten der übrigen getesteten Klone waren deutlich geringer. Für die Klone c7F8 und c7C10 war keine spezifische Bindung detektierbar. Die Phagenklone, 12A6, 12H6 und 12H10 welche aus dem Screening mit Plasmaprobe B von Patient 2 isoliert wurden, zeigten die stärkste Reaktivität mit IgG in den Plasmen ( $p<0.001$ ; **Abb. 3.9 B**). Keiner dieser Klone wies das am häufigsten selektierte WESW-Motiv auf. Die Klone 12H6 sowie 12H10 wurden mit pH-shift Elution selektiert, während Klon 12A6 aus Biopannings mit kompetitiver Elution hervorging. Klon 12A6 und 12H10 wurden für weitere Analysen ausgewählt.



**Abb. 3.9 Funktionalität einzelner Phagotope.** (A, B) Es ist die Reaktivität selektierter Phagenklone mit IgG in Patienten- (■) sowie Normalplasma (□) gezeigt. Ausgewählte Phagenklone aus den Biopannings mit Plasmen von Patient 1 (A) sowie Patient 2 (B) wurden mit autologen Plasmen getestet. Der M13-Wildtyp (wt), welcher kein Peptid präsentiert, fungierte als Kontrolle. (C) Es ist die Blockierung der Antikörper-Bindung an FVIII in Plasma von Patient 1 durch die Phagenklone 12C6 (■), 7C12 (▒) sowie den M13-Wildtyp (□) gezeigt. (D) Es ist die Inhibition der FVIII-Bindung von anti-FVIII IgG in Plasma von Patient 2 durch die Phagenklone 12H10 (■), 12A6 (▒) und den Wildtypphagen (□) dargestellt.

In direkten Inhibitionstests wurden die Phagen zur Blockierung der Antikörper-Bindung an FVIII eingesetzt. Patientenplasma wurde mit ansteigenden Phagenpartikel-Konzentrationen von  $5 \cdot 10^{11}$  bis  $2 \cdot 10^{12}$  je 100 $\mu$ l-Ansatz gemischt und präinkubiert. Im Anschluss wurde die Bindung von IgG im Patientenplasma an immobilisierten FVIII detektiert. Eine maximale, getestete Konzentration von  $2 \cdot 10^{10}$  pfu/ $\mu$ l bewirkte eine effektive Blockierung der IgG-Bindung an FVIII durch Präinkubation der Plasmen von Patient 1 bzw. 2 mit den Phagenklonen 12C6 sowie 12H10 ( $p < 0.03$ ). Trotz der beobachteten, guten Bindung von IgG im Patientenplasma von Patient 1 durch Phagenklon 7C12, war mittels dieses Klons gegenüber dem M13-Wildtyp keine signifikant höhere Inhibition der Antikörper-Bindung an FVIII möglich (**Abb. 3.9 C**). Die Inhibition von anti-FVIII Antikörpern im Plasma von Patient 2 durch Klon 12A6 entsprach zwar den zuvor beobachteten Bindungseigenschaften von IgG im Patientenplasma, war letztlich jedoch signifikant geringer als die durch Klon 12H10 erzielten Werte ( $p = 0.021$ ; **Abb. 3.9 D**).

Die Klone 12C6 und 12H10 fungierten demnach als Phagotope für anti-FVIII Antikörperepitope dar, indem die präsentierten Peptide für eine Antikörperbindung relevante Bereiche der Epitope scheinbar am Besten nachstellen. Die Inhibitionsversuche wurden nicht nur zur Verifizierung der Epitopdaten, sondern auch im Hinblick auf die Selektion potenter Peptidliganden durchgeführt. Aufgrund der hohen Kosten für eine synthetische Herstellung von Peptiden, halfen entsprechende funktionelle Tests auf Phagen-Ebene bei der Auswahl der viel versprechenden Peptidliganden 12C6 und 12H10.

### **Zusammenfassung von Abschnitt 3.1**

Mittels Biopanning konnten durch Screening von randomisierten, Phagen-präsentierten Peptidbibliotheken mit ausgewählten FVIII-Inhibitor-positiven HA-Patientenplasmen Phagenklone isoliert werden, welche spezifisch mit Antikörpern in den Patientenplasmen reagierten. Die unter den Peptidsequenzen identifizierten Konsensusmotive konnten mittels *in silico*-Analysen Bereichen auf der Kristallstruktur von FVIII zugeordnet werden. Die Bestätigung der Domänenspezifität der so generierten Epitopkartierungen erfolgte mittels Bindungsstudien an rekombinant exprimierte FVIII-Domänen. Eine weitere Bestätigung der Beteiligung der identifizierten Aminosäuren an anti-FVIII Antikörperepitopen erfolgte durch den Nachweis des Phagotop-Charakters der selektierten Phagenklone 12C6 und 12H10 in Inhibitionsstudien.

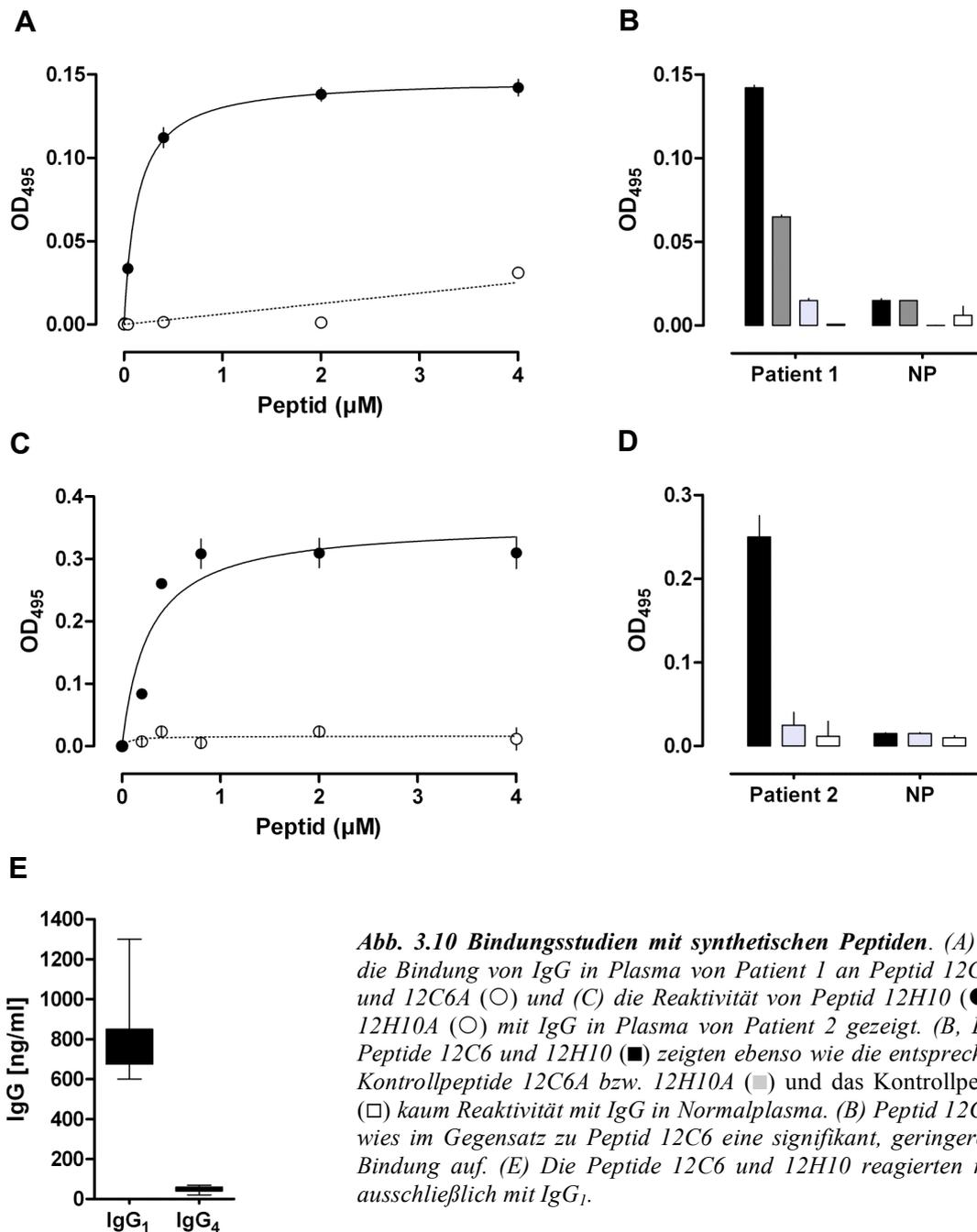
### 3.2 Synthetische Peptidliganden für FVIII-Inhibitoren

Aus den Biopannings mit FVIII-Inhibitor-positiven Plasmen konnte eine Vielzahl von Phagenklonen selektiert werden, welche spezifisch mit IgG aus den Patientenplasmen reagierten und zudem Konsensusmotive aufwiesen. Von diesen Phagenklonen erwiesen sich die Klone 12C6 und 12H10 in weiteren Bindungs- sowie Inhibitionsstudien als besonders effektiv. Der nächste Schritt bei der Charakterisierung der Liganden bestand in deren Einsatz ohne die präsentierenden Phagen. Zu diesem Zweck wurden die selektierten Peptide synthetisch hergestellt und in funktionellen Tests auf ihre Fähigkeit zur Bindung sowie Blockierung von FVIII-Inhibitoren analysiert.

#### 3.2.1 Synthetische Peptide binden IgG in Patientenplasma

Basierend auf den Daten aus der Selektion potenter Phagenklone (**Abb. 3.9**) wurden synthetischen Peptide korrespondierend zu den präsentierten Peptiden auf der Oberfläche der Klone 12C6 und 12H10 generiert und deren Eigenschaften als Liganden für FVIII-Inhibitoren analysiert. Analog zu den Bindungsexperimenten mit ausgewählten Phagenklonen wurde die Bindung von IgG im Patientenplasma durch die synthetischen Peptide 12C6 und 12H10 getestet. Die Peptide wurden über einen S(G)<sub>3</sub>S-Spacer mit einer 6x-His-Markierung versehen, um eine gute Immobilisierung der Peptide bei gleichzeitig ausreichender Flexibilität zur Einnahme, für eine IgG-Bindung entscheidender, Konformationswechsel zu gewährleisten. In allen Experimenten mit den Peptiden 12C6 und 12H10 fungierten das duodecamere Peptid C, korrespondierend zu dem S(G)<sub>3</sub>S-Spacer zwischen 6xHis-Markierung sowie die Peptide 12C6A und 12H10A, in welchen die jeweiligen Kernmotive (NPVE bzw. WQTW) durch Alanine ersetzt wurde, als Kontrollen.

Für IgG-Bindungsstudien wurden die Peptide über einen anti-6xHis-Antikörper auf ELISA-Platten immobilisiert und deren Reaktivität mit Antikörpern in den Patientenplasmen detektiert. Die Peptide 12C6 und 12H10 zeigten dabei eine spezifische, konzentrationsabhängige Reaktivität (0-4µM) mit IgG in den Plasmen der Patienten 1 und 2 ( $p < 0.001$ ; **Abb. 3.10 A, C**). Es wurde keine Bindung von Antikörpern aus Normalplasma durch die verwendeten Peptide beobachtet. Antikörper im Plasma von Patient 1 zeigten bei der höchsten verwendeten Peptidkonzentration von 4µM eine schwache Reaktivität mit dem Kontrollpeptid 12C6A (**Abb. 3.10 A**). Durch das Kontrollpeptid 12H10A wurde kein IgG im Plasma von Patient 2 gebunden (**Abb. 3.10 C**). Keines der verwendeten Plasmen wies Reaktivität mit dem Kontrollpeptid C auf (**Abb. 3.10 B, D**).



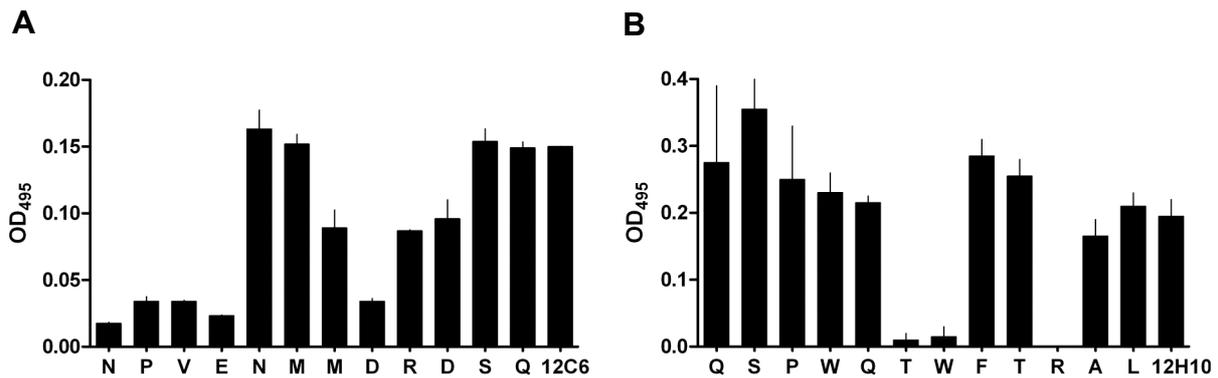
Aufgrund des wiederholten Auftretens des NP1E-Motivs unter den kompetitiv eluierten Phagenklonen aus den Screenings mit Plasma von Patient 1, sowie den identifizierten Homologien zwischen dem NP1E-Motiv und Aminosäuren in der A2-Domäne von FVIII, wurde Valin an Position drei von Peptid 12C6 durch Isoleucin ersetzt (V<sup>3</sup>I, 12C6I). Somit sollten die für eine IgG-Bindung offenbar günstigen, übrigen Aminosäuren in Peptid 12C6 mit einer noch größeren Sequenzanalogie zum nativen Antigen kombiniert werden. Allerdings wurde dadurch keine Steigerung der IgG-Bindungs Kapazität durch das Peptid

erreicht. Vielmehr reduzierte der Aminosäurenaustausch die Antikörperbindung um mehr als 50% ( $p < 0.001$ ; **Abb. 3.10 B**). Studien zur Subklassenspezifität der Peptide ergaben, dass sowohl Peptid 12C6 als auch 12H10 eine starke Reaktivität mit IgG<sub>1</sub> in einer Vielzahl getesteter Patientenplasmen aufwiesen. Daneben wurde nur sehr schwache Reaktivität mit IgG<sub>4</sub> und keine Bindung von IgG<sub>2</sub> und IgG<sub>3</sub> detektiert.

### 3.2.2 Die IgG-Bindung erfolgt primär durch die Aminosäuren der Konsensusmotive

In Zusammenhang mit bereits durchgeführten Experimenten wurde bisher mehrfach über die Rolle der auf die Konsensusmotive folgenden Aminosäuren bei der IgG-Bindung spekuliert (**Abb. 3.9**, **Abb. 3.10 B**). Zur Untersuchung der Relevanz des NPVE- bzw. des WTQW-Motivs sowie der übrigen Aminosäure der Peptide 12C6 und 12H10 für eine Antikörperbindung, wurden alle Aminosäuren einzeln gegen Alanin ausgetauscht (*Alanine Scan*). Alle damit generierten Varianten der Peptide 12C6 und 12H10 wurden in der Folge auf IgG-Bindung in den Plasmen der Patient 1 und 2 untersucht.

Aus dem Alanine Scan von Peptid 12C6 ging hervor, dass schon der Austausch einer Aminosäure des NPVE-Motivs (N<sup>1</sup>, P<sup>2</sup>, V<sup>3</sup>, E<sup>4</sup>) die Antikörperbindung durch das Peptid drastisch reduzierte (**Abb. 3.11 A**). Die stärkste Reduktion wurde durch den Austausch von N<sup>1</sup> gegen Alanin erreicht ( $p = 0.002$ ). Außerdem führte der Ersatz von D<sup>8</sup> zu einer deutlichen Verringerung der Antikörper-Bindung, während der Austausch von M<sup>7</sup>, R<sup>9</sup> sowie D<sup>10</sup> die IgG-Bindung ebenfalls beeinträchtigte ( $p < 0.05$ ). Somit beeinflussen auch Aminosäuren außerhalb des Konsensusmotivs die IgG-Bindung stark. Der Alanine Scan von Peptid 12H10 zeigte, dass der Austausch von T<sup>6</sup> sowie W<sup>7</sup> eine nahezu vollständige Reduktion der Antikörper-Bindung bewirkte ( $p < 0.003$ ; **Abb. 3.11 B**). Überraschenderweise beeinträchtigte der Ersatz weiterer Aminosäuren des (SP)WxxW(F/Y) Konsensusmotivs wie S<sup>2</sup>, P<sup>3</sup>, W<sup>4</sup>, Q<sup>5</sup> und F<sup>8</sup> die IgG-Bindung nicht ( $p < 0.05$ ). Hingegen erfolgte, wie schon für Peptide 12C6 beobachtet, durch einen Austausch von Aminosäuren außerhalb des Konsensusmotivs (R<sup>10</sup>) eine vollständige Aufhebung der Antikörper-Bindung. Nach dem Ersatz von Q<sup>1</sup> und S<sup>2</sup> durch Alanin wurde eine Zunahme der IgG-Bindung beobachtet, welche jedoch nicht statistisch signifikant war ( $p \geq 0.05$ ).



**Abb. 3.11 Alanine Scan der Peptide 12C6 und 12H10.** Es ist die Bindung von IgG aus Plasma von Patient 1 bzw 2 an die Peptide 12C6 (A) und 12H10 (B) sowie deren Alanine Scan Varianten gezeigt. Die jeweils durch Alanin ersetzte Aminosäure ist auf der x-Achse dargestellt. Die im Text aufgeführte Nummerierung der Aminosäuren erfolgt mit eins beginnend von links nach rechts. Das schon in Peptid 12H10 an Position zwei enthaltene Alanin wurde durch Valin ersetzt.

### 3.2.3 Synthetische Peptide blockieren FVIII-Inhibitoren

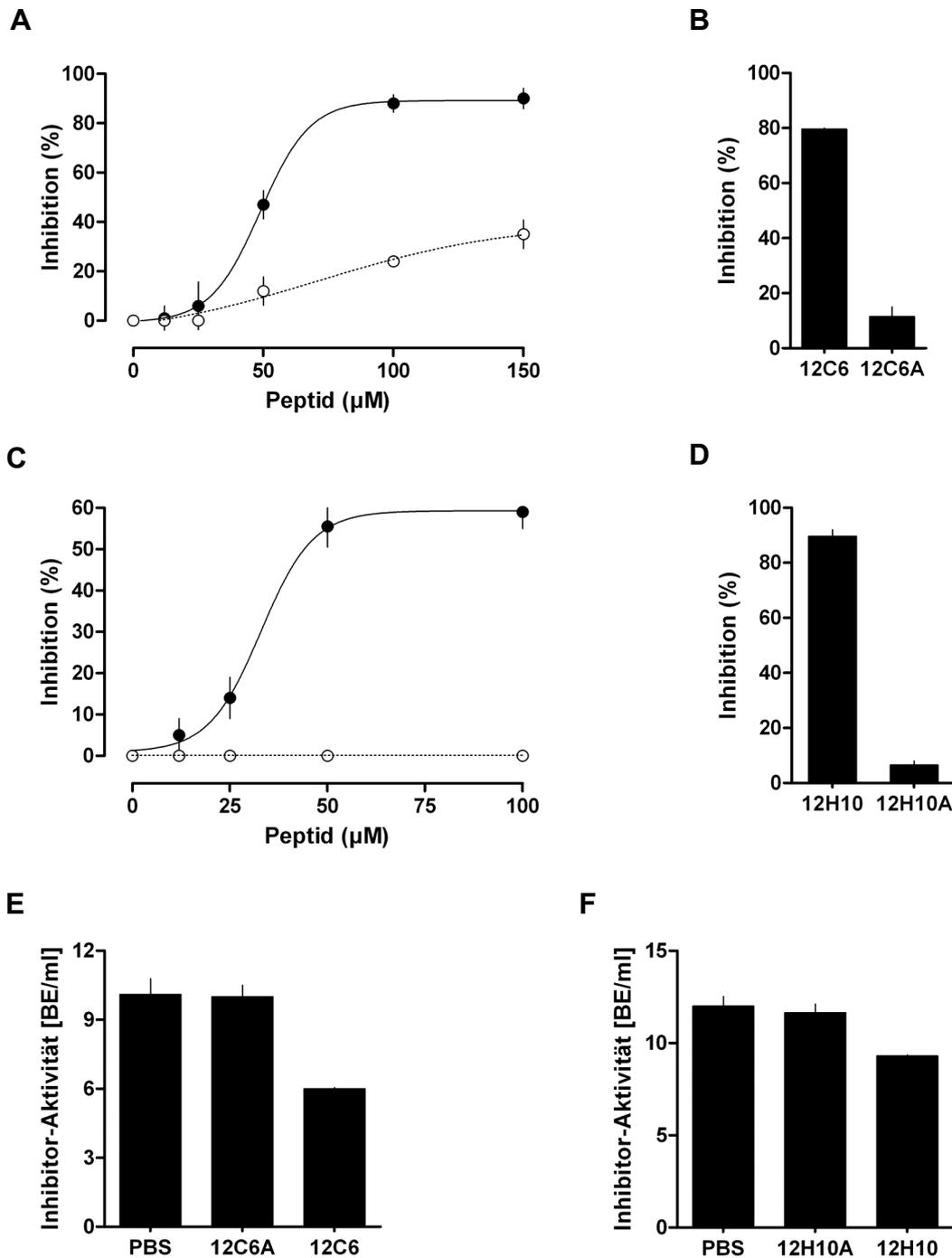
Für die Phagenklone 12C6 und 12H10 wurde in Inhibitionsstudien bereits der Nachweis erbracht, dass es sich bei diesen um Phagotope von anti-FVIII Antikörpererepitopen handelt (**Abb. 3.9 C, D**). Der Mimotop-Charakter der synthetischen Peptidliganden wurde ebenfalls in Inhibitions- bzw. Kompetitionsstudien nachgewiesen. Im Unterschied zu der Präsentation auf der Phagenoberfläche oder punktueller Oberflächenfixierung in den beschriebenen Bindungsstudien (**Abb. 3.10, 3.11**) lagen die Peptidliganden in Inhibitionsstudien frei in wässriger Lösung vor. Unter diesen Bedingungen galt es zu zeigen, dass die duodecameren Peptide 12C6 und 12H10 die Bindung von anti-FVIII Antikörpern an FVIII sowie dessen einzelne, rekombinant exprimierte Domänen blockieren können. Ferner sollte der Nachweis für eine Bindung von inhibitorischen anti-FVIII Antikörper durch die selektierten Liganden erbracht werden.

Inhibitionsstudien von anti-FVIII Antikörpern wurden analog zu den bereits beschriebenen Untersuchungen mit einzelnen Phagenklonen durchgeführt. Im ELISA wurde die Blockierung der Bindung von IgG in Patientenplasma an immobilisierten FVIII durch synthetische Peptide prozentual ermittelt (**Abb. 3.12 A, C**). Die Peptide 12C6 und 12H10 inhibierten die FVIII-Bindung von Antikörpern in den Plasmen von Patient 1 bzw. 2 konzentrationsabhängig. Ab einer Konzentration des Peptides 12C6 von 100 $\mu$ M wurde die IgG-Bindung in Plasma von Patient 1 nahezu vollständig inhibiert, eine halbmaximale Inhibition war bei einer mittleren inhibitorischen Konzentration (IC<sub>50</sub>) von 50 $\mu$ M erreicht (p=0.003; **Abb. 3.12 A**). Allerdings wurden auch durch das Kontrollpeptid bei maximaler, getesteter Peptidkonzentration von

150 $\mu$ M eine Blockierung der Antikörper-Bindung von knapp 40% beobachtet. Bei einer maximalen 12C6-Konzentration von 150 $\mu$ M wurde eine 80%ige Inhibition der IgG-Bindung in Plasma von Patient 1 an die rekombinant exprimierte A2-Domäne beobachtet, während die Inhibition durch das Kontrollpeptid 12C6A bei 10% lag ( $p=0.002$ ; **Abb. 3.12 B**). Eine Blockierung der Antikörperbindung an die rekombinant exprimierte C2-Domäne in Plasma von Patient 2 durch Peptid 12C6 war nicht detektierbar. Durch Peptid 12H10 wurde bereits ab einer Konzentration von 50 $\mu$ M die maximale Inhibition von 60% der FVIII-Bindung durch Antikörper im Plasma von Patient 2 beobachtet, während die  $IC_{50}$  bei ca. 30 $\mu$ M lag ( $p=0.001$ ; **Abb. 3.12 C**). Das Kontrollpeptid 12H10A beeinträchtigte die Antikörper-Bindung an FVIII nicht. Bei einer maximalen 12H10-Konzentration von 150 $\mu$ M wurde eine 90%ige Inhibition der IgG-Bindung in Plasma von Patient 1 an die rekombinant exprimierte C2-Domäne detektiert, während die Inhibition durch das Kontrollpeptid 12H10A bei ca. 6% lag ( $p<0.02$ ; **Abb. 3.12 D**). Eine Blockierung der Antikörperbindung in Plasma von Patient 2 an die rekombinant exprimierte A2-Domäne durch Peptid 12H10 war nicht detektierbar. Wie bereits schon für die Phagenklone 12C6 und 12H10 gezeigt werden konnte, blockierten demnach auch die korrespondierenden Peptide 12C6 und 12H10 spezifisch die Bindung von anti-FVIII Antikörpern an das Antigen.

Durch Zugabe der Peptide zu Inhibitor-positivem Plasma wurden deren Auswirkungen auf die gemessenen FVIII-Restaktivitäten und damit die Wirkung inhibitorischer Antikörper beobachtet. Im Bethesda-Test wurden die Peptide 12C6 und 12H10 sowie die entsprechenden Kontrollpeptide in einer Konzentration von 1mM mit Patientenplasmen gemischt, welche nach vorheriger Verdünnung eine FVIII-Restaktivität von ca. 50% aufwiesen, was einer inhibitorischen Aktivität von ca. 1BE/ml entsprach. Nach Zusatz von Normalplasma wurde anhand der stattfindenden Koagulation die FVIII-Restaktivität ermittelt, wodurch sich die inhibitorische Aktivität der Antikörper in den Patientenplasmen errechnen ließ. Im Gegensatz zu den entsprechenden Kontrollpeptiden reduzierten sowohl Peptid 12C6 als auch 12H10 die inhibitorische Aktivität in Plasmen von Patient 1 und 2 ( $p<0.01$ ; **Abb. 3.12 E, F**). Die detektierte inhibitorische Aktivität im Plasma von Patient 1 lag ohne Zugabe von Peptid sowie nach Zusatz des Kontrollpeptids 12C6A bei 10 BE/ml, nach Inkubation mit Peptid 12C6 bei 6 BE/ml (**Abb. 3.12 E**). Dies entspricht einer Anhebung der FVIII-Restaktivität von 0.2 auf 4.5%. Peptid 12H10 reduzierte die inhibitorische Aktivität im Plasma von Patient 2 von 12 auf 9 BE/ml (**Abb. 3.12 F**). Dies entspricht einem nur geringen Anstieg der detektierten FVIII-Restaktivität von 0.17 auf 0.3%. Gemäß den hier gezeigten Ergebnissen blockieren die synthetischen Peptide 12C6 und 12H10 die Bindung von FVIII-Inhibitoren an

FVIII und stellen demnach Mimotope für Epitope inhibitorischer Antikörper in den Plasmen von Patient 1 und 2 dar.



**Abb. 3.12 Inhibitionsstudien mit den Peptiden 12C6 und 12H10.** (A) Es ist die Blockierung der Antikörperbindung in Plasma von Patient 1 durch Peptid 12C6 (●) sowie Kontrollpeptid 12C6A (○) an immobilisierten FVIII gezeigt. (B) Peptid 12C6 blockierte in Plasma von Patient 1 die IgG-Bindung an die rekombinant expremierte A2-Domäne. (C) Es ist die Inhibition der FVIII-Bindung von anti-FVIII IgG in Plasma von Patient 2 durch Peptid 12H10 (●) sowie 12H10A (○) dargestellt. (D) Peptid 12H10 inhibierte eine Bindung von IgG in Plasma von Patient 2 an die rekombinant expremierte C2-Domäne. In Bethesda-Tests wurde die Auswirkungen von Peptid 12C6 sowie 12H10 auf die in Plasmen von Patient 1 (C) bzw. 2 (D) detektierte inhibitorische Aktivität ermittelt.

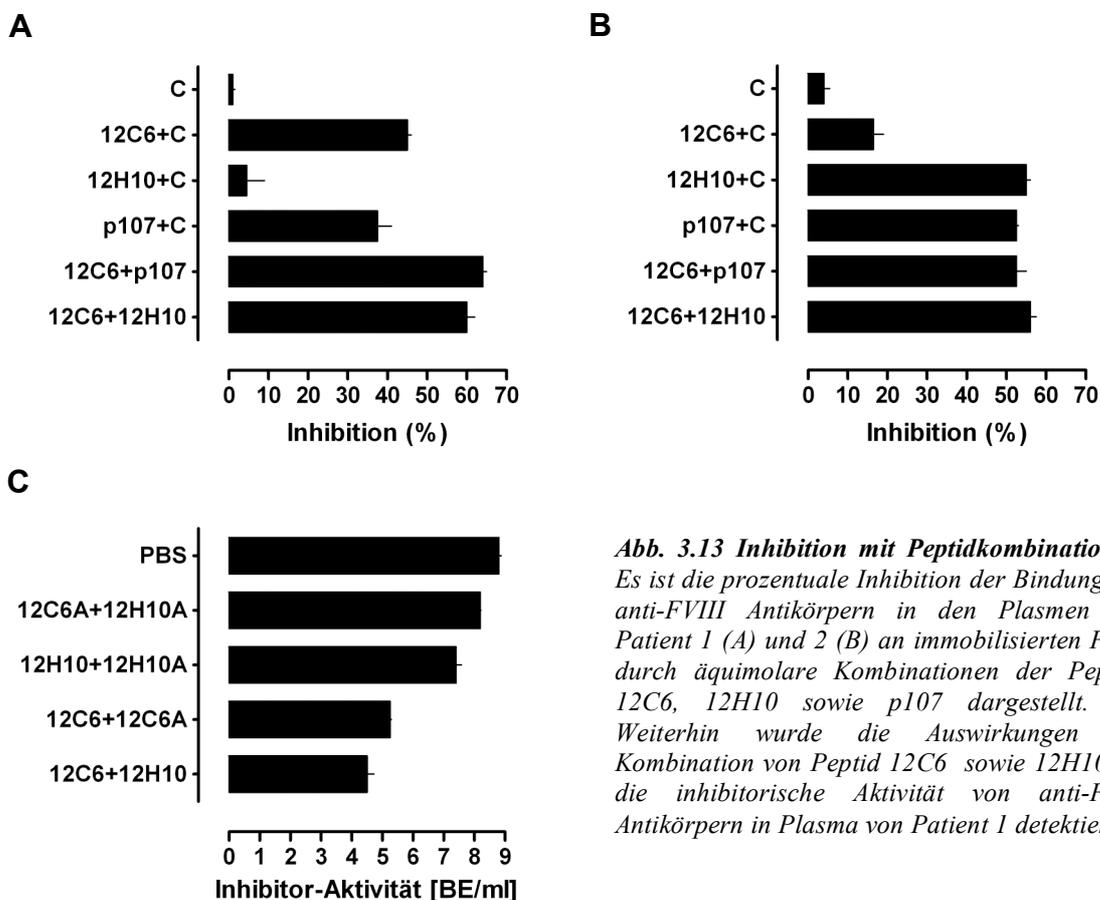
### 3.2.3 Die Kombination von Peptiden verbessert deren Inhibitionseigenschaften

Die Peptide 12C6 und 12H10 stellen Mimotope für A2- und C2-Inhibitorepitope dar. Die Möglichkeit einer effektiveren Blockierung solcher Antikörper in den polyklonalen Patientenplasmen durch Peptidkombinationen sollte in Inhibitionstudien in ELISA und Bethesda-Test analog zu bereits beschriebenen Experimenten mit einzelnen Peptiden analysiert werden.

Die Peptide 12C6 und 12H10 wurden in äquimolaren Verhältnissen (jeweils 100 $\mu$ M) gemischt und mit Plasmen der Patienten 1 und 2 inkubiert. Im Anschluss wurde die verbliebene IgG-Bindung an immobilisierten FVIII detektiert. Ergänzend wurde das Peptid p107 in Kombination mit Peptid 12C6 getestet. Übereinstimmend mit den bereits gezeigten Inhibitionstests (**Abb. 3.12 A**) wurde die IgG-Bindung an FVIII in Plasma von Patient 1 durch Peptid 12C6 in einer Konzentration von 200 $\mu$ M zu 50% reduziert ( $p=0.003$ ; **Abb. 3.13 A**). Das Kontrollpeptid C (1%) sowie Peptid 12H10 (4.5%) wiesen kaum Blockierung der Antikörperbindung auf ( $p<0.01$ ). Nahezu 40% der IgG-Bindung an FVIII wurden hingegen durch Peptid p107 blockiert ( $p<0.007$ ). Entsprechend wurde durch Kombination von Peptid 12C6 und p107 die deutlichste Steigerung der Inhibition erreicht ( $p=0.03$ ; 64%). Trotz lediglich geringfügiger Inhibition durch Peptid 12H10 konnte in Kombination mit Peptid 12C6 die Blockierung von anti-FVIII Antikörpern ebenfalls gesteigert werden ( $p=0.041$ ; 59%). Die erzielten Inhibitionen durch die getesteten Peptidkombinationen entsprachen allerdings nicht einer Aufsummierung der Inhibitionen durch die einzelnen Peptide. Die Bindung von anti-FVIII Antikörper im Plasma von Patient 2 an FVIII wurde durch Peptid 12H10, ähnlich wie schon zuvor beobachtet (**Abb. 3.12 C**), zu 55% inhibiert ( $p=0.001$ ; **Abb. 3.13 B**). Nahezu gleichwertig wurde die Antikörper-Bindung durch das Peptid p107 blockiert ( $p=0.0021$ ; 52.5%). Das Kontrollpeptid C (4%) sowie Peptid 12C6 (16.5%) wiesen eine deutlich geringere Inhibition der IgG-Bindung auf ( $p<0.03$ ). Die Kombination der Peptide 12C6 und p107 resultierte in keiner signifikanten Steigerung der Inhibition (52.5%). Dies war ebenso für eine Kombination der Peptide 12C6 und 12H10 (56%) zutreffend.

Da durch Kombination der Peptide 12C6 und 12H10 eine Steigerung der Inhibition der FVIII-Bindung durch IgG in Plasma von Patient 1 erreicht werden konnte, wurden diese Peptide kombiniert in einem Bethesda-Test mit Plasma von Patient 1 eingesetzt, um die Auswirkungen auf die inhibitorische Aktivität im Plasma zu detektieren. Die Peptide 12C6 und 12H10 sowie die entsprechenden Kontrollpeptide 12C6A und 12H10A wurden in äquimolaren Verhältnissen der Konzentration von 1mM mit Plasma des Patienten 1 gemischt und die inhibitorische Aktivität der Antikörper detektiert. Wie schon aus den bereits gezeigten

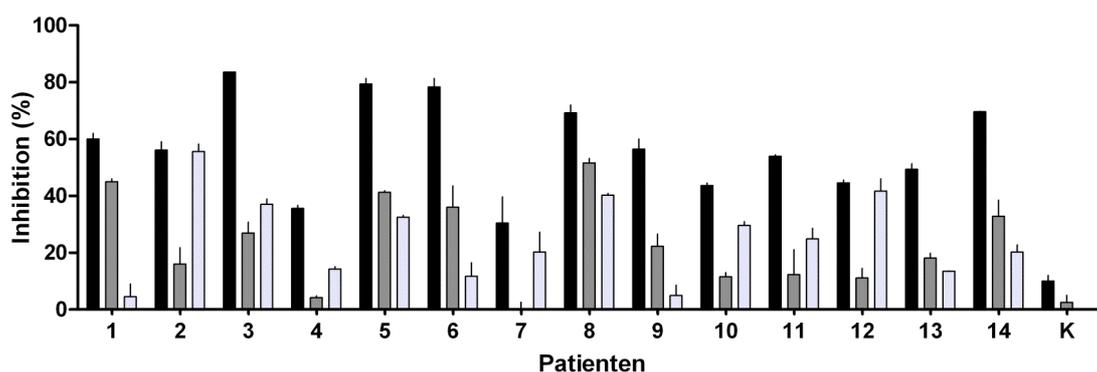
Daten der Bethesda-Tests mit einzelnen Peptiden hervorgeht (**Abb. 3.12 E, F**), reduzierte die Zugabe von Peptid 12C6 zu Plasma von Patient 1 die Inhibitor-Aktivität deutlich ( $p=0.0083$ ; **Abb. 3.13 C**). Gegenüber der Kontrollen mit PBS (8.8 BE/ml) sowie der Kombination der Kontrollpeptide 12C6A und 12H10A (8.2 BE/ml) wurden nach Präinkubation des Plasmas mit Peptid 12C6 eine inhibitorische Aktivität von 5.3 BE/ml gemessen. Die Zugabe von Peptid 12H10 reduzierte die Inhibitor-Aktivität deutlich geringer ( $p=0.02$ ; 7.4 BE/ml), in Kombination mit Peptid 12C6 wurde hingegen die geringste inhibitorische Aktivität detektiert ( $p=0.034$ ; 4.5 BE/ml).



**Abb. 3.13 Inhibition mit Peptidkombinationen.** Es ist die prozentuale Inhibition der Bindung von anti-FVIII Antikörpern in den Plasmen von Patient 1 (A) und 2 (B) an immobilisierten FVIII durch äquimolare Kombinationen der Peptide 12C6, 12H10 sowie p107 dargestellt. (C) Weiterhin wurde die Auswirkungen der Kombination von Peptid 12C6 sowie 12H10 auf die inhibitorische Aktivität von anti-FVIII Antikörpern in Plasma von Patient 1 detektiert.

Im Hinblick auf eine Verwendung der selektierten Mimotope als Basis für therapeutische Ansätze, ist deren Relevanz als generelle Liganden für FVIII-Inhibitoren, deren Einsatz nicht nur auf Antikörper im Plasma von zwei Patienten beschränkt bleibt, von Interesse. Analog zu den bereits gezeigten Experimenten mit Peptidkombinationen (**Abb. 3.13 A, B**) wurde die Inhibition von anti-FVIII Antikörper durch die einzelnen Peptide sowie deren Kombination in einer Reihe von Plasmen verschiedener Inhibitor-positiver HA-Patienten analysiert.

Die Antikörper-Bindung an immobilisierten FVIII wurde in allen getesteten Plasmen durch kombinierte Zugabe von Peptid 12C6 und 12H10 deutlich reduziert ( $p > 0.05$ ; **Abb. 3.14**). Eine 80%ige Inhibition der FVIII-Bindung von Antikörpern in Plasmen der Patienten 3, 5 und 6 wurde durch Zugabe der Peptide 12C6 und 12H10 erreicht. Eine Inhibition der IgG-Bindung an FVIII  $> 50\%$  durch die Kombination der Peptide 12C6 und 12H10 wurde neben Patient 1 und 2 für Plasmen weiterer vier Patienten (8, 9, 11, 14) beobachtet. Im Fall der übrigen fünf Patienten (4, 7, 10, 12, 13) lag die prozentuale Blockierung der FVIII-Bindung durch Antikörper im Plasma zwischen 30 und 50%. Ohne Berücksichtigung einer unspezifischen Inhibition (10%) der Bindung von anti-FIX Antikörpern an immobilisierten FIX durch Peptid 12C6 und 12H10 entsprach in den meisten Fällen die durch kombinierte Zugabe von 12C6 und 12H10 erreichten Inhibitionswerte nicht der Aufsummierung der Inhibitionen durch die einzelnen Peptide. Lediglich für die Blockierung der Antikörper in den Plasmen der Patienten 5, 10 und 12 war dies zutreffend.



**Abb. 3.14 Inhibition mit heterologen Plasmen.** Es ist die prozentuale Inhibition der Bindung von anti-FVIII Antikörpern in den Plasmen von Patient 1 und 2 sowie 12 weiteren Patienten an immobilisierten FVIII durch die Peptide 12C6 (■) und 12H10 (■) sowie deren äquimolare Kombination (■) dargestellt. Als Kontrolle (K) fungierte ein Hämophilie B-Patient mit Inhibitoren gegen FIX.

### Zusammenfassung von Abschnitt 3.2

Die von den Phagenklonen 12C6 und 12H10 präsentierten Peptide zeigten auch als synthetische Peptidliganden spezifische Reaktivität mit IgG in den Plasmen der Patienten 1 und 2. Aminosäuren der jeweiligen Konsensusmotive als auch einzelne Aminosäuren außerhalb dieser sind für eine Antikörperbindung relevant. Die Peptide blockierten die Bindung von IgG an FVIII und die einzelne A2- bzw. C2-Domäne. Ferner reduzierten die Peptide die inhibitorische Aktivität von anti-FVIII Antikörpern in den Patientenplasmen. Die Blockierung von FVIII-Inhibitoren konnte durch Kombination der Peptide gesteigert werden

und die Relevanz der selektierten Peptide 12C6 und 12H10 als generelle, potente Peptidliganden für FVIII-Inhibitoren wurde durch Kreuzreaktivität mit heterologen Plasmen gezeigt.

### 3.3 Optimierung und Stabilisierung der Peptidliganden durch Multimerisierung

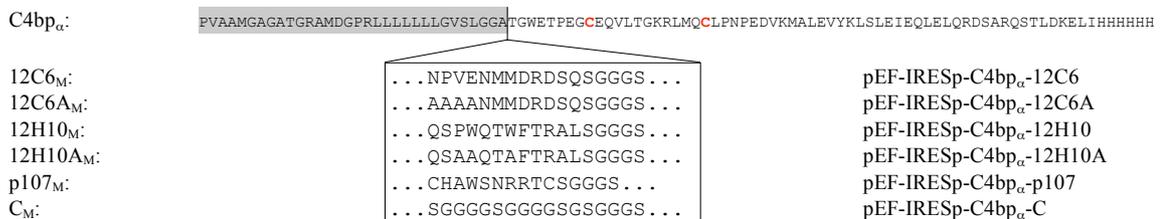
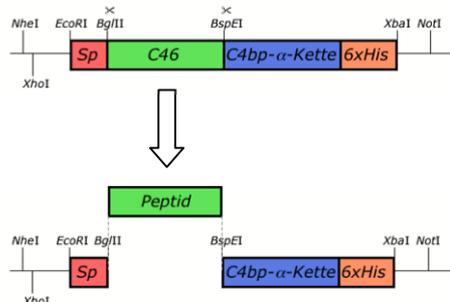
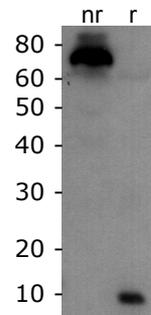
Die Arbeit mit synthetischen Peptiden erweist sich aufgrund deren Instabilität sowie Flexibilität oft als schwierig. Im Zuge der Identifikation von Peptidliganden für FVIII-Inhibitoren sollte ein Konzept erprobt werden, welches eine Stabilisierung der Peptide bei gleichzeitiger Beibehaltung der Spezifität gewährleistet. Hierzu wurden die selektierten Peptide durch Fusion mit der C-terminalen Multimerisierungsdomäne der  $\alpha$ -Kette des humanen, plasmatischen C4-Bindproteins ( $C4bp_\alpha$ ) fusioniert und in Zellkultur in multimerer Form exprimiert.

#### 3.3.1 Durch Fusion an $C4bp_\alpha$ lassen sich die Peptide multimerisieren und binden IgG in Patientenplasmen

Zur Expression der Peptidliganden 12C6 und 12H10 in multimerer Form wurden diese auf DNA-Ebene im eukaryotischen Expressionsvektor 364H $\Delta$ C46 an den N-Terminus von  $C4bp_\alpha$  fusioniert (**Abb. 3.15 A, B**). Hierzu wurden durch Hybridisierung von Oligonukleotiden zunächst dsDNA-Stücke, welche für die Peptide 12C6, 12H10 sowie das Kontrollpeptid C kodierten, hergestellt. Die Peptid-kodierende DNA wurde von den Restriktionsschnittstellen *Bgl*III und *Bsp*EI flankiert. Aus dem Vektor 364H wurde mittels eines *Bgl*III/*Bsp*EI-Restriktionsverdau zunächst das C46-Peptidinsert (48AS, 144bp; Dervillez *et al.*, 2006) entfernt und anschließend die DNA kodierend für die Peptide 12C6, 12H10, 12C6A, 12H10A, p107 bzw. C (12 AS, 36bp; **Abb. 3.15 A**) über die Schnittstellen *Bgl*III und *Bsp*EI eingesetzt. Die Klonierung der Peptidinserts wurde durch einen analytischen Restriktionsverdau sowie Sequenzierung überprüft.

Zur Expression von multimeren Peptiden wurden die Vektoren pEF-IRESp- $C4bp_\alpha$ -12C6, -12C6A, -12H10, -12H10A, -p107 sowie -C jeweils mittels Kalziumphosphat in 293T-Zellen transfiziert. Unter Puromycin wurden resistente Klone selektiert, welche anschließend zur Generierung von Einzelklonen subkloniert wurden. Die Zellkulturüberstände erfolgreich selektierter Einzelklone wurden hinsichtlich der Proteinexpression im Western Blot durch Detektion der 6xHis-Markierung von  $C4bp_\alpha$  mittels eines entsprechenden Antikörpers analysiert. In den Überstände nahezu aller Einzelklone ließ sich die Expression von 6xHis-

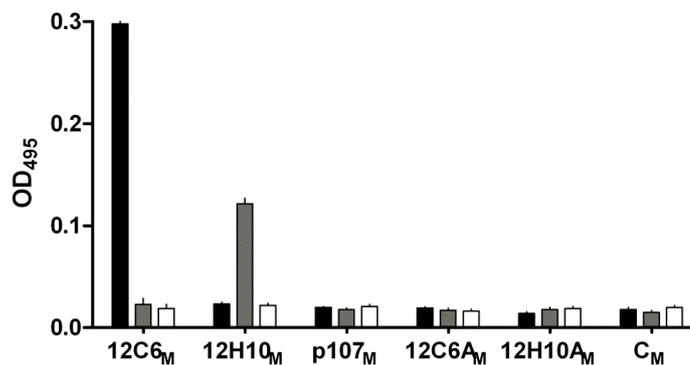
markiertem C4bp $_{\alpha}$  nachweisen (**Abb. 3.15 C**). Gemäß dem verwendeten Proteinstandard lagen die exprimierten Proteine unter nicht-reduzierenden Bedingungen in einer Größe von ca. 70kDa im Zellkulturüberstand vor. Dies entsprach annähernd der Größe in heptamerer Form exprimierter C4bp $_{\alpha}$ -Peptid-Fusionsproteine, wenn für ein Monomer eine Größe von ca. 9.2 kDa angenommen wurde. Dieser Wert ergab sich aus der Summe der Aminosäuren von C4bp $_{\alpha}$  mit 6xHis-Markierung und SG<sub>4</sub>S-Linker (73 AS) sowie dem entsprechenden Peptid (12 AS) unter der Annahme von einer durchschnittlichen Größe von 110 Dalton je Aminosäure. Unter reduzierenden Bedingungen war im Western Blot ab einer  $\beta$ -Mercaptoethanol-Konzentration von 3.5mM eine Bande bei ca. 10 kDa zu detektieren, was in etwa der theoretischen Größe der Peptid-C4bp $_{\alpha}$ -Monomere entsprach.

**A****B****C**

**Abb. 3.15 Fusion von Peptid-kodierender DNA an C4bp $_{\alpha}$  in pEF-IRESp.** (A) Die Peptide wurden zwischen Signalpeptid (grau) und C4bp $_{\alpha}$  kloniert. Die für die Multimerisierung verantwortlichen Cysteine in C4bp $_{\alpha}$  sind rot eingefärbt. (B) Das Schema zeigt den Ersatz des C46-Peptides im Vektor 364H durch die selektierten Peptide. (C) Wie hier exemplarisch gezeigt, wurden in den Zellkulturüberständen aller selektierten Einzelklone im Western Blot unter reduzierenden und nicht-reduzierenden Bedingungen 6xHis-markierte Proteine detektiert.

Neben der Expressionsanalyse im Western Blot wurde die Bindung von Antikörpern in den Plasmen der Patienten 1 und 2 durch die in den Zellkulturüberständen der selektierten Einzelklone enthaltenen, exprimierten Proteine untersucht (**Abb. 3.16**). Hierzu wurden die im

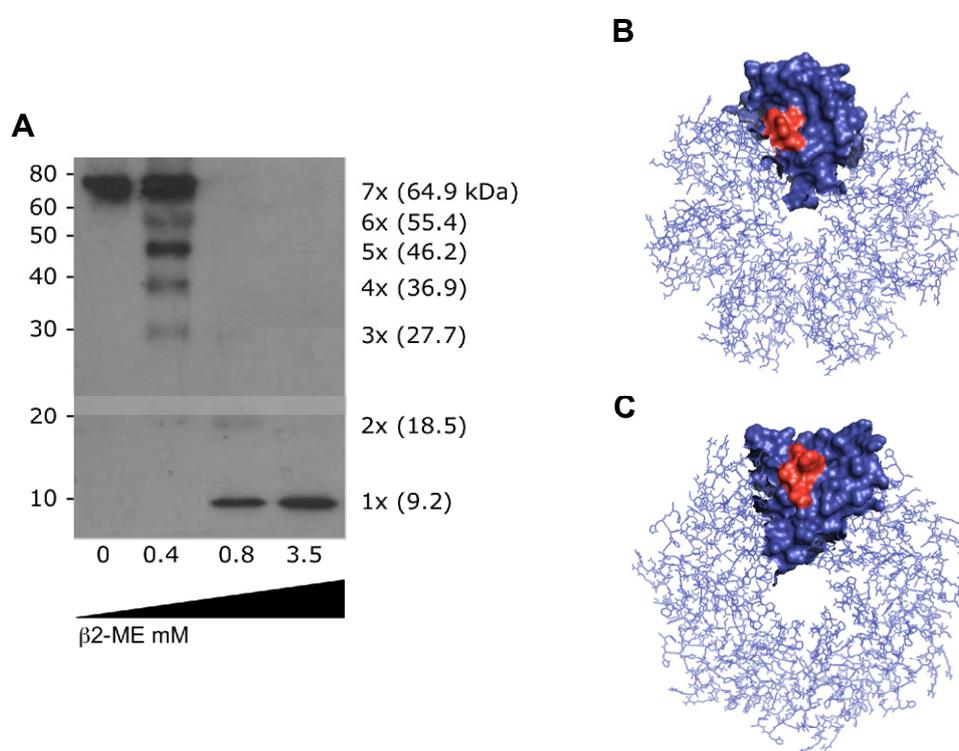
Überstand enthaltenen, C4bp $_{\alpha}$ -Peptid-Fusionsproteine auf zuvor mit einem anti-6xHis Antikörper beschichteten ELISA-Platten immobilisiert und anschließend auf Reaktivität mit IgG in Patientenplasma überprüft. Hierbei konnte eine spezifische Bindung von IgG im Plasma von Patient 1 an multimeres Peptid 12C6 sowie selektive Reaktivität von Antikörpern im Plasma von Patient 2 mit der multimeren Form von Peptid 12H10 beobachtet werden ( $p < 0.001$ ). Weiterhin wurde keine spezifische Bindung von IgG aus Normalplasma an die exprimierten Proteine detektiert ( $p < 0.001$ ). Antikörper in keinem der getesteten Plasmen wiesen eine Reaktivität mit den multimeren Kontrollpeptiden C $_M$  sowie 12C6A $_M$  und 12H10A $_M$  auf ( $p < 0.002$ ). Weiterhin konnte, trotz deutlicher, im Western Blot detektierbarer Expression, keine Bindung von IgG in den getesteten Plasmen an multimeres Peptid p107 (p107 $_M$ ) nachgewiesen werden. Neben den hier gezeigten Multimeren wurden noch weitere Varianten mit verschiedenen Linkern zwischen Peptiden und C4bp $_{\alpha}$ , sowie einzelnen AS-Austauschen in C4bp $_{\alpha}$  kloniert, welche trotz deutlicher Expression in keiner oder schwacher IgG-Bindung resultierten.



**Abb. 3.16 Bindungsstudien mit Peptidmultimeren.** Im Zellkulturüberstand enthaltenes multimeres Peptid 12C6 (12C6 $_M$ ) bzw. 12H10 (12H10 $_M$ ) reagiert selektiv mit IgG im Plasma von Patient 1 (■) bzw. 2 (▒). Keine Reaktivitäten mit Antikörpern in den getesteten Plasmen waren für p107 $_M$ , 12C6A $_M$ , 12H10A $_M$ , sowie C $_M$  zu beobachten. Keine der exprimierten Proteine zeigte Reaktivität mit in Normalplasma enthaltenen Antikörpern (□). Alle gezeigten Daten sind exemplarisch für die analysierten Zellkulturüberstände von selektierten Einzelklonen.

Einzelklone, welche gemäß der im Western Blot detektierten Proteinmengen sowie den Daten aus den Bindungsstudien eine besonders hohe Expression IgG-bindender Proteine aufwiesen, wurden expandiert. Die 6xHis-markierten multimeren Peptide wurden mittels Affinitäts-Chromatographie über Nickel-Chelat-Säulen und nachfolgender Elution mit Imidazol aus den Zellkulturüberständen aufgereinigt. Vor einem Einsatz in weiteren Experimenten wurden die aufgereinigten Proteine mittels eines  $\beta$ -Mercaptoethanol-Gradienten hinsichtlich ihrer

multimeren Struktur analysiert. Die Detektion der dabei entstehenden Proteinbestandteile erfolgte mittels eines anti-6xHis Antikörpers im Western Blot. Ab einer  $\beta$ -Mercaptoethanol-Konzentration von 0.4 mM konnten neben der Bande für die C4bp $_{\alpha}$ -Peptid-Fusionen in heptamerer Form (64.9 kDa) fünf weitere Banden detektiert werden (**Abb. 3.17 A**). Diese entsprachen der Größe von hexa- (ca. 55.4 kDa), penta- (ca. 46.2 kDa), tera- (ca. 36.9 kDa), tri- (ca. 27.7 kDa) und dimeren (ca. 18.5 kDa) Fragmenten.  $\beta$ -Mercaptoethanol-Konzentrationen >0.4 mM resultierten in einem Bandenmuster korrespondierend zu Di- sowie Monomeren (9.2 kDa), bis schließlich ab einer  $\beta$ -Mercaptoethanol-Konzentration von 3.5 mM nur noch Monomere detektiert wurden.



**Abb. 3.17 Expression multimerer Peptide.** (A) Die multimeren Struktur der exprimierten Proteine wurde mittels eines  $\beta$ -Mercaptoethanol-Gradienten aufgeschlüsselt und die einzelnen C4bp $_{\alpha}$ -Ketten im Western Blot mittels eines anti-6xHis Antikörpers nachgewiesen. (B) Struktur-Modelle von 12C6 $_M$  und (C) 12H10 $_M$  ergaben eine Oberflächenpräsenz des NPVE- sowie WQTW-Motivs. Diese sind auf jeweils einer Untereinheit der Heptamere rot hervorgehoben.

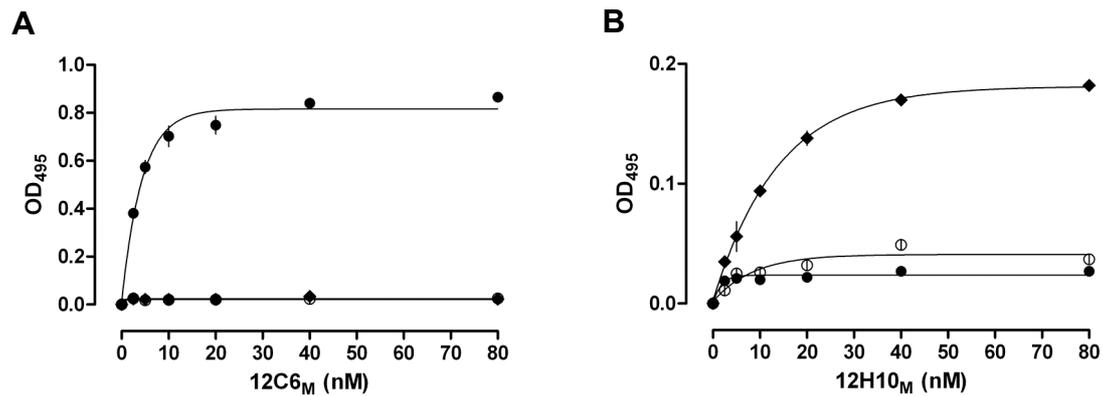
Zur Erlangung einer strukturellen Vorstellung der heptameren, C4bp $_{\alpha}$ -fusionierten Peptide sowie zur Überprüfung der Oberflächenpräsenz der Inhibitor-bindenden Aminosäuren, wurden mittels des *Protein Structure Prediction Servers* sowie des *ClusPro-Docking Servers* *de novo*-Strukturmodelle erstellt. Analog zur nativen Form von C4bp ergaben diese Modelle

für die C4bp<sub>α</sub>-Peptid-Multimere eine spinnenartige Struktur (**Abb. 3.17 B, C**). Die Strukturvorhersagen ergaben sowohl für 12C6<sub>M</sub> als auch für 12H10<sub>M</sub> eine Oberflächenpräsenz des NPVE- bzw. des WQTW-Motivs. Entsprechende Analysen von p107<sub>M</sub> sowie den diversen Linker-Varianten und Modifikationen in C4bp<sub>α</sub> resultierten hingegen in einer kryptischen Lage der relevanten Aminosäuren.

### 3.3.2 Die Multimerisierung der Peptide verbessert die Bindung von FVIII-Inhibitoren

Durch die Multimerisierung der Peptide wurden Proteine generiert, welche über mehrere Valenzen für einen Antikörper verfügen. Desweiteren sollte die Expression der Peptide im Kontext mit C4bp<sub>α</sub> im Gegensatz zu den einzelnen, duodecameren, synthetischen Peptiden zu einer Reduktion der Flexibilität führen. Die Auswirkungen dieser beiden Eigenschaften auf die IgG-Bindung wurden im Folgenden untersucht.

Analog zu funktionellen Tests mit synthetischen Peptidliganden, wurden die exprimierten, aufgereinigten C4bp<sub>α</sub>-Peptid-Multimere in Bindungsstudien analysiert. Hierzu wurde zunächst deren relative Konzentration anhand einer Eichgerade mit 6xHis-markiertem Protein 53 (p53-6xHis) ermittelt. Im Anschluss wurden äquivalente Konzentrationen der aufgereinigten Multimere mittels eines anti-6xHis Antikörpers auf ELISA-Platten immobilisiert und die IgG-Bindung in den Plasmen von Patient 1 und 2 sowie Normalplasma detektiert. Aufgereinigtes 12C6<sub>M</sub> (**Abb. 3.18 A**) sowie 12H10<sub>M</sub> (**Abb. 3.18 B**) wiesen eine nahezu exklusive, konzentrationsabhängige Reaktivität mit Antikörpern in den Plasmen der Patienten 1 bzw. 2 auf ( $p < 0.003$ ). Es wurde keine Bindung von IgG in Normalplasma detektiert. Wie bereits aus Experimenten mit Kulturüberständen von Einzelklonen hervorging (**Abb. 3.16**), konnte auch für aufgereinigtes 12C6A<sub>M</sub>, 12H10A<sub>M</sub> sowie C<sub>M</sub> keine Reaktivität mit Antikörpern in den Plasmen nachgewiesen werden. Mit den einzelnen, synthetischen Peptide 12C6 bzw. 12H10 wurde ab einer Konzentration von ca. 2 μM eine maximale IgG-Bindung in Plasmen von Patient 1 und 2 erreicht (**Abb. 3.10 A, C**). 12C6<sub>M</sub> und 12H10<sub>M</sub> erreichten ab einer Konzentration von 40 nM eine maximale Bindung von Antikörpern in den Plasmen von Patient 1 bzw. 2. Damit liegt die IgG-Bindungskapazität der Multimere ca. 50fach, bei Berücksichtigung der potentiellen sieben Valenzen der Multimere noch ca. siebenfach über der für einzelne, synthetische Peptide.



**Abb. 3.18 Bindungsstudien mit aufgereinigten, multimeren Peptiden.** (A) Es ist die IgG-Bindung im Plasma von Patient 1 (●), Patient 2 (◆) sowie Normalplasma (○) an multimeres Peptid 12C6 und (B) 12H10 gezeigt.

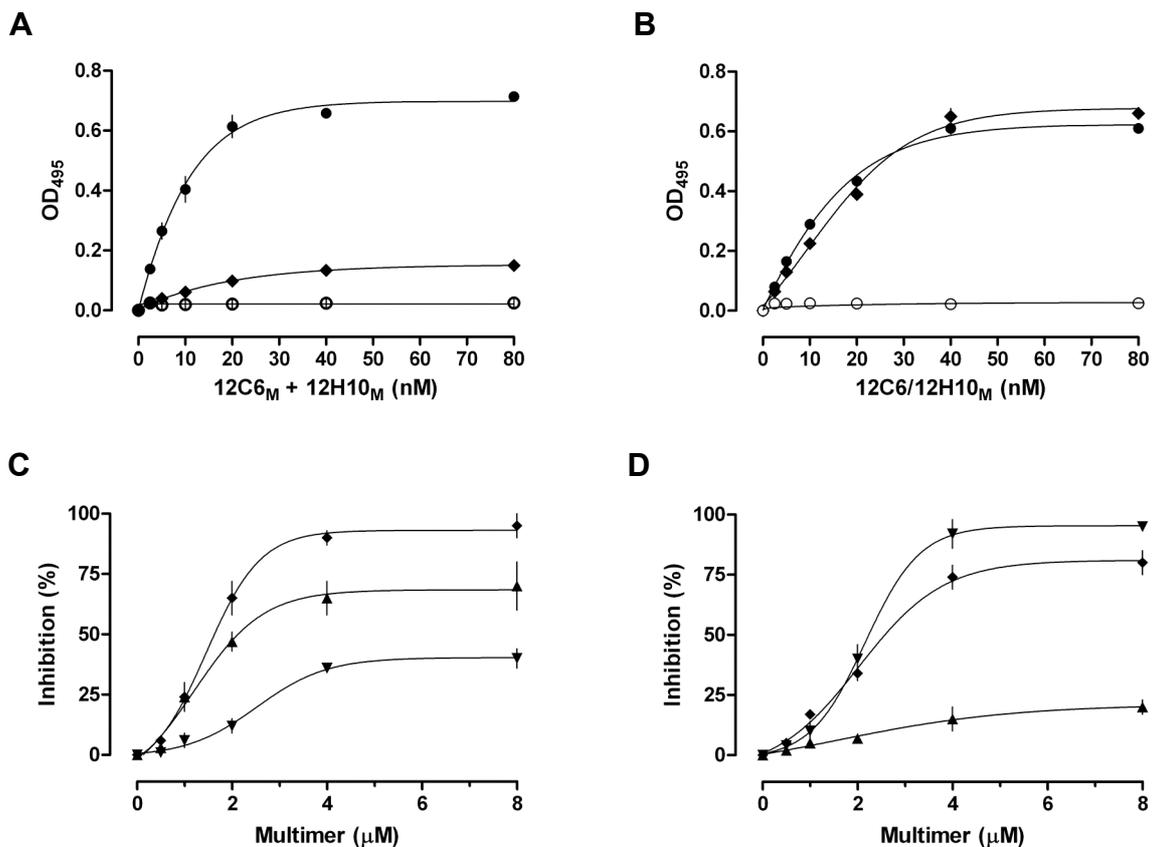
### 3.3.3 Die Peptide 12C6 und 12H10 lassen sich in einem Heteromultimer kombinieren

Die Multimerisierung von Liganden durch Fusion an C4bp<sub>α</sub> bietet die Möglichkeit zur Expression von Proteinen, welche unterschiedliche Spezifitäten in einer Struktur vereinen (Oudin *et al.*, 2000). Dies ist im Besonderen daher interessant, da für FVIII-Inhibitoren in polyklonalem Patientenplasma bereits gezeigt werden konnte, dass diese durch Peptidkombinationen im Gegensatz zu Einzelpeptiden noch effektiver blockiert werden konnten (Abb. 3.13, 3.14).

Im Anschluss an den Nachweis der selektiven IgG-Bindung durch multimeres Peptid 12C6 und 12H10 (Abb. 3.18) wurde, basierend auf der guten Kreuzreaktivität der kombinierten synthetischen Peptide 12C6 und 12H10 mit heterologen Plasmen, durch Cotransfektion von pEF-IRESp-C4bp<sub>α</sub>-12C6 und pEF-IRESp-C4bp<sub>α</sub>-12H10 in 293T-Zellen ein 12C6/12H10-Heteromultimer (12C6/12H10<sub>M</sub>) generiert. Im Anschluß an die Subklonierung Puromycin-resistenter Klone wurden die Zellkulturüberstände von Einzelklonen hinsichtlich der Expression eines Proteins, welches sowohl Reaktivität mit IgG in Plasma von Patient 1 als auch Patient 2 aufwies, untersucht. Von allen 24 analysierten Einzelklonen, exprimierten dabei lediglich zwei Klone ein Protein, welches über diese Eigenschaften verfügte.

Vergleichende IgG-Bindungsstudien zwischen 12C6/12H10<sub>M</sub> sowie 12C6<sub>M</sub> und 12H10<sub>M</sub> wurden analog zu den bereits beschriebenen Bindungsexperimenten mit Multimeren durchgeführt. Durch Kombination äquivalenter Konzentrationen von 12C6<sub>M</sub> und 12H10<sub>M</sub> wurden Antikörper in beiden Plasmen gebunden (Abb. 3.18 A). Erwartungsgemäß unterschied sich die Reaktivität der Antikörper in den beiden Plasmen dabei nur unwesentlich von der mit den einzelnen Multimeren. Durch Kombination der beiden Peptide in einem

Heteromultimer (12C6/12H10<sub>M</sub>) wurde gleiche Reaktivität mit Antikörpern in beiden Plasmen erreicht (Abb. 3.18 B). Die Bindung von Antikörpern im Plasma von Patient 1 durch 12C6/12H10<sub>M</sub> entsprach dabei annähernd der beobachteten Reaktivität mit 12C6<sub>M</sub> (p=0.002). Die IgG-Bindung durch 12C6/12H10<sub>M</sub> in Plasma von Patient 2 lag hingegen deutlich über der detektierten Reaktivität mit 12H10<sub>M</sub> (p=0.0012). Wie bereits für die einzelnen Homomultimere beobachtet, wurde die maximale IgG-Bindung ab einer Konzentration von 40nM im Ansatz erreicht.



**Abb. 3.19 Bindungs- und Inhibitionsstudien mit Heteromultimeren.** 293T-Zellen wurden mit *pEF-IRESp-C4bp<sub>α</sub>-12C6* und *pEF-IRESp-C4bp<sub>α</sub>-12H10* cotransfiziert. (A) Es ist die IgG-Bindung im Plasma von Patient 1 (●), Patient 2 (◆) sowie Normalplasma (○) durch die kombinierten Multimere 12C6<sub>M</sub> und 12H10<sub>M</sub> sowie (B) das 12C6/12H10<sub>M</sub>-Heteromultimer gezeigt. (C) Es ist die Inhibition der IgG-Bindung in Plasma von Patient 1 bzw. (D) Patient 2 durch 12C6<sub>M</sub> (▲), 12H10<sub>M</sub> (▼) sowie 12C6/12H10<sub>M</sub> (◆) an immobilisierten FVIII dargestellt.

Inhibitionsstudien mit aufgereinigten Multimeren wurden analog zu entsprechenden Studien mit synthetischen Peptiden durchgeführt. Dabei wurde die Blockierung der Antikörperbindung an FVIII in Plasmen von Patient 1 und 2 durch die Zugabe von 12C6<sub>M</sub>, 12H10<sub>M</sub> sowie des Heteromultimers 12C6/12H10<sub>M</sub> vergleichend getestet. Durch den Zusatz

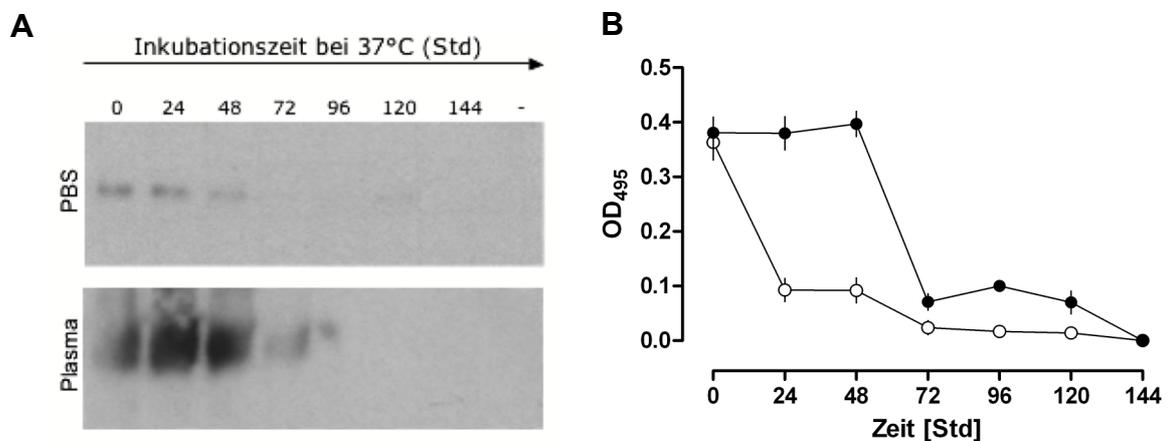
der Multimere wurde in den getesteten Plasmen eine konzentrationsabhängige Inhibition der IgG-Bindung an immobilisierten FVIII beobachtet. In Plasma von Patient 1 wurde die Antikörperbindung an FVIII durch das Heteromultimer bei einer maximalen, getesteten Konzentration von  $8\mu\text{M}$  am stärksten inhibiert ( $p=0.003$ ; 95%). Die Homomultimere  $12\text{C6}_\text{M}$  sowie  $12\text{H10}_\text{M}$  blockierten lediglich 70% bzw. 40% der IgG-Bindung an FVIII ( $p<0.012$ ). In Plasma von Patient 2 wurde durch  $12\text{H10}_\text{M}$  bei einer maximalen, getesteten Konzentration von  $4\mu\text{M}$  eine Inhibition von 94% der Antikörperbindung erzielt ( $p=0.02$ ).  $12\text{C6}/12\text{H10}_\text{M}$  blockierte 80%,  $12\text{C6}_\text{M}$  lediglich 20% der IgG-Bindung an FVIII ( $p<0.03$ ). Für anti-FVIII Antikörper in den Plasmen beider Patienten lag die beobachtete  $\text{IC}_{50}$  für  $12\text{C6}_\text{M}$ ,  $12\text{H10}_\text{M}$  sowie  $12\text{C6}/\text{H10}_\text{M}$  bei ca.  $2\mu\text{M}$ .

### 3.3.4 Die Expression der Peptide in multimerer Form verlängert deren Halbwertszeit

Ein wesentliches Ziel bei der Expression selektierter, FVIII-Inhibitor spezifischer Peptide in multimerer Form bestand in einer Verbesserung deren Stabilität bei gleichzeitiger Beibehaltung der Spezifität.

Konzentrationen von Peptiden und Multimeren gleicher Reaktivität mit IgG in Patientenplasmen wurden über einen Zeitraum von 144 Stunden bei  $37^\circ\text{C}$  in humanem Plasma sowie 1xPBS inkubiert. Alle 24 Stunden wurden Proben entnommen und bei  $-20^\circ\text{C}$  gelagert. Diese Proben wurden im Anschluss auf ihre IgG-Bindung in Patientenplasmen untersucht. Die Degeneration der Multimere über die Zeit wurde im Western Blot unter nicht-reduzierenden Bedingungen mittels eines anti-6xHis Antikörpers verfolgt. Nach 48stündiger Inkubation der Multimere in Plasma sowie PBS ergab die Analyse im Western Blot eine deutliche Degeneration der multimeren Peptide (**Abb. 3.20 A**). Dabei konnten, außer der detektierten, heptameren Form, keine anderen Formen nachgewiesen werden. Nach 96stündiger Inkubation in Plasma bzw. PBS wurden nahezu keine  $\text{C4bp}_\alpha$ -Peptid-Multimere detektiert. Eine IgG-Bindung konnte für einen identischen Zeitraum wie die im Western Blot nachgewiesene Präsenz von heptameren  $\text{C4bp}_\alpha$ -Peptid-Fusionsproteinen beobachtet werden (**Abb. 3.20 B**). Nach 72stündiger Inkubation in PBS bzw. Plasma fiel gemäß der gemessenen Absorptionswerte ( $\text{OD}_{495}$ ) die Reaktivität der Multimere mit Antikörpern in den Patientenplasmen stark ab und war nach 144 Stunden nicht mehr nachweisbar ( $p<0.02$ ). Die IgG-Bindung durch synthetische Peptide reduzierte sich hingegen bereits innerhalb der ersten 24 Stunden drastisch und war bereits nach 72 Stunden nicht länger über dem Hintergrund

detektierbar ( $p < 0.03$ ). Die Halbwertszeit funktioneller Peptidliganden wurde durch die Multimerisierung somit von ca. 12 auf 60 Stunden erhöht.



**Abb. 3.20 Stabilität der Multimere.** (A) Die Präsenz von  $C4bp_{\alpha}$ -Peptid-Multimeren wurde während Inkubation bei 37°C in 24-Stunden-Intervallen im Western Blot ermittelt. (B) Die Multimere (●) wurden weiterhin auf ihre Fähigkeit zur IgG-Bindung in Patientenplasma im Vergleich zu synthetischen Peptiden (○), welche unter identischen Bedingungen inkubiert wurden, untersucht.

### Zusammenfassung von Abschnitt 3.3

Durch Fusion der selektierten Peptidliganden 12C6 und 12H10 mit  $C4bp_{\alpha}$  konnten diese in 293T-Zellen in heptamerer Form exprimiert werden. Durch Co-Transfektion der Vektoren pEF-IRESp- $C4bp_{\alpha}$ -12C6 und -12H10 wurde ein Heteromultimer generiert, welches beide Peptidliganden beinhaltet. Die Multimere wurden aus Zellkulturüberstand affinitätschromatographisch aufgereinigt. In Bindungsstudien wies das Heteromultimer identische Reaktivität mit Antikörpern in den Plasmen der Patienten 1 und 2 auf. Die  $C4bp_{\alpha}$ -Peptid-Heptamere wiesen eine deutlich verbesserte Halbwertszeit von ca. 60 Stunden gegenüber den einzelnen, synthetischen Peptidliganden (ca. 12 Stunden) auf.

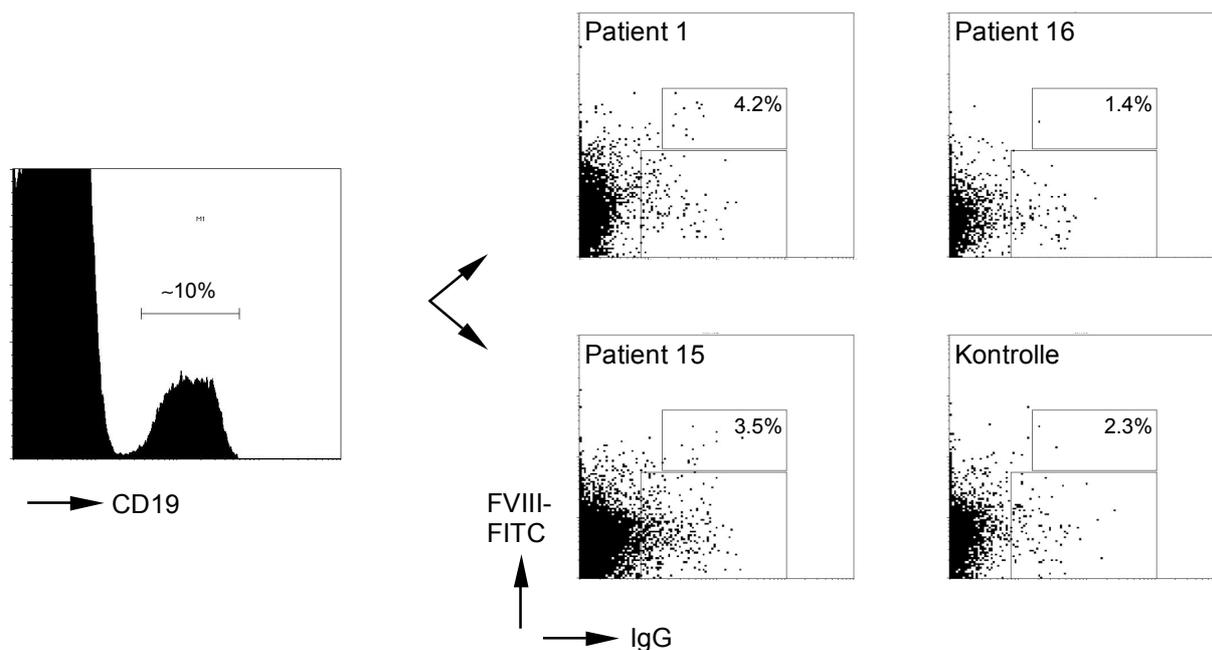
### 3.4 Targeting von Gedächtnis-B-Zellen

Das antigenspezifische Targeting von B-Zellen kann via des hochaffinen BCRs mit Phage Display selektierten Peptiden erfolgen (Buhl *et al.*, 2002). Diese Liganden können durch rekombinante Fusion mit toxischen Domänen (*ligand-toxin-conjugates*, LTCs) Zellen spezifisch deletieren (Ellerby *et al.*, 1999; Kelly and Jones, 2003). Für die Etablierung eines Ansatzes zum Targeting von FVIII-spezifischen Gedächtnis-B-Zellen, sollten FVIII-bindende

Gedächtnis-B-Zellen ( $CD19^+CD27^+IgG^+$ ) in PBMC-Präparationen von Patienten nachgewiesen werden. Desweiteren sollten B-Zellen in Präparationen peripherer Zellen mit selektierten synthetischen Peptiden angefärbt werden. Für eine gezielte Depletion von FVIII-spezifischen B-Zellen mittels der selektierten Peptide 12C6 und 12H10 sollten diese an ein, aus D-Aminosäuren bestehendes apoptotisches Peptid  $D(KLAKLAK)_2$  fusioniert werden (Mai *et al.*, 2001; Kelly and Jones, 2003). Zur Entwicklung eines funktionellen Testsystems, in welchem sich die Depletion von FVIII-spezifischen B-Zellen durch diese LTCs (12C6-KLAK, 12H10-K) nachweisen ließe, sollten Gedächtnis-B-Zellen in Zellkultur restimuliert und deren Differenzierung zu antigenspezifischen, Antikörper-sekretierenden Plasmazellen mittels der ELISPOT-Technologie überprüft werden.

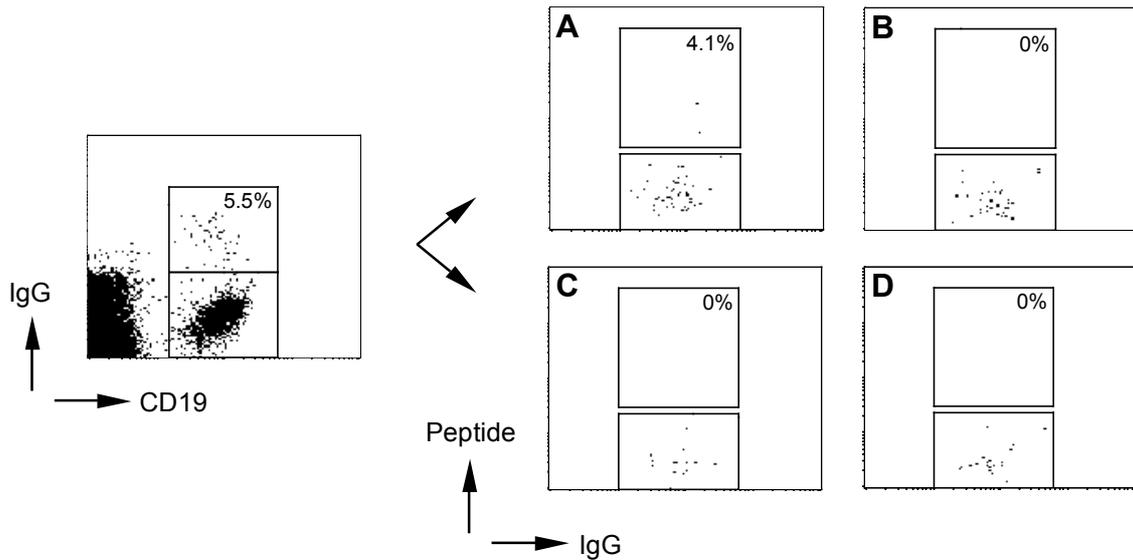
### **3.4.1 $CD19^+IgG^+$ B-Zellen in PBMC-Präparationen lassen sich mit FVIII-FITC oder synthetischen Peptiden anfärben**

Antigenspezifische Gedächtnis-B-Zellen lassen sich durch das native Antigen detektieren, wenn dieses an ein durchflußzytometrisch detektierbares Fluorochrom gekoppelt ist. Eine rFVIII-Präparation wurde zur durchflußzytometrischen Nutzung mit Fluorescein-5-Isothiocyanat (FITC) markiert. Kryopräservierte PBMCs von HA Patienten, darunter Patient 1 sowie gesunden Spendern wurden mit FVIII-FITC sowie einem APC-markierten Antikörper gegen CD19 und biotinylierten, anti-Human IgG Antikörpern gefolgt von Sav-PerCP-markiertem Streptavidin gefärbt. Bei der durchflußzytometrischen Analyse wurden zunächst die Lymphozytenpopulation von den übrigen Zellen in den PBMC-Präparationen und in der Folge die  $CD19^+$  Zellen abgegrenzt und auf eine Bindung von FVIII-FITC bei gleichzeitiger Bindung von anti-IgG Antikörpern untersucht. Je nach Zellzahl sowie Zellqualität in den PBMC-Präparationen wurden zwischen  $2 \cdot 10^4$  und  $10^5$  Lymphozyten je Ansatz durchflußzytometrisch analysiert (**Abb. 3.21**). Die Population der  $CD19^+$  Zellen umfasste ca.  $10 \pm 2\%$  der gesamten Lymphozytenpopulation. Eine IgG-Expression konnte auf  $8 \pm 3\%$  der  $CD19^+$  Zellen nachgewiesen werden. Für die Färbung mit FVIII-FITC wurden zunächst unterschiedliche Konzentrationen ausgetestet. Mit einer FVIII-FITC-Konzentration von 4nM ließen sich positive und negative Populationen gut voneinander differenzieren. Abzüglich einem Hintergrund von ca. 2%  $CD19^+IgG^+$  Zellen in PBMCs von gesunden Spendern bzw. Inhibitor-negativen HA-Patienten ergab dies, im Gegensatz zu Kontrollen wie unmarkiertem FVIII sowie einem FITC-markierten Antikörper, eine Färbung von 1-2% der  $CD19^+IgG^+$  B-Zellen der analysierten Inhibitor-positiven HA-Patienten.



**Abb. 3.21 Färbung von B-Zellen mit FVIII-FITC.** CD19<sup>+</sup> B-Zellen aus PBMC-Präparationen von Patienten und gesunden Spendern wurden durchflußzytometrisch auf Expression von IgG und gleichzeitiger Bindung von FVIII-FITC untersucht.

Untersuchungen der zielgerichteten Ansteuerung von Gedächtnis-B-Zellen in kryopräservierten PBMC-Präparationen durch synthetische Peptide wurde entsprechend der Färbungen mit FVIII-FITC durchgeführt. Die Detektion gebundener Peptide erfolgte mittels eines FITC-markierten anti-6xHis Antikörpers. Für die Färbung mit Peptiden wurden diese zunächst in unterschiedliche Konzentrationen ausgetestet. Mit einer Peptidkonzentration von 50µM ließen sich positive und negative Populationen gut voneinander differenzieren. Bei der durchflußzytometrischen Analyse wurden CD19<sup>+</sup>IgG<sup>+</sup> Zellen aus den Lymphozytenpopulationen ausgeschlossen und auf gebundene Peptide untersucht. Färbungen von verschiedenen PBMC-Präparationen von Patient 1 mit Peptid 12C6 resultierte in 3 ± 2% positiven Zellen. Peptid 12C6A, 12H10 sowie p107 zeigten keine Bindung an CD19<sup>+</sup>IgG<sup>+</sup> doppelpositive Zellen. Keine Reaktivität mit allen getesteten Peptiden konnte für Zellen von gesunden Spendern nachgewiesen werden. In PBMC-Präparationen von Patient 2 wurden 1 ± 0.5% der CD19<sup>+</sup>IgG<sup>+</sup> Zellpopulation mit Peptid 12H10 gefärbt, während keine Färbung durch die Peptid 12H10A nachweisbar war. In Zellpopulationen weiterer Patienten war keine Bindung der Peptide 12C6 und 12H10 detektierbar.



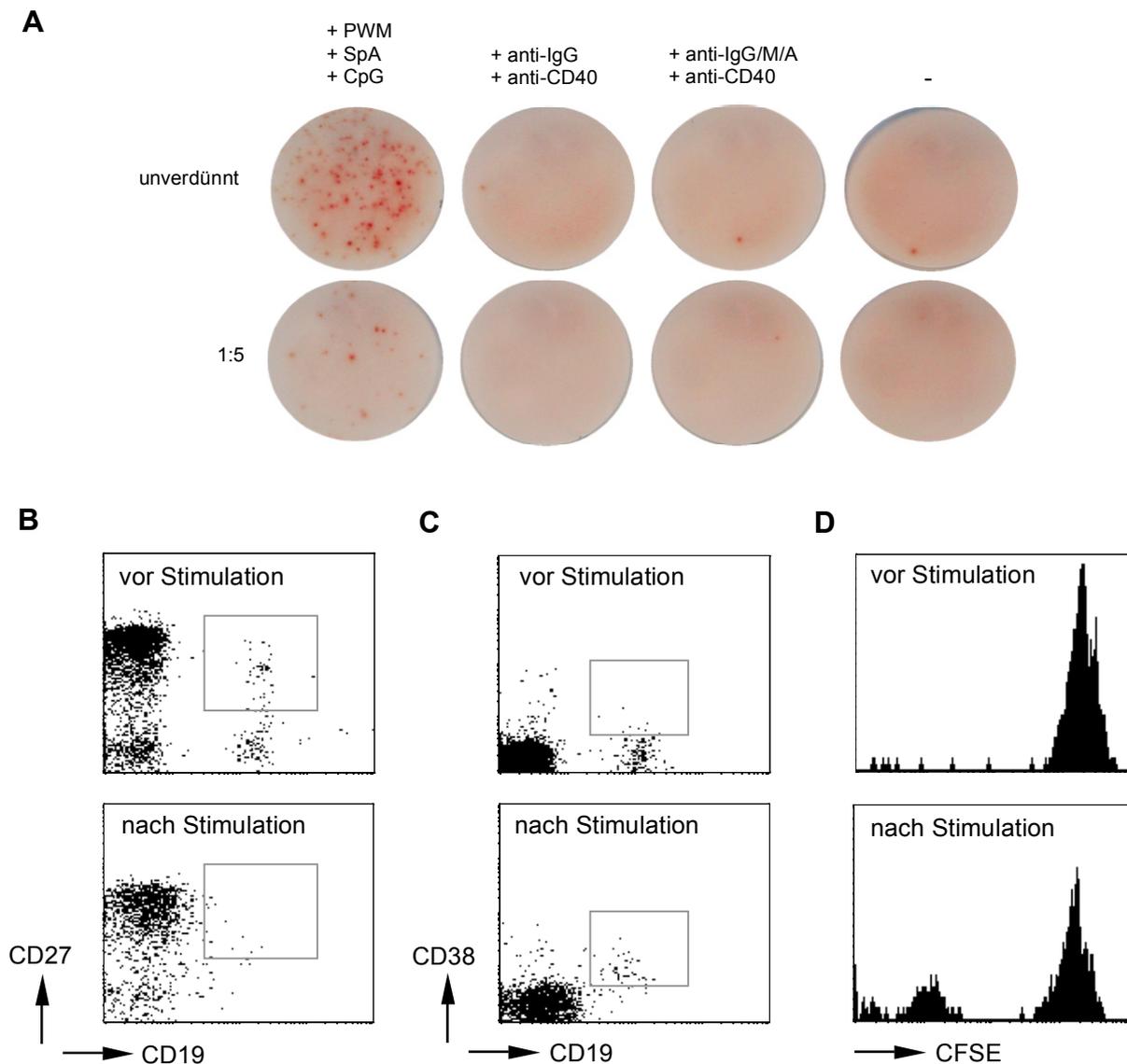
**Abb. 3.22 Färbung von B-Zellen mit Peptid 12C6.** (A, B) CD19<sup>+</sup>IgG<sup>+</sup> B-Zellpopulationen aus PBMC-Präparationen von Patienten und (C, D) gesunden Spendern wurden durchflußzytometrisch auf Bindung von Peptid 12C6 (A, C) sowie 12C6A (B, D) untersucht.

### 3.4.2 Gedächtnis-B-Zellen in PBMC-Präparationen lassen sich polyklonal stimulieren

Gedächtnis-B-Zellen können als Folge eines polyklonalen Stimulus zu IgG-sekretierenden Zellen differenzieren (Bernasconi *et al.*, 2002). Zur Etablierung dieser Methode wurden aus Gründen der einfacheren Verfügbarkeit zunächst Gedächtnis-B-Zellen in PBMC-Präparationen gesunder Spender stimuliert. Da in der Literatur unterschiedliche polyklonale Stimulationen beschrieben sind, wurden verschiedene Stimuli in unterschiedlicher Kombination ausgetestet. Die durch die Stimulation induzierte Differenzierung zu Plasmazellen wurde durchflußzytometrisch verfolgt. Die IgG-Sekretion von einzelnen Zellen wurde mittels des ELISPOT-Verfahrens nachgewiesen. Dabei entspricht ein *Spot* einer IgG-sekretierenden Zelle, welche jeweils aus einer stimulierten Gedächtnis-B-Zelle hervorgeht. Das im Laufe der Stimulation sekretierte Gesamt-IgG im Kulturüberstand wurde mittels ELISA quantifiziert.

Es wurden jeweils  $1-1.5 \cdot 10^6$  Zellen aus PBMC-Präparationen mit unterschiedlichen Kombinationen von *Pokeweed Mitogen* (PMW), rekombinanten Protein A von *Staphylococcus aureus* (SpA), dem Oligonukleotid CpG OD2006, CD40-Ligand, Antikörpern gegen humanes CD40, IgG, IgM und IgA sowie Interleukinen 2 stimuliert. Nach sechstägiger Stimulation wurden maximal  $2 \cdot 10^5$  Zellen in die, mit einem anti-Human Ig Antikörper beschichteten Vertiefungen einer ELISPOT-Platte eingesät und die IgG-Sekretion durch die

Zellen nach fünf Stunden detektiert. Aus den ELISPOT-Ergebnissen ging hervor, dass die deutlichste Stimulation wiederholt durch die Zugabe von PWM, SpA und CpG-Oligonukleotide erreicht wurde (**Abb. 3.23 A**). Dabei wurden zwischen 100 und 400 IgG-sekretierende Zellen in ca.  $1 \cdot 10^5$  stimulierten PBMCs detektiert, welche ca. 160ng/ml IgG produzierten. Der Zusatz von anti-IgG, IgM und IgA F(ab')<sub>2</sub>-Fragmenten, CD40-Ligand sowie anti-CD40 Antikörpern führte zu einer kaum nachweisbaren IgG-Sekretion. Durch die Zugabe von IL-2 ließ sich die beobachtete IgG-Sekretion nicht steigern.



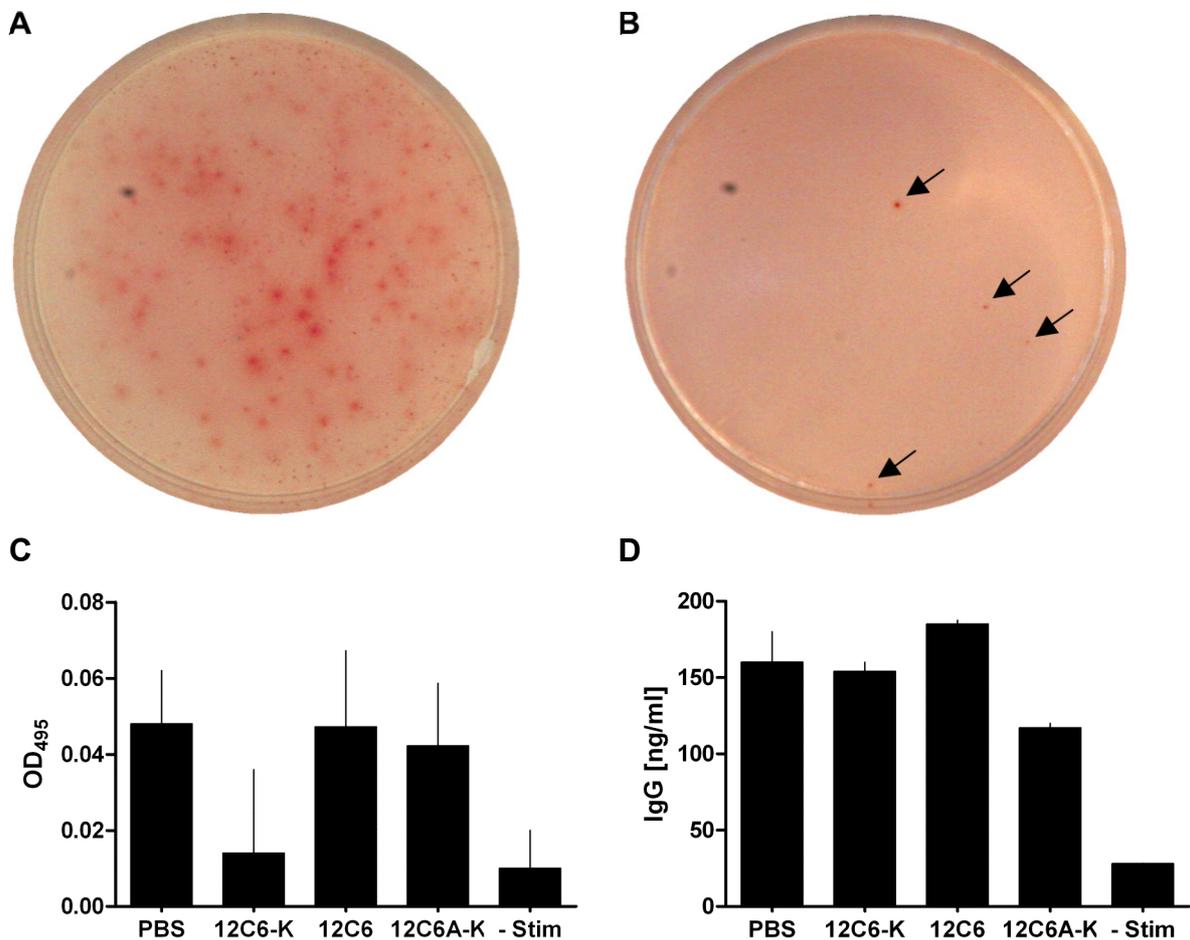
**Abb. 3.23 Stimulation von Gedächtnis-B-Zellen.** (A) PBMC-Präparationen wurden mit Pokeweed Mitogen (PWM), rekombinantem *Staphylococcus aureus* Protein A (SpA), CpG OD2006, anti-humanem IgG, einem Mix aus anti-humanem IgG, IgM und IgGA sowie anti-CD40 Antikörpern für sechs Tage inkubiert. Anschließend wurden das durch die einzelnen, zu Plasmazellen differenzierten Gedächtnis-B-Zellen sekretierte IgG im ELISPOT detektiert. (B) PBMC-Präparationen vor und nach Stimulation mit PWM, SpA und CpG OD2006 wurden hinsichtlich der Präsenz von Gedächtnis-B-Zell ( $CD19^+CD27^+$ ) bzw. (C) Plasmazellpopulationen ( $CD19^+CD38^+$ ) durchflußzytometrisch untersucht. (D) Ferner wurde die Zellproliferation nach Stimulation durch Färbung mit CFSE analysiert.

Die durch die Stimulation mit PWM, SpA und CpG-Oligonukleotiden induzierte Differenzierung der Gedächtnis-B-Zellen ( $CD19^+CD27^+$ ) zu frühen Plasmazellen ( $CD19^+CD38^+$ ) wurde durchflußzytometrisch überprüft. Hierzu wurden in PBMC-Präparationen vor und nach Stimulation Gedächtnis-B-Zell sowie Plasmazellpopulationen detektiert. Vor Stimulation waren Gedächtnis-B-Zellen als eine  $CD19^+CD27^+$ -Population in den PBMC-Präparationen deutlich detektierbar (**Abb. 3.23 B**). Nach Stimulation war diese Population nahezu vollständig verschwunden. Es war lediglich weiterhin eine deutlich  $CD27^+$ -Population zu detektieren.  $CD19^+CD38^+$ -Plasmazellen waren in den PBMC-Präparationen vor Stimulation nicht zu detektieren (**Abb. 3.23 C**). Es konnte lediglich eine deutlich  $CD19^+$ -B-Zellpopulation nachgewiesen werden. Nach sechstägiger Inkubation mit PMW, SpA und CpG-Oligonukleotiden konnten jedoch sowohl  $CD19^+$  als auch schwach  $CD38^+$ -Zellen detektiert werden. Dies belegte die Existenz einer Population früher Plasmazellen, welche im Verlauf der Stimulation generiert wurde. Desweiteren konnte nach Stimulation von CFSE-gefärbten PBMC-Präparationen mit PMW, SpA und CpG-Oligonukleotiden im Gegensatz zu den übrigen, verwendeten Stimulantien eine deutliche Zellproliferation beobachtet werden (**Abb. 3.23 D**).

### 3.4.3 Nachweis antigenspezifischer Gedächtnis-B-Zellen im ELISPOT

Die Detektion antigenspezifischer Gedächtnis-B-Zellen wurde zunächst anhand des Nachweises Tetanus-spezifischer Gedächtnis-B-Zellen in PBMC-Präparationen gesunder Spender getestet. Die Zellen wurden wie beschrieben über sechs Tage stimuliert und im Anschluss alle IgG- sowie Tetanus-spezifisches IgG-sekretierende Zellen im ELISPOT nachgewiesen. Dabei konnten in ca. 300 Plasmazellen (**Abb. 3.24 A**) zwischen eine und fünf Zellen, welche Tetanus-spezifisches IgG sekretierten, detektiert werden (**Abb. 3.24 B**). Dies entspricht einer Frequenz von 0.3-1.5% Tetanus-spezifischer Gedächtnis-B-Zellen. Allerdings war es unter Verwendung gleicher Stimulationsbedingungen wiederholt nicht möglich FVIII-spezifischen Gedächtnis-B-Zellen im ELISPOT zu detektieren. Trotz der nicht erfolgten Detektion FVIII-spezifischer B-Zellen im ELISPOT konnte jedoch nach Stimulation eine schwache FVIII-spezifische IgG Sekretion im ELISA nachgewiesen werden. Daher sollte der Effekt von  $D(KLAKLAK_2)$ -gekoppelten Peptiden auf die Sekretion von anti-FVIII IgG untersucht werden. Hierzu wurde Zellen einer PBMC-Präparation von Patient 1 zunächst 24 Stunden mit  $100\mu M$  der Peptide 12C6-K, 12C6A-K sowie 12C6 präinkubiert und anschließend wie beschrieben über sechs Tage stimuliert. Gegenüber den nicht stimulierten

Zellen konnte bei Zellen, die vor Stimulation mit PBS, Peptid 12C6 oder Peptid 12C6A-K präinkubiert wurden, eine schwache Expression FVIII-spezifischen IgGs detektiert werden (**Abb. 3.24 C**). Im Falle einer Präinkubation mit 12C6-K verringerte sich die Reaktivität von IgG im Kulturüberstand mit FVIII. Allerdings war diese beobachtete Reduktion der Reaktivität nicht statistisch signifikant. Die Population der in den unterschiedlichen Ansätzen stimulierten B-Zellen sekretierten ca. 180ng/ml IgG (**Abb. 3.24 D**). Die Präsenz der D(KLAKLAK<sub>2</sub>)-gekoppelten Peptide führte nicht zu einer Reduktion der Gesamt-IgG-Produktion durch diese Zellen. Weiterhin wurde keine unspezifische Reduktion der Expression von anti-Tetanus IgG nach Präinkubation der Peptide und nachfolgender Stimulation von Zellen gesunder Spender beobachtet.



**Abb. 3.24 Detektion antigenspezifischer Gedächtnis-B-Zellen im ELISPOT.** (A) Detektion von Gedächtnis-B-Zellen in PBMC-Präparationen gesunder Spender, welche nach Stimulation zu (B) anti-Tetanus IgG sekretierenden Plasmazellen (Pfeile) differenzieren. Da im ELISPOT-Verfahren keine FVIII-spezifischen Gedächtnis-B-Zellen detektiert werden konnten, wurde der Effekt von D(KLAKLAK<sub>2</sub>)-gekoppelten Peptiden (12C6-K, 12C6A-K) im ELISA auf die Sekretion von (C) anti-FVIII IgG sowie (D) Gesamt-IgG im Vergleich zu Peptid 12C6, PBS sowie nicht stimulierten Zellen (-Stim) untersucht.

**Zusammenfassung von Abschnitt 3.4**

Mittels FITC-markiertem FVIII ließen sich in PBMC-Präparationen von Patienten 0.05-0.1% der CD19<sup>+</sup>IgG<sup>+</sup> Zellen anfärben und durchflußzytometrisch detektieren. In PBMC-Präparationen von Patient 1 und 2 färbten die Peptide 12C6 sowie 12H10 im Gegensatz zu den verwendeten Kontrollen  $3 \pm 2\%$  bzw.  $1 \pm 0.5\%$  der CD19<sup>+</sup>IgG<sup>+</sup> Zellpopulationen. Gedächtnis-B-Zellen in PBMC-Präparationen ließen sich mit SpA, PWM sowie CpG-Oligonukleotiden polyklonal stimulieren. Im ELISPOT-Verfahren konnten Tetanus-spezifische Zellen detektiert werden. Trotz schwacher Expression von anti-FVIII IgG in den Überstand stimulierter PBMCs, konnte keine FVIII-spezifischen B-Zellen nachgewiesen werden. Das D(KLAKLAK<sub>2</sub>)-gekoppelte Peptid 12C6 bewirkte eine Reduktion von anti-FVIII IgG im Überstand stimulierter Zellen, welche jedoch nicht statistisch signifikant war.

## 4. Diskussion

### 4.1. Phage Display als Methode der Wahl zur Identifizierung konformationeller Epitope FVIII neutralisierender Antikörper

Seit der erstmaligen Beschreibung des Auftretens von FVIII neutralisierenden Antikörpern als Resultat der FVIII-Ersatz Therapie besteht ein großes Interesse in der Kartierung der Epitope dieser Antikörper. Röntgenstrukturanalysen und ortsgerichtete Mutagenese stellen *die* Ansätze für eine möglichst präzise Kartierung von Epitopen dar. Kristallographische Studien erfordern große Mengen hochreinen Proteins, welches für eine Epitopkartierung in möglichst nativer Konformation mit dem entsprechenden Antikörper komplexiert sein muss. Zudem erschweren dessen Heterogenität und Sensitivität gegenüber Proteolyse solche Studien erheblich (Stoilova-McPhie *et al.*, 2002). Allerdings gelang bereits eine Röntgenstrukturanalyse der C2-Domäne im Komplex mit dem Fab-Fragment des IgG<sub>4</sub>K monoklonalen Antikörpers BO2C11. Diese Analysen lieferten sehr detaillierten Aufschluss über die an der Antikörperbindung beteiligten Aminosäuren (Spiegel *et al.*, 2001). Dennoch könnten sich mit Röntgenstrukturanalysen nur Momentaufnahmen einer möglicherweise dynamischen Antigen-Antikörper-Interaktion festhalten lassen.

Des Weiteren wurde die Analyse eines Inhibitorepitops mittels eines ortsspezifischen Austauschs (*site directed mutagenesis, SDM*) von Aminosäuren gegen Alanine (*Alanine Scan*) vorgenommen (Lubin *et al.*, 1997). SDM-Analysen stellen einen hochauflösenden Ansatz zur Kartierung von antigenen Bereichen oder zur Bestätigung von bereits generierten Epitopdaten auf der Ebene einzelner Aminosäuren dar. Im Zuge dieser Analysen muss der Verlust einer Antikörperbindung jedoch nicht zwangsläufig durch ein erfolgreich mutiertes Epitop bedingt sein, sondern kann vielmehr durch, von den veränderten Aminosäuren hervorgerufene, konformationelle Wechsel erfolgen. Für eine aussagekräftige Epitopkartierung mittels ortsgerechter Mutagenese muss daher ein gleichzeitiger Nachweis konformationeller Stabilität und/oder Funktionalität des Antigens erfolgen (Rowley *et al.*, 2004). Auch in dieser Arbeit wurden zur Bestätigung der generierten Epitopdaten ein Alanine Scan der auf Basis von Phage Display-Ergebnissen *in silico* identifizierten Aminosäuren durchgeführt. Es war allerdings nicht möglich eine Expression der FVIII-Mutanten in Zellkultur nachzuweisen. Ein Grund hierfür kann sein, dass im FVIII-Gen bereits einzelne Punktmutationen einen Verlust der Funktionalität bedeuten und in einer HA resultieren

können, indem diese die Expression von FVIII unterbinden oder zur Sekretion eines fehlgefalteten Proteins führen (Bogdanova *et al.*, 2001; Bril *et al.*, 2006).

In den Anfängen der Untersuchung von Inhibitorepitopen erfolgte eine Lokalisation vielfach mittels des Immunoblot-Verfahrens auf rekombinanten oder mittels Thrombinverdau generierten FVIII-Fragmenten (Scandella *et al.*, 1988, 1989, 1995; Fulcher *et al.*, 1985, 1987). Diese Ansätze liefern jedoch nur eine relativ unpräzise Vorstellung von der Lokalisation eines Antikörperepitops und beschränken sich lediglich auf die Identifizierung der Domänenspezifitäten polyklonaler Antikörperpopulationen. Für eine Verifizierung der, durch die *in silico*-Analysen vorgegebenen Domänenspezifität der in dieser Arbeit identifizierten, möglichen FVIII Inhibitorepitope, wurde auf diese Ansätze zurückgegriffen. In 293T-Zellen wurden einzelne FVIII-Domänen exprimiert und deren Reaktivität mit IgG in den verwendeten, polyklonalen Patientenplasmen untersucht (**Abb. 3.8**). Die verwendeten Domänen wiesen eine gute Reaktivität mit monoklonalen, domänenspezifischen Antikörpern sowie spezifische Bindung von IgG in einer Vielzahl getesteter Patientenplasmen auf (Daten nicht gezeigt). Es kann angenommen werden, dass die Konformation der einzelnen Domänen deren Faltung im gesamten FVIII-Protein nahe kommt.

Gegenwärtig werden vor allem synthetische Peptide, welche sich entweder von der primären Aminosäuresequenz von FVIII ableiten oder randomisierten Peptidbibliotheken entstammen, zur Epitopkartierung eingesetzt. Die Identifizierung von Inhibitorepitopen mittels überlappender, linearer FVIII-Peptide auf so genannten *PepSpot*-Membranen (Albert *et al.*, 2003; Kopecky *et al.*, 2006) gilt gegenüber der Phage Display-Technologie als wesentlich weniger zeitintensiver, alternativer Ansatz (Reineke *et al.*, 1999). Allerdings ergeben sich durch dieses Verfahren zwei entscheidende Unterschiede. Die linearen, von der Primärsequenz des Antigens abgeleiteten Peptide binden aufgrund ihrer Sequenz zwar IgG, die Analogie solcher Strukturen zur Oberfläche von FVIII ist allerdings denkbar gering. Damit reduziert sich die Wahrscheinlichkeit einer Kartierung konformationeller Epitope deutlich (Kopecky *et al.*, 2006). Weiterhin resultiert aus diesem Umstand ein hohes Maß an falsch-positiven Signalen, welche sich erst in aufwendigen, weiterführenden Experimenten ausschließen lassen (Palmer *et al.*, 1997; Kopecky *et al.*, 2006).

Phage Display-Selektionen von Inhibitor-spezifischen Peptiden aus randomisierten Peptidbibliotheken wurden für einen monoklonalen Antikörper sowie aufgereinigtes, polyklonales IgG bereits erfolgreich angewandt (Villard *et al.*, 2003; Mühle *et al.*, 2004). Allerdings konnten bisher keine Bestandteile konformationeller Epitope FVIII neutralisierender Antikörper aus polyklonalen Plasmen identifiziert werden. Mittels Phage

Display-Selektionen lassen sich, wie in dieser Arbeit erfolgt, Peptide selektieren, welche als strukturelle und funktionelle Mimotope des nativen Epitops fungieren. Die selektierten Peptidsequenzen lassen sich für eine Epitopkartierung nutzen. Für eine erfolgreiche Lokalisation struktureller Epitope mittels selektierter Mimotope sind Kenntnisse der dreidimensionalen Struktur des nativen Antigens aus Röntgenstrukturanalysen, NMR oder Homologiemodellen sowie eventuell vorhandenen Informationen hinsichtlich der ungefähren Lage antigener Bereiche von Vorteil (Rowley *et al.*, 2004). In dieser Arbeit war es unter Verwendung von Strukturdaten anhand entsprechender Software-Lösungen möglich, auf Basis der selektierten Peptide bzw. homologer Motive, mögliche strukturelle Epitope zu identifizieren.

Keine der bisher in der Literatur beschriebenen Techniken hat sich bei der Lokalisation struktureller Epitope als universell erfolgreich erwiesen. Neben Röntgenstrukturanalysen kann mittels Phage Display jedoch die größte Informationsfülle für eine Epitopkartierung generiert werden. Dennoch lässt die Kartierung konformationeller Epitope dabei immer Raum für Interpretation offen („[...] *hence epitope identification has remained as much an art as a science.*“ Rowley *et al.*, 2004).

#### **4.2 Phage Display-Selektion von strukturellen und funktionellen Mimotopen mittels kompetitiver sowie pH-shift Elution**

Für die Selektion von FVIII Inhibitor-spezifischen Peptidliganden wurden zwei unterschiedliche Elutionstechniken angewandt. Zum einen wurden die gebundenen, Peptid-präsentierenden Phagenklone nach erfolgter positiver Selektion mittels eines pH-shifts abgelöst, zum anderen erfolgte die Elution durch Konkurrenz mit hochdosiertem FVIII.

Die Untersuchung der IgG-Bindung von Phagen in den unterschiedlichen Eluatn im Anschluss an die Positivselektionen ergab eine deutlich bessere Reaktivität pH-shift eluierter Phagenklone mit Antikörpern in den verwendeten Plasmen (**Abb. 3.3**). Dies wurde durch äquivalente Untersuchungen mit einzelnen Phagenklonen bestätigt (**Abb. 3.4**). Die Mehrzahl der per Definition ELISA-positiven Klone entstammte Selektionen mit pH-shift Elution. Folglich gingen auch die beiden Peptidliganden 12C6 und 12H10, welche in weiterführenden Experimenten eine besonders hohe Reaktivität mit IgG in den Plasmen aufwiesen (**Abb. 3.9**), aus Selektionen mit pH-shift Elution hervor.

Unterschiede hinsichtlich der in den Biopannings verwandten Elutionen ließen sich auch anhand der AS-Sequenzen der Peptide, welche von ELISA-positiven Klonen präsentiert

wurden, feststellen. So konnte unter den Sequenzen der kompetitiv eluierten Klone eine höhere Frequenz des NPVE-Motivs gegenüber dem NPVE-Motiv, das primär unter pH-shift eluierten Klonen auftrat, beobachtet werden (**Tab 3.1**). Interessanterweise konnten beiden Motiven Homologien auf der Oberfläche der FVIII-Kristallstruktur zugeordnet werden (**Abb. 3.6**). Unter den Sequenzen aus den Biopannings mit Plasmen von Patient 2 ließen sich keine so offensichtliche Unterschiede hinsichtlich der verwendeten Elutionstechniken ausmachen (**Tab 3.2**). Allerdings traten unter den kompetitiv eluierten Klonen aus den Screenings mit Plasmaprobe B vermehrt Sequenzen auf, welche Glutamat (E) in dem (SP)WxEW(F/Y)-Konsensusmotiv beinhalteten. Im Zuge der Epitopkartierungen wurden primär Homologien zwischen dem WxEW-Motiv und der FVIII-Oberfläche identifiziert (**Abb. 3.6**).

Peptidsequenzen von Klonen, welche aus einer kompetitiven Elution hervorgehen, scheinen sich demnach eher für eine Epitopkartierung zu eignen. Die sequenziellen und konformationellen Homologien zwischen den präsentierten Peptiden dieser Klone und FVIII könnten deren Selektion begünstigen. Das Antigen eluiert vornehmlich solche Klone, deren Peptid aufgrund Sequenz und Konformation mit dem gleichen Bereich der Komplement determinierenden Region (*complement determining region, CDR*) des Antikörpers wie das native Antigen in Kontakt tritt (Heiskanen *et al.*, 1999). Diese Peptide stellen strukturelle Mimotope der nativen Epitope dar. Eine kompetitive Elution von Phagenklonen stellt einen zweiphasigen Prozess dar. Zunächst dissoziieren gebundene Phagenklone spontan von ihrem Bindungspartner, dann kann der zur Elution eingesetzte native Ligand mit der Zielstruktur interagieren und somit eine erneute Bindung der Phagenklone blockieren. Damit sind für eine erfolgreiche, kompetitive Elution sowohl die Zeitspanne der spontanen Dissoziation (Smith und Petrenko, 1997) als auch eine hohe Affinität des nativen Liganden zur Zielstruktur entscheidend (Pini *et al.*, 2006). Liganden mit hoher Affinität zur Zielstruktur benötigen im Gegensatz zu solchem mit niedrigerer Affinität für eine spontane Dissoziation einen längeren Zeitraum und können vom nativen Liganden nur verdrängt werden, wenn dessen Affinität die der Phagenklone übersteigt. Die Schwäche einer kompetitiven Elution besteht damit in einer ungenügenden Gewinnung von hochaffinen Bindern, da diese aufgrund der geringeren Affinität des nativen Liganden nicht eluiert werden können (Pini *et al.*, 2006). Die schwächere Affinität kompetitiv eluierter Liganden wird einerseits am Beispiel der geringeren Reaktivität der mittels kompetitiver Elution angereicherten Phagenpopulationen (**Abb. 3.3**) sowie am Ersatzes des NPVE-Motivs in Peptid 12C6 durch das NPVE-Motiv deutlich, welcher eine deutliche Verringerung der Reaktivität mit IgG in Patientenplasma nach sich zog (**Abb.**

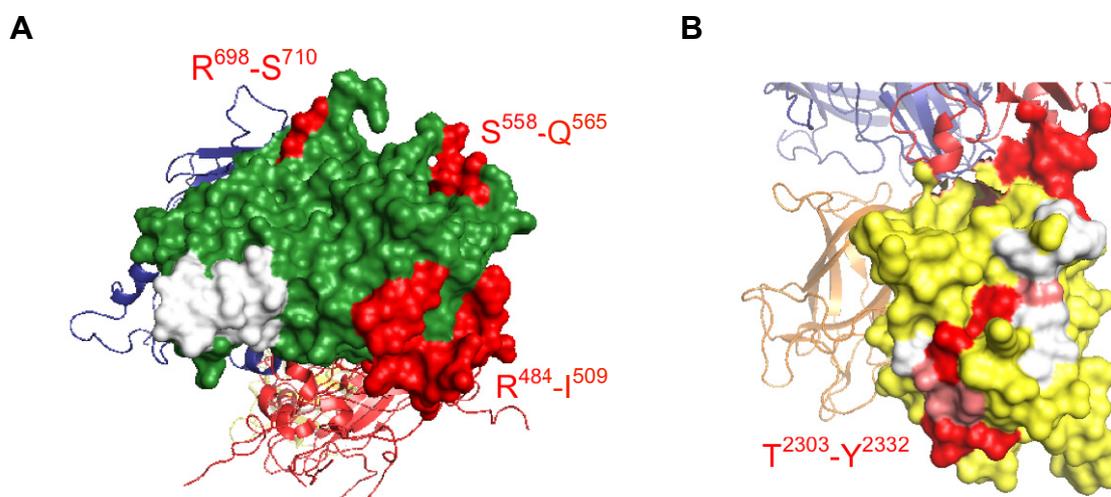
**3.10 B).** Peptide, welche aus Biopannings mit pH-shift Elution selektiert werden, fungieren aufgrund ihrer stärkeren Reaktivität mit anti-FVIII IgG daher eher als funktionelle Mimotope. Aus der parallelen Anwendung beider Elutionsstrategien resultiert eine Redundanz der isolierten Peptidsequenzen. Die dadurch generierte, größere Informationsfülle ermöglicht einen breiteren Einblick in die Natur der zu untersuchenden Protein-Protein Interaktion (Heiskanen *et al.*, 1999; Paradis-Bleau *et al.*, 2005).

### 4.3 Beteiligung der identifizierten Aminosäuren an strukturellen, funktionellen Epitopen FVIII neutralisierender Antikörper

Konformationelle Epitope umfassen meist flexible (Tainer *et al.*, 1984; Geysen *et al.*, 1987), oberflächenpräsente Bestandteile des Antigens (Atassi und Lee, 1978; De L Milton RC und van Regenmortel, 1979) welche in der Tertiärstruktur häufig gut zugänglichen Schleifen sowie hervorstehenden Bereichen entsprechen (Westhof *et al.*, 1984). Die beteiligten Aminosäuren befinden sich in einem Radius von ca. 23Å (Rowley *et al.*, 2004). Der Vergleich der gefundenen Konsensusmotive aus den durchgeführten Biopannings (**Tab 3.1, 3.2**) mit der Kristallstruktur von FVIII mittels der 3DEX-Software ermöglichte die Identifikation von Homologien mit C<sub>α</sub>-Atomabständen zwischen sechs und acht Angström zwischen strukturell benachbarten Aminosäuren. Damit liegen die identifizierten Aminosäuren in einem, für konformationelle Epitope üblichen Radius und bilden gemäß den Darstellungen durch PyMOL-Software oberflächenpräsente, exponierte Bereiche in der A2- sowie der C2-Domäne aus (**Abb. 3.6**). Weiterhin konnten in unmittelbarer Nähe zu diesen Aminosäuren auf der Oberfläche der FVIII-Kristallstruktur weitere AS-Reste lokalisiert werden, welche zusammen mit den gefundenen Konsensusmotiven identifiziert wurden, aber keine weiteren, eigenständigen Motive ausbildeten. Bereits in anderen Studien wurde die Ergänzung eines Epitops, welches durch Homologien zu einem Konsensusmotiv kartiert wurde, durch zusätzliche, in den Peptidsequenzen frequente Aminosäuren, beschrieben (Luzzago *et al.*, 1993).

Ein Abgleich der mittels 3DEX- und PyMOL-Software auf Basis der Konsensusmotive generierten Epitopdaten mit den in der Literatur beschriebenen antigenen Bereichen auf FVIII ergab eine unmittelbare Nähe des möglichen anti-FVIII Antikörperepitops in der A2-Domäne (L<sup>587</sup> T<sup>588</sup> E<sup>589</sup> I<sup>591</sup> Q<sup>592</sup> R<sup>593</sup> P<sup>596</sup> N<sup>597</sup> P<sup>598</sup> A<sup>599</sup> V<sup>601</sup>) zu einem bereits bekannten antigenen Bereich (R<sup>484</sup>-I<sup>508</sup>). Neben den Regionen S<sup>558</sup>-Q<sup>565</sup> sowie R<sup>698</sup>-S<sup>710</sup> (**Abb. 4.1 A**) entspricht dieser Bereich außerdem einer FIX-Interaktionsstelle (Fay und Scandella, 1999). Da die

Bindung von FVIII an FIX primär über Regionen in der A3-Domäne gewährleistet wird, blockieren Antikörperbindungen an die A2-Domäne laut Studien von Fay und Scandella weniger die Bildung des Tenase-Komplexes, als einen konformationellen Wechsel im aktiven Zentrum von FIX, welcher durch die A2-Domäne induziert wird. Eine IgG-Bindung an das in dieser Arbeit identifizierte, mögliche Epitop würde die beschriebene Interaktion zwischen der A2-Domäne und FIX mit hoher Wahrscheinlichkeit ebenfalls blockieren. Dafür sprechen außerdem Epitopdaten des monoklonalen FVIII Inhibitors R8B12, welcher in einem Bereich von S<sup>584</sup>-R<sup>593</sup> an die A2-Domäne bindet (Ansong *et al.*, 2006). Somit überlappen das in dieser Arbeit identifizierte sowie das R8B12-Epitop partiell.



**Abb. 4.1 Vergleich der Epitope mit bekannten Daten.** (A) Es ist die Lage des identifizierten, möglichen FVIII Inhibitorepitops (weiß) in der A2-Domäne im Kontext mit bereits beschriebenen FIX-Interaktionsstellen (rot; R<sup>484</sup>-I<sup>509</sup>, S<sup>558</sup>-Q<sup>565</sup>, R<sup>698</sup>-S<sup>710</sup>) dargestellt. (B) In der C2-Domäne überlappen Aminosäuren (pink) des identifizierten Epitops (weiß) mit einer Bindungsstelle an vWF bzw. Phospholipide (rot; T<sup>2303</sup>-Y<sup>2332</sup>).

Die identifizierten, möglichen anti-FVIII Antikörperepitope (D<sup>2267</sup>H<sup>2269</sup>W<sup>2271</sup>R<sup>2307</sup>, S<sup>2193</sup>E<sup>2228</sup>W<sup>2229</sup>, E<sup>2263</sup>S<sup>2312</sup>W<sup>2313</sup>) in der C2-Domäne überschneiden sich partiell mit einer vWF-Bindungsstelle (Abb. 4.1 B) in C2 (T<sup>2303</sup>-Y<sup>2332</sup>). Eine Antikörperbindung in diesem Bereich könnte eine FVIII-vWF-Interaktion nicht nur direkt inhibieren, sondern außerdem die zweite vWF-Bindungsstelle im sauren α3-Spacer (E<sup>1649</sup>-R<sup>1689</sup>) sterisch blockieren (Saenko *et al.*, 1994). Weiterhin stellt der Bereich um die Aminosäuren T<sup>2303</sup>-Y<sup>2332</sup> eine Bindungsstelle für Phospholipide dar. Da eine Reihe von FVIII-Inhibitoren an einen Bereich der C2-Domäne, welcher die Aminosäuren V<sup>2248</sup>-S<sup>2312</sup> umfasst, binden, wird angenommen, dass eine effektive Blockierung einer FVIII-Bindung an Phospholipide ein Überlappen des Epitops mit der

Phospholipid-Bindungsstelle erfordert (Scandella *et al.*, 1995). Die in dieser Arbeit identifizierten Aminosäuren überlappen demnach ebenso mit einer Phospholipid-Bindungsstelle. Außerdem konnte eine partielle Übereinstimmung mit dem Epitop (F<sup>2196</sup>-Q<sup>2222</sup>) des monoklonalen FVIII neutralisierenden Antikörpers BO2C11 festgestellt werden (Spiegel *et al.*, 2001; Moreau *et al.*, 2006). Dieser Umstand bestätigt sich durch die beobachtete, ähnliche Blockierung von anti-FVIII Antikörper durch Peptid 12H10 und Peptid p107 (**Abb. 3.13 B**). Peptid p107 geht aus Phage Display-Selektionen mit BO2C11 hervor (Villard *et al.*, 2003).

Innerhalb eines strukturellen Epitops wird die Energie für eine Antikörperbindung nur von drei bis fünf sehr gut zugänglichen Aminosäuren im Radius von ca. 9Å, welche als funktionelles Epitop bezeichnet werden, aufgebracht (Jin *et al.*, 1992; Benjamin und Perdue, 1996). Mittels der Phage Display-Technologie lassen sich verhältnismäßig kleine Peptidfragmente isolieren, welche eine starke Reaktivität mit den entsprechenden Antikörpern aufweisen. Tatsächlich haben sich Phage Display-Selektionen als effektives Verfahren zur Identifikation kritischer Kontakt-Aminosäuren erwiesen (Rowley *et al.*, 2004). Die in dieser Arbeit selektierten duodecameren Peptidliganden haben sich als potente Kompetitoren bei der Bindung von IgG an FVIII und bei der partiellen Wiederherstellung dessen Aktivität in Patientenplasma erwiesen (**Abb. 3.12, 3.13**). Die dafür nötige Bindung an FVIII Inhibitoren in den Plasmen wird dabei von einzelnen Aminosäuren in den Konsensusmotiven der Peptide 12C6 und 12H10 vermittelt (**Abb. 3.11**). Bereits der Ersatz einzelner Aminosäuren innerhalb der Konsensusmotive führte zu einem nahezu vollständigen Verlust der IgG-Bindung, während beobachtete Bindungsreduzierungen durch Alaninaustausche von Aminosäuren außerhalb der Motive wahrscheinlich mit konformationellen Wechseln einhergehen, welche die IgG-Bindung beeinflussen. Damit ist es sehr wahrscheinlich, dass die AS-Reste der Konsensusmotive kritische Kontakt-Aminosäuren und damit Bestandteile funktioneller Inhibitorepitope in der A2- sowie C2-Domäne darstellen.

#### **4.4 Beteiligung der identifizierten Aminosäuren an immundominanten Epitopen FVIII neutralisierender Antikörper**

Das Ziel einer Immunantwort besteht in der Neutralisierung eines Fremdproteins. Antikörper binden bevorzugt an Regionen, welche eine möglichst effektive Neutralisation gewährleisten (Ertl *et al.*, 2003). Obwohl im Fall von Proteinantigenen deren gesamte Oberfläche potentiell immunogen ist, richten sich die generierten Antikörper zumeist nur gegen eine begrenzte

Anzahl immundominanter Epitope (Berzofsky, 1985). Diese Eingrenzung der Spezifität der Immunantwort geht mit der Antikörperreifung einher (Brown *et al.*, 1980; Fish *et al.*, 1989). In der vorliegenden Arbeit wurden anti-FVIII Antikörper in Plasmaproben von Patienten im Verlauf unterschiedlicher ITI-Versuche auf ihre Epitopspezifität untersucht. Im Fall von Patient 1 bot sich die Möglichkeit der Untersuchung der Epitopspezifität von FVIII Inhibitoren gegenüber dem fortwährend verabreichten Antigen FVIII im Zuge einer Erradierung des B-Zellsystems mittels des monoklonalen anti-CD20 Antikörpers Rituximab (**Abb. 3.1 A**). Nach erfolgter Depletion der CD20<sup>+</sup>-Zellen, verbunden mit einem Verschwinden der FVIII neutralisierenden Antikörper, begann die B-Zellrepopulation im peripheren Blut wobei FVIII Inhibitoren trotz kontinuierlicher Verabreichung von pdFVIII für weitere 252 Tage nicht detektierbar waren. Im Anschluss an diese Zeitspanne erreichte der Inhibitortiter wieder ein ähnliches Level wie vor Therapie. Unter den Peptiden aus den Phage Display-Selektionen wurde lediglich ein prominentes Konsensusmotiv identifiziert (**Tab 3.1**). Dies lässt auf gleiche oder sehr ähnliche Spezifität für das mögliche anti-FVIII Antikörperepitop um die Aminosäuren E<sup>589</sup>-V<sup>601</sup> vor Therapie und nach erfolgter Repopulation des B-Zellsystems schließen (**Abb. 3.6, 3.8**). IgG aus Plasmen im Therapieverlauf wiesen Kreuzreaktivität mit dem selektierten Peptid 12C6 auf. Jedoch wurde in Plasmen nach Therapie sowohl in Bindungs- als auch Inhibitionsexperimenten eine geringere Reaktivität von Antikörpern mit dem Peptid beobachtet (Daten nicht gezeigt). Aus diesen Daten resultiert die Frage, ob die Beibehaltung der Epitopspezifität der anti-FVIII Antikörper auf serologischem, immunologischem Gedächtnis beruht, für welches sowohl langlebige Plasma- als auch Gedächtnis B-Zellen verantwortlich sind (Slifka und Ahmed, 1996). Langlebige FVIII-spezifische Plasmazellen würden aufgrund nicht vorhandener CD20-Expression von Rituximab nicht beeinträchtigt werden und sollten daher über Jahre stabile Antikörpertiter generieren (Slifka und Ahmed, 1996; Bernasconi *et al.*, 2002; Manz *et al.*, 2005). Das Verschwinden der FVIII Inhibitoren innerhalb von 112 Tagen (**Abb. 3.1 A**) lässt jedoch eher auf die Existenz einer kurzlebigen Plasmazellpopulation schließen (Martin und Chan, 2006). FVIII-spezifischen Gedächtnis-B-Zellen sollten nach Restimulation durch das Antigen innerhalb kürzester Zeit zu ASCs differenzieren. Allerdings scheinen gerade Gedächtnis-B-Zellen eine erhöhte Sensitivität gegenüber Rituximab aufzuweisen (Szodoray *et al.*, 2004). Daraus resultiert eine Beeinträchtigung der primären sowie sekundären Immunantwort gegenüber Gedächtnisantigenen (*recall-antigens*; Gonzales-Stawinski *et al.*, 2001; van der Kolk *et al.*, 2002). Auch im Falle einer Resistenz gegenüber dem anti-CD20 Antikörper sind Gedächtnis-B-Zellen nicht in der Lage, das B-Zellsystem zu repopulieren

(Anolik *et al.*, 2004; Leandro *et al.*, 2006). Weiterhin konnte in einem HA-Maus-Modell gezeigt werden, dass hohe Dosen FVIII die Re-Stimulation FVIII-spezifischer Gedächtnis-B-Zellen inhibieren (Hausl *et al.*, 2005). Allerdings ist es sehr fraglich, ob die hierbei verwendeten Dosen jemals in einem HA-Patienten während einer ITI erreicht werden. Aufgrund des kontinuierlich präsenten Antigens kann anhand der Verläufe des Inhibitor-titers und CD20<sup>+</sup>-Zellen angenommen werden, dass die beobachtete Beibehaltung der Epitopspezifität nicht auf immunologischem Gedächtnis beruht. Vielmehr liegt die Vermutung nahe, dass im Zuge einer neu etablierten B-Zellimmunantwort dasselbe bzw. ein mit E589-A599 stark überlappendes, immundominantes Epitop in der A2-Domäne erkannt wurde. Die Hypothese einer neu etablierten Immunantwort wird durch die beobachteten FVIII-spezifischen Subklassenverläufe gestützt (**Abb. 3.2 A**), da der parallele Verlauf von IgG<sub>1</sub> und IgG<sub>4</sub> den häufig am Beginn einer initialen ITI detektierten Subklassenverläufen entspricht (van Helden *et al.*, 2005). Interessanterweise wurde das NPVE-Motiv auch in einer anderen Arbeit in Epitopkartierungsversuchen unter den Peptidsequenzen aus Phage Display-Selektionen identifiziert (Mühle *et al.*, 2004). Da sich das Augenmerk dieser Arbeit jedoch nicht auf die Lokalisation konformationeller Epitope richtete, konnte es bei dem Vergleich mit der FVIII-Primärsequenz nicht identifiziert werden (Mühle *et al.*, 2004). Gegenüber Peptid 12C6 wies das Peptid I-A1 (NPVERSL; Mühle *et al.*, 2004) in vergleichenden Bindungsstudien zwar ein ähnliches Bindungsprofil mit heterologen Plasmen, jedoch eine deutlich schwächere IgG-Bindung auf (Daten nicht gezeigt).

Im Fall von Patient 2 wurde die Epitopspezifität im Zuge mehrerer Präparatwechselln analysiert (**Abb. 3.1 B**). Unter den Peptidsequenzen ELISA-positiver Klone, welche aus den Phage Display-Selektionen mit Plasmen von Patient 2 hervorgingen, ließen sich zwei unterschiedliche Konsensusmotive, HWR(D) sowie (SP)W<sub>x</sub>EW(F/Y), identifizieren (**Tab 3.2**). AS-Analogien zu diesen Motiven (D<sup>2267</sup>H<sup>2269</sup>W<sup>2271</sup>R<sup>2307</sup>, S<sup>2193</sup>E<sup>2228</sup>W<sup>2229</sup>, E<sup>2263</sup>S<sup>2312</sup>W<sup>2313</sup>) wurden auf der C2-Domäne mit großer räumlicher Nähe zueinander lokalisiert (**Abb. 3.6**). Die Nähe der identifizierten Aminosäuren sowie die beobachtete Kreuzreaktivität von IgG aus Plasmen im Therapieverlauf mit dem selektierten Peptid 12H10 (Daten nicht gezeigt) unterstützen die Hypothese einer kontinuierlichen Epitopspezifität für in großen Teilen überlappende Epitope. Deren beschriebene, mögliche Relevanz (**Abb. 4.1 B**) spricht sehr für eine gemeinsame, immundominante Position der identifizierten Aminosäuren. Wie auch in dieser Arbeit beobachtet, richten sich FVIII Inhibitoren ungeachtet deren immunologischen Ursprungs zumeist gegen die A2- und C2-Domäne (Lollar, 2004). Aufgrund der vermuteten Immundominanz der identifizierten, möglichen A2- und C2-Epitope

wurden die entsprechenden Peptidliganden 12C6 und 12H10 kombiniert und deren Kreuzreaktivität mit einer Vielzahl heterologer Plasmen untersucht (**Abb. 3.14**). Eine mehr als 50%ige Blockierung der Antikörperbindung an FVIII wurde dabei bei neun der 14 getesteten Patientenplasmen beobachtet. Diese Beobachtung unterstreicht die Relevanz der Peptide als Mimotope möglicher, immundominanter Epitope FVIII neutralisierender Antikörper. So spricht auch die momentane Datenlage aus größeren Studien (*Recombinant* und *Kogenate Study Groups*), welche allerdings lediglich eine Untersuchung der Antikörperspezifität anhand rekombinanter FVIII-Domänen beinhaltete, sehr dafür, dass einzelne FVIII Inhibitoren gemeinsame oder ähnliche Epitope in räumlicher Nähe innerhalb der A2- sowie C2-Domäne erkennen (Prescott *et al.*, 1997). Mehr Aufschluss hinsichtlich der Feinspezifität von FVIII-Inhibitoren ist aus den Daten der laufenden *ObsITI*-Studie zu erwarten (Kreuz *et al.*).

#### **4.5 Relevanz der Peptide 12C6 und 12H10 als funktionelle Mimotope FVIII neutralisierender Antikörper**

Phage Display-Selektionen von phagenpräsentierten Peptidbibliotheken wurden bereits in großer Bandbreite zur Identifikation von Peptidliganden für Antikörper verwendet (Scott, 1990; Chen *et al.*, 1996; Heiskanen *et al.*, 1999; Königs *et al.*, 2000; Murray *et al.*, 2001). Generell zeichnen sich selektierte Peptidliganden durch eine hohe Spezifität sowie Selektivität aus. Allerdings erschweren sie funktionelle Tests durch ihre Flexibilität (Pini *et al.*, 2006) und weisen gerade im Zuge von *in vivo*-Einsätzen sehr geringe Stabilität und damit verbundene, niedrige Halbwertszeiten auf (Bracci *et al.*, 2003).

Aufgrund der beschriebenen, mit synthetischen Peptidliganden verbundenen Schwierigkeiten wurden in dieser Arbeit auch Versuche zur Selektion von entsprechenden, anti-idiotypischen scFv-Fragmenten für FVIII-Inhibitoren unternommen. Aus einer phagenpräsentierten, vollsynthetischen scFv-Bibliothek konnten einige wenige Fragmente, welche eine Reaktivität mit IgG in Patientenplasmen aufwiesen, isoliert werden. Allerdings konnten mittels der in *E. coli* exprimierten und aufgereinigten scFvs keine verlässlich reproduzierbaren Bindungs- sowie Inhibitionsdaten generiert werden.

Die Arbeit mit den synthetischen Peptidliganden 12C6 und 12H10 wurde tatsächlich durch die beschriebenen Nachteile beeinträchtigt. Die Etablierung zuverlässiger Bindungs- und Inhibitionstest gestaltete sich im Gegensatz zu analogen Experimenten mit den entsprechenden Phagenklonen als schwierig und war nach anfänglichen Versuchen mit einem

Biotin-Streptavidin-System erst durch den Einsatz von 6xHis-markierten Peptiden in Verbindung mit anti-6xHis Antikörpern möglich. Der Nachweis der Funktionalität der Peptidliganden erfolgte durch die Blockierung der Antikörperbindung in den Patientenplasmen an FVIII. Allerdings gelang es mit den Peptiden nicht, eine 100%ige Inhibition zu erreichen. Die beobachteten Inhibitionswerte lagen unter Berücksichtigung unspezifischer Inhibition durch die Kontrollpeptide bei ca. 60% (**Abb. 3.12 A, C**). Trotz Screening von polyklonalen Plasmen konnte bei den nachfolgenden, unterschiedlichen Analysen der Sequenzen aus den Biopannings jeweils nur ein Konsensusmotiv identifiziert werden. Dies könnte aus einer Limitierung des Phage Display-Verfahrens resultieren, da dessen System offenbar die Selektion von wenigen, hochaffinen Liganden begünstigt. Daher ist von der Präsenz weiterer anti-FVIII Antikörper in den polyklonalen Plasmen auszugehen. In Bindungstests mit rekombinanten FVIII-Domänen wurde eine, für FVIII Inhibitoren übliche Reaktivität mit A2- und C2-Domäne, detektiert (Lollar, 2004). In dem sehr sensiblen, ELISA-basierten System der etablierten Inhibitionstests könnten bereits schwach bindende Antikörper die beobachtete Inhibition verringern. Allerdings wurde auch in Inhibitionstests mit der einzelnen A2- bzw. C2-Domäne keine 100%ige Inhibition erreicht (**Abb. 3.12 B, D**). Dies kann ebenso auf Polyklonalität der Plasmen sowie eine Beeinträchtigung der biologischen Aktivität der frei in Lösung vorliegenden Peptide aufgrund deren Flexibilität zurückgehen. Letzteres war bereits in anderen Studien für ein Scheitern von Inhibitionsexperimenten mit synthetischen Peptiden aus Phage Display-Selektionen verantwortlich. In weiterführenden Experimenten konnte allerdings eine deutliche Spezifität der Peptide nachgewiesen werden (Pini *et al.*, 2006).

Auch der erfolgreiche Einsatz der Peptide im Bethesda-Test erwies sich als schwierig. Dieser Test, welcher die FVIII-Aktivität anhand erfolgter plasmatischer Koagulation detektiert, zeichnet sich generell durch begrenzte Sensitivität und eine starke Schwankung der Messwerte aus. Aufgrund der geringen Sensitivität des Tests konnte Patientenplasma nur in geringer Verdünnung bzw. unverdünnt eingesetzt werden, was den Einsatz von hohen Peptidkonzentrationen erforderte. Für einen Nachweis der Bindung der Peptide 12C6 und 12H10 an neutralisierende anti-FVIII Antikörper war dieser Test allerdings unerlässlich (**Abb. 3.12 E, F**). In diesen Experimenten zeigte sich, dass die zugegebenen Peptide zwar die Bindung von FVIII-Inhibitoren blockieren, die Interaktion zwischen FVIII und FIX sowie Phospholipiden und damit den Ablauf des intrinsischen Reaktionsweges der plasmatischen Koagulation jedoch offenbar nicht beeinträchtigen (Villard *et al.*, 2003). Im Gegensatz hierzu

blockierten von der Primärsequenz abgeleitete Peptidfragmente der C2-Domäne die Bindung von FVIII an Phospholipide (Foster *et al.*, 1990).

Die experimentell gewonnenen Erkenntnisse stellen den Charakter von Peptid 12C6 und 12H10 als funktionelle Mimotope für FVIII-Inhibitoren heraus. Die Peptide weisen einerseits eine selektive, hohe Reaktivität mit neutralisierenden anti-FVIII Antikörpern auf, verfügen andererseits jedoch nicht über ein so hohes Maß an Analogie zum nativen Antigen, dass sie dessen Bindungsstellen auf Phospholipiden oder FIX besetzen würden (Villard *et al.*, 2003).

#### **4.6 Bindung von IgG<sub>1</sub> und IgG<sub>4</sub> anti-FVIII Antikörpern durch die funktionellen Mimotope**

Die polyklonale IgG-Population der FVIII neutralisierenden Antikörper ist der Th2-induzierten IgG<sub>4</sub>- sowie Th1-induzierten IgG<sub>1</sub>-Klasse zuzuordnen (Fulcher *et al.*, 1987). Es scheint eine Korrelation zwischen einer massiven, humoralen Immunantwort gegen FVIII und vornehmlich Th2-induzierten Subklassen (IgG<sub>4</sub>) zu bestehen, während Th1-induzierte Subklassen (IgG<sub>1</sub>) primär für die Aufrechterhaltung einer Langzeitimmunantwort gegen das Protein verantwortlich sind (Reding *et al.*, 2002). Die Subklassenverläufe der Patienten 1 und 2 im jeweiligen Therapieverlauf bestätigten eine Existenz von anti-FVIII Antikörpern der Subklassen IgG<sub>1</sub> sowie IgG<sub>4</sub> (**Abb. 3.2**). Entsprechende Antikörper der übrigen Subklassen wurden nicht detektiert. Insbesondere im Fall von Patient 2 wurde deutlich, dass der IgG<sub>4</sub>-Verlauf unmittelbar mit hoher Inhibitor-Aktivität (BE/ml) korrelierte, während IgG<sub>1</sub> bei hohen wie niedriger Aktivität nahezu konstant blieb.

Bei der Analyse der Domänenspezifitäten der anti-FVIII Antikörper in den getesteten Plasmen wurden die A2- bzw. C2-Domäne primär von IgG<sub>4</sub> erkannt, während IgG<sub>1</sub> deutlich weniger reaktiv war (**Abb. 3.8 C, D**). Die Peptide, die potentielle, funktionelle Mimotope immundominanter Inhibitorepitope auf der A2- bzw. C2-Domäne darstellten, wiesen in Bindungsstudien jedoch nahezu ausschließlich Reaktivität mit IgG<sub>1</sub> auf (**Abb. 3.10 E**). Allerdings war mit diesen Peptiden trotz primärer Erkennung des Antigens durch IgG<sub>4</sub> eine deutliche Blockierung der Antikörperbindung an FVIII möglich (**Abb. 3.12**). Tatsächlich ist über Epitopspezifitäten der unterschiedlichen IgG-Subklassen wenig bekannt. Gegenüber Proteinantigenen wird nach einer initialen IgG<sub>1</sub>-Antwort IgG<sub>4</sub> als Folge einer Langzeitexposition eines Antigens gegenüber dem Immunsystem induziert. Dabei konnte gezeigt werden, dass die Bindung von IgG<sub>4</sub> an das Antigen eine gleichzeitige IgG<sub>1</sub>-Bindung blockiert und damit IgG<sub>1</sub>-vermittelte, immunpathogene Effekte reduziert (Aalberse und

Schuurman, 2002). Somit sollten antigenspezifisches IgG<sub>1</sub> und IgG<sub>4</sub> ein gleiches oder sehr ähnliches Epitop erkennen. Dabei können antigenspezifische Antikörper verschiedener Subklassen Unterschiede in ihrer Feinspezifität aufweisen. Diese Unterschiede resultieren offenbar aus einem komplexen Zusammenspiel der variablen und konstanten Regionen der schweren IgG-Ketten, welche eventuelle auf Variationen der F(ab')<sub>2</sub>-Struktur beruhen (Torres *et al.*, 2005). Weiterhin wurde gefunden, dass IgG<sub>4</sub> eher zu einer Erkennung komplexer, konformationeller Epitope in der Lage ist (Olsson *et al.*, 2001). Dies kann durch die Bispezifität der Antikörper der IgG<sub>4</sub>-Population bedingt sein (Schuurman *et al.*, 1999), welche diese zu einer Bindung unterschiedlicher, distinkter Regionen, gerade auf großen Proteinantigenen wie FVIII, befähigt. Dahingegen vermag IgG<sub>1</sub> hauptsächlich lineare Peptide zu erkennen (Olsson *et al.*, 2001) und bindet diese, vor allem in immobilisierter Form im Gegensatz zu IgG<sub>4</sub> (Horgan *et al.*, 1993), deutlich besser. Aufgrund der eventuell erforderlichen Konformationen für eine Bindung von IgG<sub>4</sub> sowie dessen schlechterer Reaktivität mit linearen Peptiden konnte demnach eben diese in Bindungsstudien mit 12C6 und 12H10 nicht detektiert werden. Wie aus den Inhibitionsdaten hervorgeht, muss durch die Peptide in Lösung jedoch eine Antikörperbindung ungeachtet deren Subklassenzugehörigkeit und daraus resultierender, eventueller Unterschiede hinsichtlich deren Feinspezifität erfolgen. Es wurde bereits gezeigt, dass Antikörper mit Variationen in deren variablen Regionen Antigen in Lösung im Gegensatz zu immobilisiertem Antigen deutlich besser binden können (Horgan *et al.*, 1992). Tatsächlich können die Peptide 12C6 und 12H10 somit funktionelle Mimotope für antigene Determinanten eines gleichen oder ähnlichen IgG<sub>1</sub> sowie IgG<sub>4</sub>-Epitops darstellen.

#### **4.7 Multimerisierung der Mimotope als Basis zur Entwicklung therapeutisch nutzbarer Proteine**

Die Multimerisierung von funktionellen Peptidliganden hat sich als wirkungsvolle Strategie zur Generierung stabiler, multivalenter Proteine erwiesen. Allerdings wird bei vielen dieser Multimerisierungsverfahren, beispielsweise mittels Polyethylen-Glykol (PEG), Dextran, Streptavidin oder Heytalsin nach wie vor auf synthetische Peptide zurückgegriffen und erfordert demnach eine kostenintensive Generierung großer Mengen der Liganden (Tam, 1988; Renschler *et al.*, 1994; Libyh *et al.*, 1997). Die Multimerisierung von Peptidliganden durch deren Fusion an die Multimerisierungsdomäne der  $\alpha$ -Kette des humanen C4-Bindeproteins und deren Expression in einem eukaryotischen System vereint mehrere

Vorteile in sich (Libyh *et al.*, 1997; Dervillez *et al.*, 2006). Durch die rekombinante Expression der Peptide in Verbindung mit C4bp $_{\alpha}$  erfolgt die Multimerisierung nicht durch ein aufwendiges Verfahren, sondern auf natürlichem Weg über die fusionierte Multimerisierungsdomäne innerhalb der Zelle. Die trunke Multimerisierungsdomäne verfügt über keinerlei biologische Funktion und entstammt einem humanem, natürlich im Plasma vorliegendem Protein, so dass wahrscheinlich keine Immunogenität zu erwarten ist (Libyh *et al.*, 1997). Die eukaryotische Expression der Proteine ermöglicht außerdem die Einführung von post-translationalen Modifikationen, welche für einen Mimotopcharakter der präsentierten Peptide entscheidend sein könnten.

Die Expression der Peptide 12C6 und 12H10 in multimerer Form resultierte in Strukturen (12C6<sub>M</sub>, 12H10<sub>M</sub>), welche im Vergleich zu monomeren, synthetischen Peptiden hinsichtlich des Dosis-Wirkungszusammenhangs eine 50fach, bei Berücksichtigung der möglichen Valenzen der Heptamere siebenfach, verbesserte IgG-Bindung in Patientenplasmen sowie ca. 20fach (ca. dreifach) verbesserte Inhibition von anti-FVIII Antikörpern aufwies (Abb. 3.18, Abb. 3.19 C, D). Diese Beobachtungen gehen einerseits auf die Multivalenz der in heptamerer Form (Abb. 3.17 A) exprimierten Peptide zurück und entsprechen den Beobachtungen in anderen Studien (Pini *et al.*, 2006). Andererseits beeinflusst wohl auch die strukturelle Integrität (Abb. 3.17 B, C), welche die Peptide in multimerer Form erlangen, die IgG-Bindung. Die N-terminale Fusion der Peptide an C4bp $_{\alpha}$  könnte einen konformationellen Kontext ergeben, welcher dem, der ebenfalls N-terminalen Fusion an das pIII-Hüllprotein des M13-Phagen entspricht. Die dadurch verminderte Flexibilität der Peptide resultiert gegenüber den synthetischen Monomeren in einer gesteigerten biologischen Aktivität (Pini *et al.*, 2006; Dervillez *et al.*, 2006). Außerdem könnten post-translationale Modifikationen in den exprimierten C4bp $_{\alpha}$ -Peptid-Multimeren zu einer Verstärkung des Mimotopcharakters der Peptide führen. Trotz gleicher Anzahl von Aminosäuren der C4bp $_{\alpha}$ -Peptid-Monomere konnten bei der Analyse verschiedener multimerer Proteine unter reduzierenden und nicht-reduzierenden Bedingungen im Western Blot unterschiedliche Molekulargewichte detektiert werden (Daten nicht gezeigt). Eine Ursache hierfür könnten post-translationale eingeführte Glykosylierungen sein. Es konnte bereits gezeigt werden, dass Glykosylierungsmuster von Peptiden einen Einfluß auf deren biologische Aktivität haben (Dervillez *et al.*, 2006).

Im Hinblick auf eine effektive Blockierung einer polyklonalen Population von FVIII Inhibitoren erscheint der Einsatz von Peptidmixturen, welche funktionelle Mimotope immundominanter Epitope darstellen, interessant. Da sich die Population der FVIII Inhibitoren zumeist gegen die A2- und C2-Domäne richten (Lollar, 2004) und die selektierten

Peptide 12C6 und 12H10 funktionelle Mimotope potentiell immundominanter Epitope darstellen, wurden diese in Inhibitionstests kombiniert. Sowohl im Bethesda-Test (**Abb. 3.13 C**) als auch ELISA-basierten Inhibitionstests konnte hierdurch die FVIII-Bindung durch anti-FVIII Antikörper noch effektiver inhibiert werden (**Abb. 3.13 A, 3.14**). Durch Cotransfektion der Vektoren pEF-IRESp-C4bp<sub>α</sub>-12C6 und pEF-IRESp-C4bp<sub>α</sub>-12H10 wurden in 293T-Einzelklonen heteromere Proteine exprimiert (12C6/H10<sub>M</sub>). Im Gegensatz zu einer äquimolaren Kombination der beiden Homomultimere (**Abb. 3.18 A**), wiesen diese (12C6/H10<sub>M</sub>) gleiche Reaktivität mit IgG in Plasma von Patient 1 und 2 auf (**Abb. 3.18 B**). In Bindungsstudien war bei gleicher Konzentration die Reaktivität von IgG in Plasma von Patient 2 mit 12C6/H10<sub>M</sub> gegenüber 12H10<sub>M</sub> deutlich besser. Da sich die Strukturen von 12C6<sub>M</sub> und 12H10<sub>M</sub> in den *in silico*-Vorhersagen doch offensichtlich unterscheiden (**Abb. 3.17 B, C**), besteht die Möglichkeit, dass im heteromultimeren Kontext die Einnahme einer, für die Antikörperbindung noch günstigeren Konformation von Peptid 12H10 erfolgt. *In silico* generierte Strukturmodelle von C4bp<sub>α</sub>-12C6/C4bp<sub>α</sub>-12H10-Dimeren wiesen im Gegensatz zu C4bp<sub>α</sub>-12H10-Dimeren eine deutlich bessere Exposition von Peptid 12H10 auf (Daten nicht gezeigt). Gemäß den erhaltenen Inhibitionsdaten durch eine Kombination der synthetischen Peptide 12C6 und 12H10 in Plasma von Patient 1 (**Abb. 3.13 A**), wurde durch das Heteromultimer gegenüber den Homomultimeren eine verbesserte Inhibition erreicht (**Abb. 3.19 C**). Mit dem Heteromultimer gelang im Gegensatz zu synthetischen Peptiden eine nahezu 100%ige Inhibition von anti-FVIII Antikörpern, was auf die bereits beschriebene, verbesserte biologische Aktivität der Peptide im multimeren Kontext zurückgehen kann (Pini *et al.*, 2006; Dervillez *et al.*, 2006). Im Fall von Patient 2 wurde eine maximale Inhibition bereits durch das 12H10-Homomultimer erreicht (**Abb. 3.19 D**). Wie bereits aus der Kombination der Peptide 12C6 und 12H10 hervorging (**Abb. 3.13 B**), resultierte auch aus deren gemeinsamer Expression in einem Heteromultimer keine effizientere Inhibition (**Abb. 3.19 D**). Für die leichte Kette (A3-C1-C2) von FVIII wurde bereits beschrieben, dass diese häufig in der Lage ist, die volle Inhibitor-Aktivität in Patientenplasmen zu blockieren (Nordfang *et al.*, 1987). Eventuell ist ähnliches für Peptid 12H10 bzw. 12H10<sub>M</sub> als funktionelle Mimotope eines potentiell immundominanten Epitops der leichten Kette anzunehmen.

Durch die Multimerisierung der selektierten Peptidliganden über C4bp<sub>α</sub> wurden Proteine generiert, welche, entsprechend den Beobachtungen aus anderen Studien (Oudin *et al.*, 2000), bereits im Kulturüberstand bei 4°C über mehrere Monate stabil waren (Daten nicht gezeigt). Gegenüber synthetischen Peptiden konnte unter Inkubation bei 37°C eine deutliche

Verbesserung der Halbwertszeiten von ca. 12 auf 60 Stunden bei gleichzeitiger Beibehaltung der biologischen Aktivität sowohl in PBS als auch humanem Plasma gezeigt werden (**Abb. 3.20**). Auch in anderen Studien erwiesen sich multimerisierte Peptidliganden gegenüber Proteasen und Peptidasen als sehr stabil. Aus der Multimerisierung resultiert eine Zunahme an Masse, welche den Abbau der Proteine durch im Plasma präsente, vornehmlich gegen kurze Peptide agierende Metallo-Oligopeptidasen verhindert (Bracci *et al.*, 2003).

Die Multimerisierung der Peptide 12C6 und 12H10 erweist sich somit als effektives Konzept zur Generierung sehr stabiler, multivalenter Proteine mit hoher Spezifität für anti-FVIII Antikörper. Die Möglichkeit der Kombination mehrerer funktioneller Mimotope immundominanter Epitope ermöglicht die Erstellung multispezifischer Strukturen, welche vor allem für einen Einsatz gegen polyklonale Inhibitorpopulationen interessant erscheinen.

#### 4.8 Mimotop-vermitteltes Targeting antigenspezifischer B-Zellen

Die gezielte Ansteuerung (Targeting) von antigenspezifischen B-Zellen wird durch deren, hochaffinen B Zellrezeptor ermöglicht. Als Liganden kommen neben dem nativen Antigen, bzw. dessen Derivaten (Proby *et al.*, 2000; Zocher *et al.*, 2003; Reiners *et al.*, 2004; Stöcker *et al.*, 2005) oder anti-idiotypischen Antikörpern (Sasaki *et al.*, 1989) auch Peptide in Frage (Renschler *et al.*, 1994; Buhl *et al.*, 2002). B-Zellrezeptoren von Gedächtnis B-Zellen bestehen neben IgA, IgD und IgM primär aus membranständigem, affinitätsgereiftem IgG. Dieses entspricht den von Plasmazellen sekretierten Antikörpern. Mittels des Phage Display-Verfahrens selektierte Peptidliganden sollten demnach neben der Bindung mit IgG in Plasma oder Serum auch eine Erkennung der entsprechenden Gedächtnis-B-Zellen ermöglichen (Renschler *et al.*, 1994; Buhl *et al.*, 2002).

Zum Nachweis von Gedächtnis-B-Zellen wurden in der vorliegenden Arbeit die Marker CD19, CD27 sowie membranständiges IgG detektiert. Verschiedene Kombinationen dieser Marker erwiesen sich zur Detektion FVIII-spezifischer sowie Peptid-bindender B-Zellen als unterschiedlich geeignet. So ließen sich in PBMC-Präparationen von Inhibitor-positiven Patienten 1-2% FVIII-spezifische Gedächtnis-B-Zellen (CD19<sup>+</sup>IgG<sup>+</sup>) durchflußzytometrisch am deutlichsten nach vorheriger Abgrenzung der CD19<sup>+</sup> Zellen detektieren (**Abb. 3.21**). Mit den Peptiden 12C6 sowie 12H10 ließen sich  $3 \pm 2\%$  der CD19<sup>+</sup>IgG<sup>+</sup> Zellen in PBMC Präparationen von Patient 1 (**Abb. 3.22**) bzw.  $1 \pm 0.5\%$  dieser Zellpopulation von Patient 2 anfärben. Für beide Patienten war in unterschiedlichen PBMC-Präparationen im Gegensatz zu den verwendeten Kontrollpeptiden sowie PBMCs von gesunden Spendern wiederholt eine

spezifische, durchflußzytometrische Detektion peptidgefärbter Zellen möglich, die Frequenzen variierten jedoch stark. Am eindeutigsten ließen sich entsprechende Zellen durch vorherige Abgrenzung der CD19<sup>+</sup>IgG<sup>+</sup> Population und anschließender, gleichzeitiger Betrachtung von membranständigen IgG sowie gebundenem Peptid detektieren. Sowohl Peptide als auch anti-IgG Antikörper sollten dabei an membranständiges IgG auf der Zelloberfläche binden. Ein ähnlicher Ansatz erwies sich zur Detektion von antigenspezifischen Zellen durch gleichzeitige Färbung mit unterschiedlich markiertem Antigen als sehr effektiv (Townsend *et al.*, 2001).

Ein generelles Problem bei der Detektion von FVIII-spezifischen sowie Peptid-bindenden Gedächtnis-B-Zellen bestand in deren niedriger Frequenz im peripheren Blut sowie der schwierigen Verfügbarkeit von ausreichendem, und aufgrund der erfolgten Kryopräservierung, qualitativ hochwertigem Zellmaterial der hämophilen Patienten. Die beobachteten Frequenzen antigenspezifischer B-Zellen entsprechen den in anderen Studien mit humanen PBMCs evaluierten Werten von 0.04-2% IgG<sup>+</sup>, Antigen bindender Zellen (Leyendeckers *et al.*, 2002; Crotty *et al.*, 2004). Ein Ansatz zur Umgehung der niedrigen Frequenz antigenspezifischer Gedächtnis-B-Zellen im peripheren Blut bestand in der Immortalisierung der B-Zellpopulation mittels des Epstein-Barr-Virus (EBV). EBV-transformierte B-Zellen weisen eine deutliche Expression von B-Zellrezeptoren auf (Lavens *et al.*, 2004). Dieser Ansatz erschien vor allem daher interessant, da er Unabhängigkeit von rarem Patientenmaterial sowie konstante Voraussetzungen für weiterführende Experimente versprach. Mittels Zellkulturüberständen einer EBV-exprimierenden Zelllinie (B95-8; Miller und Lipman, 1973) konnten B-Zellen aus PBMC Populationen über einen Zeitraum von mehr als sechs Wochen am Leben erhalten werden. Gemäß den Beobachtungen in anderen Studien (Wiesner *et al.*, 2008), wurde dabei ein Auswachsen von B-Zellen mit charakteristischem Phänotyp EBV-transformierter Zellen sowie Ansäuerung des Kulturmediums festgestellt. In dieser Zeit war zwar eine schwache IgG-Expression nachweisbar, FVIII spezifisches IgG ließ sich jedoch nicht detektieren (Daten nicht gezeigt). Wie von Stöcker *et al.* beschrieben, erfordert eine erfolgreiche Anreicherung von immortalisierten, antigenspezifischen B-Zellen allerdings deren wiederholte Selektion. Dies war jedoch aufgrund der geringen, vorhandenen Zellmengen nicht möglich.

Da es nicht gelungen war, mittels immortalisierter B-Zellen aus Patienten konstante Versuchsbedingungen für weitere Experimente zu gewährleisten, sollte der Nachweis einer zielgerichteten Ansteuerung FVIII-spezifischer Gedächtnis-B-Zellen in PBMC-Präparationen durch die selektierten Peptide in einem funktionellen Test auf Basis des ELISPOT-Verfahrens

erfolgen. Dies war vor allem zur Untersuchung eines spezifischen, toxischen Effektes der D(KLAKLAK<sub>2</sub>)-gekoppelten Peptide von Interesse. Nach polyklonaler Stimulation (Bernasconi *et al.*, 2002; Crotty *et al.*, 2004) konnten in PBMC-Präparationen gesunder Spender 0.3-1.5% Tetanus-spezifische Gedächtnis-B-Zellen detektiert werden (**Abb. 3.24 A, B**), was der beobachteten Frequenz dieser Zellen in anderen Studien entspricht (Oshiba *et al.*, 1994). Allerdings war es unter Verwendung gleicher Stimulationsbedingungen, trotz Messung einer schwachen Expression von anti-FVIII IgG im ELISA, nicht möglich, FVIII-spezifische Gedächtnis-B-Zellen im ELISPOT zu detektieren. In anderen Studien zur Detektion FVIII-spezifischer Gedächtnis-B-Zellen gelang dies nur in PBMCs von einem aus sechs getesteten Patienten. Dieser Patient wies einen Inhibitortiter von 1000 BE/ml auf, während die inhibitorische Aktivität in den Plasmen der übrigen Patienten ca. 30 BE/ml betrug (Lang *et al.*, 2006). Dies entspricht den momentanen, gemessenen Inhibitortitern ( $\leq 30$  BE/ml) der Patienten, deren Zellen in dieser Arbeit für Stimulation sowie ELISPOT-Tests verwendet wurden. Aufgrund des limitierten Zellmaterials war für Durchflußzytometrie- sowie ELISPOT-Analysen die Verwendung von Zellen unterschiedlicher Therapie-Zeitpunkte unumgänglich. Gründe für die nicht erfolgte Detektion FVIII-spezifischer B-Zellen sind einerseits in starken Frequenzschwankungen zirkulierender Gedächtnis-B-Zellen aufgrund unterschiedlicher Restimulation mit FVIII, andererseits in der Sensitivität des ELISPOT-Verfahrens zu suchen (Lang *et al.*, 2006). In Kulturüberständen stimulierter Zellen von Patienten sowie gesunden Spendern, welche mit D(KLAKLAK<sub>2</sub>)-gekoppeltem Peptid 12C6 (12C6-K) präinkubiert worden waren, wurde die Expression von Gesamt-IgG (**Abb. 3.24 D**) sowie die Sekretion von anti-Tetanus IgG nicht beeinflusst (Daten nicht gezeigt). Dagegen wurde in Überständen stimulierter Zellen von Patient 1 eine Reduktion von FVIII-spezifischen IgG beobachtet (**Abb. 3.24 A**). Da keine der verwandten Kontrollen diesen Effekt aufwies, mag dies trotz mangelnder, statistischer Signifikanz auf eine erfolgreiche Depletion FVIII-spezifischer Zellen hindeuten.

#### 4.9 Schlussfolgerung

Mittels des Phage Display-Verfahrens ließen sich Peptide selektieren, welche eine hohe Spezifität für FVIII neutralisierende Antikörper aufwiesen. Während aus Selektionen mit pH-shift Elution vornehmlich potente, funktionelle Liganden isoliert wurden, welche FVIII-Inhibitoren blockieren konnten, wurde durch die parallele Anwendung kompetitiver Elutionen mit hochdosiertem FVIII eine Redundanz der selektierten Peptidsequenzen erreicht, welche

gerade für eine Feinkartierung von anti-FVIII Antikörperepitopen hilfreich war. Die hierzu angewandte Kombination einer Software-basierten Kartierung, basierend auf den selektierten Konsensusmotiven, mit einer Verifizierung der vorgegebenen Domänenspezifität sowie dem Vergleich mit existierenden Epitopdaten lässt eine sehr wahrscheinliche Beteiligung der identifizierten Aminosäuren an konformationellen Inhibitorepitopen vermuten. Die Identifikation gleicher oder sehr ähnlicher Epitope im Verlauf, sowie die Kreuzreaktivität entsprechender funktioneller Mimotope lassen zudem auf eine Immundominanz der möglichen Inhibitorepitope schließen. Basierend auf der in dieser Arbeit beschriebenen Vorgehensweise zur Epitopkartierung von anti-FVIII Antikörpern werden von unserer Arbeitsgruppe mittlerweile Epitop-Spezifitäten von FVIII-Inhibitoren in Plasmen einer Vielzahl von Patienten im Rahmen der internationalen *Observational ITI Study* (ObsITI) analysiert. Daneben werden noch weitere immunologische Parameter wie antigenspezifische IgG-Subklassen sowie die Frequenz FVIII-spezifischer Gedächtnis-B-Zellen evaluiert.

Wie aus der Kombination der selektierten Peptide 12C6 und 12H10 hervorgeht, ist für eine effektive Blockierung einer polyklonalen FVIII-Inhibitor-Population ein Mix von Mimotopen immundominanter Epitope interessant. Vor diesem Hintergrund erscheint das in diesem Kontext eingeführte Multimerisierungskonzept attraktiv. Gegenüber synthetischen Peptidliganden gewährleistet es nicht nur eine Expression von Mimotopen mit höherer, biologischer Aktivität, sondern außerdem eine kombinierte Expression von Peptidliganden mit unterschiedlicher Spezifität in einem hochstabilen Protein. Inwiefern selektierte Inhibitorspezifische Peptide tatsächlich in der Lage sind FVIII-spezifische Gedächtnis-B-Zellen anzusteuern und diese, mittels Fusion an eine toxische Domäne zu depletieren, konnte nur im Ansatz gezeigt werden. Auch in diesem Kontext erscheinen die Peptidmultimere interessant, da multimerisierte Peptidliganden durch Bindung an den B-Zellrezeptor in B-Zellen Apoptose zu induzieren vermögen (Renschler *et al.*, 1994). Die größte Hürde besteht hierbei allerdings in der Entwicklung eines adäquaten, funktionellen Testsystems für diese, sehr rare Zellpopulation. Eine Lösungsmöglichkeit bestünde in *in vivo*-Studien in einem humanisierten, hämophilen Mausmodell.

## 5. Literatur

- Aalberse R. C. and Schuurman J. (2002) IgG4 breaking the rules. *Immunology* **105**, 9-19.
- Abbas A. K., Murphy K. M. and Sher A. (1996) Functional diversity of helper T lymphocytes. *Nature* **383**, 787-93.
- Albert T., Lange S., Oldenburg J., Graw J., Schramm W., Hanfland P., Brackmann H. H. and Schwaab R. (2003) [Characterization of factor VIII antibody epitopes from haemophilia A patients using cellulose bound FVIII peptide libraries]. *Hamostaseologie* **23**, 13-7.
- Anolik J. H., Barnard J., Cappione A., Pugh-Bernard A. E., Felgar R. E., Looney R. J. and Sanz I. (2004) Rituximab improves peripheral B cell abnormalities in human systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* **50**, 3580-90.
- Ansong C., Miles S. M. and Fay P. J. (2006) Epitope mapping factor VIII A2 domain by affinity-directed mass spectrometry: residues 497-510 and 584-593 comprise a discontinuous epitope for the monoclonal antibody R8B12. *J Thromb Haemost* **4**, 842-7.
- Antonarakis S. E. (1995) Molecular genetics of coagulation factor VIII gene and hemophilia A. *Thromb Haemost* **74**, 322-8.
- Atassi M. Z. and Lee C. L. (1978) The precise and entire antigenic structure of native lysozyme. *Biochem J* **171**, 429-34.
- Barrow R. T., Healey J. F., Gailani D., Scandella D. and Lollar P. (2000) Reduction of the antigenicity of factor VIII toward complex inhibitory antibody plasmas using multiply-substituted hybrid human/porcine factor VIII molecules. *Blood* **95**, 564-8.
- Barrow R. T., Healey J. F., Jacquemin M. G., Saint-Remy J. M. and Lollar P. (2001) Antigenicity of putative phospholipid membrane-binding residues in factor VIII. *Blood* **97**, 169-74.
- Becker S., Simpson J. C., Pepperkok R., Heinz S., Herder C., Grez M., Seifried E. and Tonn T. (2004) Confocal microscopy analysis of native, full length and B-domain deleted coagulation factor VIII trafficking in mammalian cells. *Thromb Haemost* **92**, 23-35.
- Benjamin D. C. and Perdue S. S. (1996) Site-Directed Mutagenesis in Epitope Mapping. *Methods* **9**, 508-15.
- Bernasconi N. L., Traggiai E. and Lanzavecchia A. (2002) Maintenance of serological memory by polyclonal activation of human memory B cells. *Science* **298**, 2199-202.
- Berntorp E. (1996) The treatment of haemophilia, including prophylaxis, constant infusion and DDAVP. *Baillieres Clin Haematol* **9**, 259-71.
- Berntorp E. (2001) Immune tolerance induction: recombinant vs. human-derived product. *Haemophilia* **7**, 109-13.
- Berntorp E. (2003) Variation in factor VIII inhibitor reactivity with different commercial factor VIII preparations: is it of clinical importance? *Haematologica* **88**, EREP03.
- Berzofsky J. A. (1985) Intrinsic and extrinsic factors in protein antigenic structure. *Science* **229**, 932-40.
- Bjoreck P., Flores-Romo L. and Liu Y. J. (1997) Human interdigitating dendritic cells directly stimulate CD40-activated naive B cells. *Eur J Immunol* **27**, 1266-74.
- Bogdanova N., Lemcke B., Markoff A., Pollmann H., Dworniczak B., Eigel A. and Horst J. (2001) Seven novel and four recurrent point mutations in the factor VIII (F8C) gene. *Hum Mutat* **18**, 546.

- Boots L. J., McKenna P. M., Arnold B. A., Keller P. M., Gorny M. K., Zolla-Pazner S., Robinson J. E. and Conley A. J. (1997) Anti-human immunodeficiency virus type 1 human monoclonal antibodies that bind discontinuous epitopes in the viral glycoproteins can identify mimotopes from recombinant phage peptide display libraries. *AIDS Res Hum Retroviruses* **13**, 1549-59.
- Bowen D. J. (2002) Haemophilia A and haemophilia B: molecular insights. *Mol Pathol* **55**, 127-44.
- Bracci L., Falciani C., Lelli B., Lozzi L., Runci Y., Pini A., De Montis M. G., Tagliamonte A. and Neri P. (2003) Synthetic peptides in the form of dendrimers become resistant to protease activity. *J Biol Chem* **278**, 46590-5.
- Bril W. S., van Helden P. M., Hausl C., Zuurveld M. G., Ahmad R. U., Hollestelle M. J., Reitsma P. H., Fijnvandraat K., van Lier R. A., Schwarz H. P., Mertens K., Reipert B. M. and Voorberg J. (2006) Tolerance to factor VIII in a transgenic mouse expressing human factor VIII cDNA carrying an Arg(593) to Cys substitution. *Thromb Haemost* **95**, 341-7.
- Brown A. R., DeWitt C. L., Bosma M. J. and Nisonoff A. (1980) Dominance of an immune response by secondary cells: quantitation by allotype analysis. *J Immunol* **124**, 250-4.
- Broze G. J., Jr., Leykam J. E., Schwartz B. D. and Miletich J. P. (1985) Purification of human brain tissue factor. *J Biol Chem* **260**, 10917-20.
- Buhl L., Szecsi P. B., Gisselo G. G. and Schafer-Nielsen C. (2002) Surface immunoglobulin on B lymphocytes as a potential target for specific peptide ligands in chronic lymphocytic leukaemia. *Br J Haematol* **116**, 549-54.
- Cheadle C., Ivashchenko Y., South V., Searfoss G. H., French S., Howk R., Ricca G. A. and Jaye M. (1994) Identification of a Src SH3 domain binding motif by screening a random phage display library. *J Biol Chem* **269**, 24034-9.
- Chen Y. C., Delbrook K., Dealwis C., Mimms L., Mushahwar I. K. and Mandeckl W. (1996) Discontinuous epitopes of hepatitis B surface antigen derived from a filamentous phage peptide library. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**, 1997-2001.
- Collins P. W. (2006) Novel therapies for immune tolerance in haemophilia A. *Haemophilia* **12** Suppl 6, 94-100; discussion 100-1.
- Cortese R., Felici F., Galfre G., Luzzago A., Monaci P. and Nicosia A. (1994) Epitope discovery using peptide libraries displayed on phage. *Trends Biotechnol* **12**, 262-7.
- Crotty S., Aubert R. D., Glidewell J. and Ahmed R. (2004) Tracking human antigen-specific memory B cells: a sensitive and generalized ELISPOT system. *J Immunol Methods* **286**, 111-22.
- Cwirla S. E., Peters E. A., Barrett R. W. and Dower W. J. (1990) Peptides on phage: a vast library of peptides for identifying ligands. *Proc Natl Acad Sci U S A* **87**, 6378-82.
- Davies D. R., Padlan E. A. and Sheriff S. (1990) Antibody-antigen complexes. *Annu Rev Biochem* **59**, 439-73.
- de Campos-Lima P. O., Torsteinsdottir S., Cuomo L., Klein G., Sulitzeanu D. and Masucci M. G. (1993) Antigen processing and presentation by EBV-carrying cell lines: cell-phenotype dependence and influence of the EBV-encoded LMP1. *Int J Cancer* **53**, 856-62.
- De L. M. R. C. and van Regenmortel M. H. (1979) Immunochemical studies of tobacco mosaic virus--III. Demonstration of five antigenic regions in the protein sub-unit. *Mol Immunol* **16**, 179-84.
- Dervillez X., Huther A., Schuhmacher J., Griesinger C., Cohen J. H., von Laer D. and Dietrich U. (2006) Stable expression of soluble therapeutic peptides in eukaryotic cells by multimerisation: application to the HIV-1 fusion inhibitory peptide C46. *ChemMedChem* **1**, 330-9.
- Di Scipio R. G., Hermodson M. A. and Davie E. W. (1977) Activation of human factor X (Stuart factor) by a protease from Russell's viper venom. *Biochemistry* **16**, 5253-60.

- DiMichele D. and Neufeld E. J. (1998) Hemophilia. A new approach to an old disease. *Hematol Oncol Clin North Am* **12**, 1315-44.
- Dixon F. J. and Mauer P. H. (1955) Immunologic unresponsiveness induced by protein antigens. *J Exp Med* **101**, 245-57.
- Eaton D., Rodriguez H. and Vehar G. A. (1986) Proteolytic processing of human factor VIII. Correlation of specific cleavages by thrombin, factor Xa, and activated protein C with activation and inactivation of factor VIII coagulant activity. *Biochemistry* **25**, 505-12.
- Ellerby H. M., Arap W., Ellerby L. M., Kain R., Andrusiak R., Rio G. D., Krajewski S., Lombardo C. R., Rao R., Ruoslahti E., Bredesen D. E. and Pasqualini R. (1999) Anti-cancer activity of targeted pro-apoptotic peptides. *Nat Med* **5**, 1032-8.
- Ertl O. T., Wenz D. C., Bouche F. B., Berbers G. A. and Muller C. P. (2003) Immunodominant domains of the Measles virus hemagglutinin protein eliciting a neutralizing human B cell response. *Arch Virol* **148**, 2195-206.
- Ettingshausen C. E. and Kreuz W. (2005) Role of von Willebrand factor in immune tolerance induction. *Blood Coagul Fibrinolysis* **16** Suppl 1, S27-31.
- Fay P. J. and Scandella D. (1999) Human inhibitor antibodies specific for the factor VIII A2 domain disrupt the interaction between the subunit and factor IXa. *J Biol Chem* **274**, 29826-30.
- Fish S., Zenowich E., Fleming M. and Manser T. (1989) Molecular analysis of original antigenic sin. I. Clonal selection, somatic mutation, and isotype switching during a memory B cell response. *J Exp Med* **170**, 1191-209.
- Foster P. A., Fulcher C. A., Houghten R. A., de Graaf Mahoney S. and Zimmerman T. S. (1988) Localization of the binding regions of a murine monoclonal anti-factor VIII antibody and a human anti-factor VIII alloantibody, both of which inhibit factor VIII procoagulant activity, to amino acid residues threonine351-serine365 of the factor VIII heavy chain. *J Clin Invest* **82**, 123-8.
- Foster P. A., Fulcher C. A., Houghten R. A. and Zimmerman T. S. (1990) Synthetic factor VIII peptides with amino acid sequences contained within the C2 domain of factor VIII inhibit factor VIII binding to phosphatidylserine. *Blood* **75**, 1999-2004.
- Foster P. A., Fulcher C. A., Marti T., Titani K. and Zimmerman T. S. (1987) A major factor VIII binding domain resides within the amino-terminal 272 amino acid residues of von Willebrand factor. *J Biol Chem* **262**, 8443-6.
- Fulcher C. A., de Graaf Mahoney S. and Zimmerman T. S. (1987) FVIII inhibitor IgG subclass and FVIII polypeptide specificity determined by immunoblotting. *Blood* **69**, 1475-80.
- Fulcher C. A., Roberts J. R., Holland L. Z. and Zimmerman T. S. (1985) Human factor VIII procoagulant protein. Monoclonal antibodies define precursor-product relationships and functional epitopes. *J Clin Invest* **76**, 117-24.
- Gatti L. and Mannucci P. M. (1984) Use of porcine factor VIII in the management of seventeen patients with factor VIII antibodies. *Thromb Haemost* **51**, 379-84.
- Gazarian K. G., Rowley M. J., Gazarian T. G., Sotelo J., Garcia-Mendoza E. and Hernandez R. (2001) Post-panning computer-aided analysis of phagotome collections selected with neurocysticercosis patient polyclonal antibodies: separation of disease-relevant and irrelevant peptide sequences. *Comb Chem High Throughput Screen* **4**, 221-35.
- Geysen H. M., Tainer J. A., Rodda S. J., Mason T. J., Alexander H., Getzoff E. D. and Lerner R. A. (1987) Chemistry of antibody binding to a protein. *Science* **235**, 1184-90.
- Gilles J. G., Arnout J., Vermynen J. and Saint-Remy J. M. (1993) Anti-factor VIII antibodies of hemophiliac patients are frequently directed towards nonfunctional determinants and do not exhibit isotypic restriction. *Blood* **82**, 2452-61.

- Gilles J. G., Desqueper B., Lenk H., Vermeylen J. and Saint-Remy J. M. (1996) Neutralizing antiidiotypic antibodies to factor VIII inhibitors after desensitization in patients with hemophilia A. *J Clin Invest* **97**, 1382-8.
- Gilles J. G., Grailly S. C., De Maeyer M., Jacquemin M. G., VanderElst L. P. and Saint-Remy J. M. (2004) In vivo neutralization of a C2 domain-specific human anti-Factor VIII inhibitor by an anti-idiotypic antibody. *Blood* **103**, 2617-23.
- Gonzalez-Stawinski G. V., Yu P. B., Love S. D., Parker W. and Davis R. D., Jr. (2001) Hapten-induced primary and memory humoral responses are inhibited by the infusion of anti-CD20 monoclonal antibody (IDEC-C2B8, Rituximab). *Clin Immunol* **98**, 175-9.
- Green D. and Lechner K. (1981) A survey of 215 non-hemophilic patients with inhibitors to Factor VIII. *Thromb Haemost* **45**, 200-3.
- Hartmann G., Weeratna R. D., Ballas Z. K., Payette P., Blackwell S., Suparto I., Rasmussen W. L., Waldschmidt M., Sajuthi D., Purcell R. H., Davis H. L. and Krieg A. M. (2000) Delineation of a CpG phosphorothioate oligodeoxynucleotide for activating primate immune responses in vitro and in vivo. *J Immunol* **164**, 1617-24.
- Hausl C., Ahmad R. U., Sasgary M., Doering C. B., Lollar P., Richter G., Schwarz H. P., Turecek P. L. and Reipert B. M. (2005) High-dose factor VIII inhibits factor VIII-specific memory B cells in hemophilia A with factor VIII inhibitors. *Blood* **106**, 3415-22.
- Healey J. F., Barrow R. T., Tamim H. M., Lubin I. M., Shima M., Scandella D. and Lollar P. (1998) Residues Glu2181-Val2243 contain a major determinant of the inhibitory epitope in the C2 domain of human factor VIII. *Blood* **92**, 3701-9.
- Healey J. F., Lubin I. M., Nakai H., Saenko E. L., Hoyer L. W., Scandella D. and Lollar P. (1995) Residues 484-508 contain a major determinant of the inhibitory epitope in the A2 domain of human factor VIII. *J Biol Chem* **270**, 14505-9.
- Heiskanen T., Lundkvist A., Soliymani R., Koivunen E., Vaheri A. and Lankinen H. (1999) Phage-displayed peptides mimicking the discontinuous neutralization sites of puumala Hantavirus envelope glycoproteins. *Virology* **262**, 321-32.
- Hobbs S., Jitrapakdee S. and Wallace J. C. (1998) Development of a bicistronic vector driven by the human polypeptide chain elongation factor 1alpha promoter for creation of stable mammalian cell lines that express very high levels of recombinant proteins. *Biochem Biophys Res Commun* **252**, 368-72.
- Horgan C., Brown K. and Pincus S. H. (1993) Studies on antigen binding by intact and hinge-deleted chimeric antibodies. *J Immunol* **150**, 5400-7.
- Hoyer L. W. (1994) Hemophilia A. *N Engl J Med* **330**, 38-47.
- Huang J., Gutteridge A., Honda W. and Kanehisa M. (2006) MIMOX: a web tool for phage display based epitope mapping. *BMC Bioinformatics* **7**, 451.
- Humbert M., Antoni S., Brill B., Landersz M., Rodes B., Soriano V., Wintergerst U., Knechten H., Staszewski S., von Laer D., Dittmar M. T. and Dietrich U. (2007) Mimotopes selected with antibodies from HIV-1-neutralizing long-term non-progressor plasma. *Eur J Immunol* **37**, 501-15.
- Jin L., Fendly B. M. and Wells J. A. (1992) High resolution functional analysis of antibody-antigen interactions. *J Mol Biol* **226**, 851-65.
- Kane W. H. and Davie E. W. (1988) Blood coagulation factors V and VIII: structural and functional similarities and their relationship to hemorrhagic and thrombotic disorders. *Blood* **71**, 539-55.
- Kasper C. K. (2000) Hereditary plasma clotting factor disorders and their management. *Haemophilia* **6** Suppl 1, 13-27.

- Kasper C. K., Aledort L., Aronson D., Counts R., Edson J. R., van Eys J., Fratantoni J., Green D., Hampton J., Hilgartner M., Levine P., Lazerson J., McMillan C., Penner J., Shapiro S. and Shulman N. R. (1975) Proceedings: A more uniform measurement of factor VIII inhibitors. *Thromb Diath Haemorrh* **34**, 612.
- Kasper C. K. and Pool J. G. (1975) Letter: Measurement of mild factor VIII inhibitors in Bethesda units. *Thromb Diath Haemorrh* **34**, 875-6.
- Kaufman R. J., Pipe S. W., Tagliavacca L., Swaroop M. and Moussalli M. (1997) Biosynthesis, assembly and secretion of coagulation factor VIII. *Blood Coagul Fibrinolysis* **8** Suppl 2, S3-14.
- Kelly K. A. and Jones D. A. (2003) Isolation of a colon tumor specific binding peptide using phage display selection. *Neoplasia* **5**, 437-44.
- Komiyama Y., Pedersen A. H. and Kisiel W. (1990) Proteolytic activation of human factors IX and X by recombinant human factor VIIa: effects of calcium, phospholipids, and tissue factor. *Biochemistry* **29**, 9418-25.
- Konigs C., Rowley M. J., Thompson P., Myers M. A., Scealy M., Davies J. M., Wu L., Dietrich U., Mackay C. R. and Mackay I. R. (2000) Monoclonal antibody screening of a phage-displayed random peptide library reveals mimotopes of chemokine receptor CCR5: implications for the tertiary structure of the receptor and for an N-terminal binding site for HIV-1 gp120. *Eur J Immunol* **30**, 1162-71.
- Kopecky E. M., Greinstetter S., Pabinger I., Buchacher A., Romisch J. and Jungbauer A. (2006) Effect of oriented or random PEGylation on bioactivity of a factor VIII inhibitor blocking peptide. *Biotechnol Bioeng* **93**, 647-55.
- Kouzmitcheva G. A., Petrenko V. A. and Smith G. P. (2001) Identifying diagnostic peptides for lyme disease through epitope discovery. *Clin Diagn Lab Immunol* **8**, 150-60.
- Kreuz W., Becker S., Lenz E., Martinez-Saguer I., Escuriola-Ettingshausen C., Funk M., Ehrenforth S., Auerswald G. and Kornhuber B. (1995) Factor VIII inhibitors in patients with hemophilia A: epidemiology of inhibitor development and induction of immune tolerance for factor VIII. *Semin Thromb Hemost* **21**, 382-9.
- Kreuz W., Escuriola-Ettingshausen C., Martinez-Saguer I., Gungor T. and Kornhuber B. (1996) Epidemiology of inhibitors in haemophilia A. *Vox Sang* **70** Suppl 1, 2-8.
- Kreuz W., Ettingshausen C. E., Auerswald G., Saguer I. M., Becker S., Funk M., Heller C., Klarmann D. and Klingebiel T. (2003) Epidemiology of inhibitors and current treatment strategies. *Haematologica* **88**, EREP04.
- Kreuz W., Ettingshausen C. E., Zyschka A., Oldenburg J., Saguer I. M., Ehrenforth S. and Klingebiel T. (2002) Inhibitor development in previously untreated patients with hemophilia A: a prospective long-term follow-up comparing plasma-derived and recombinant products. *Semin Thromb Hemost* **28**, 285-90.
- Kuwabara I., Maruyama H., Kamisue S., Shima M., Yoshioka A. and Maruyama I. N. (1999) Mapping of the minimal domain encoding a conformational epitope by lambda phage surface display: factor VIII inhibitor antibodies from haemophilia A patients. *J Immunol Methods* **224**, 89-99.
- Lacroix-Desmazes S., Misra N., Bayry J., Villard S., Kazatchkine M. D. and Kaveri S. V. (2002) Antibodies with hydrolytic activity towards factor VIII in patients with hemophilia A. *J Immunol Methods* **269**, 251-6.
- Lacroix-Desmazes S., Moreau A., Sooryanarayana, Bonnemain C., Stieltjes N., Pashov A., Sultan Y., Hoebeke J., Kazatchkine M. D. and Kaveri S. V. (1999) Catalytic activity of antibodies against factor VIII in patients with hemophilia A. *Nat Med* **5**, 1044-7.
- Lakich D., Kazazian H. H., Jr., Antonarakis S. E. and Gitschier J. (1993) Inversions disrupting the factor VIII gene are a common cause of severe haemophilia A. *Nat Genet* **5**, 236-41.
- Lang I. W. J., Klukowska A., Ilas J., Schwarz H. P. and Reipert B. (2006) Detection of Factor VIII-Specific Memory B Cells in Patients with Hemophilia A and Factor VIII Inhibitors. *37<sup>th</sup> Hemophilia Symposium*.

- Lanzavecchia A. (1987) Antigen uptake and accumulation in antigen-specific B cells. *Immunol Rev* **99**, 39-51.
- Lapan K. A. and Fay P. J. (1997) Localization of a factor X interactive site in the A1 subunit of factor VIIIa. *J Biol Chem* **272**, 2082-8.
- Lapan K. A. and Fay P. J. (1998) Interaction of the A1 subunit of factor VIIIa and the serine protease domain of factor X identified by zero-length cross-linking. *Thromb Haemost* **80**, 418-22.
- Lavens S., Faust E. A., Lu F., Jacob M., Leta M., Lieberman P. M. and Pure E. (2004) Identification of protein tyrosine kinases required for B-cell- receptor-mediated activation of an Epstein-Barr Virus immediate-early gene promoter. *J Virol* **78**, 8543-51.
- Lawson J. H., Kalafatis M., Stram S. and Mann K. G. (1994) A model for the tissue factor pathway to thrombin. I. An empirical study. *J Biol Chem* **269**, 23357-66.
- Leandro M. J., Cambridge G., Ehrenstein M. R. and Edwards J. C. (2006) Reconstitution of peripheral blood B cells after depletion with rituximab in patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* **54**, 613-20.
- Lei T. C. and Scott D. W. (2005) Induction of tolerance to factor VIII inhibitors by gene therapy with immunodominant A2 and C2 domains presented by B cells as Ig fusion proteins. *Blood* **105**, 4865-70.
- Lenting P. J., van de Loo J. W., Donath M. J., van Mourik J. A. and Mertens K. (1996) The sequence Glu1811-Lys1818 of human blood coagulation factor VIII comprises a binding site for activated factor IX. *J Biol Chem* **271**, 1935-40.
- Lenting P. J., van Mourik J. A. and Mertens K. (1998) The life cycle of coagulation factor VIII in view of its structure and function. *Blood* **92**, 3983-96.
- Leyendeckers H., Odendahl M., Lohndorf A., Irsch J., Spangfort M., Miltenyi S., Hunzelmann N., Assenmacher M., Radbruch A. and Schmitz J. (1999) Correlation analysis between frequencies of circulating antigen-specific IgG-bearing memory B cells and serum titers of antigen-specific IgG. *Eur J Immunol* **29**, 1406-17.
- Leyendeckers H., Voth E., Schicha H., Hunzelmann N., Banga P. and Schmitz J. (2002) Frequent detection of thyroid peroxidase-specific IgG+ memory B cells in blood of patients with autoimmune thyroid disease. *Eur J Immunol* **32**, 3126-32.
- Libyh M. T., Goossens D., Oudin S., Gupta N., Dervillez X., Juszcak G., Cornillet P., Bougy F., Reveil B., Philbert F., Tabary T., Klatzmann D., Rouger P. and Cohen J. H. (1997) A recombinant human scFv anti-Rh(D) antibody with multiple valences using a C-terminal fragment of C4-binding protein. *Blood* **90**, 3978-83.
- Linde R, Escuriola-Ettingshausen, C., Voigt, B., Klingebiel T., Kreuz W. (2001) First successful inhibitor elimination with a new protocol in a high responder hemophilia A patient after failure of various immune tolerance induction regimes. *Blood* **98**.
- Lollar P. (2004) Pathogenic antibodies to coagulation factors. Part one: factor VIII and factor IX. *J Thromb Haemost* **2**, 1082-95.
- Lubin I. M., Healey J. F., Barrow R. T., Scandella D. and Lollar P. (1997) Analysis of the human factor VIII A2 inhibitor epitope by alanine scanning mutagenesis. *J Biol Chem* **272**, 30191-5.
- Lusher J. M. (1999) Gene therapy for hemophilia A and B: patient selection and follow-up, requirements for a cure. *Thromb Haemost* **82**, 572-5.
- Luzzago A., Felici F., Tramontano A., Pessi A. and Cortese R. (1993) Mimicking of discontinuous epitopes by phage-displayed peptides, I. Epitope mapping of human H ferritin using a phage library of constrained peptides. *Gene* **128**, 51-7.
- Macedo-Ribeiro S., Bode W., Huber R., Quinn-Allen M. A., Kim S. W., Ortel T. L., Bourenkov G. P., Bartunik H. D., Stubbs M. T., Kane W. H. and Fuentes-Prior P. (1999) Crystal structures of the membrane-binding C2 domain of human coagulation factor V. *Nature* **402**, 434-9.

- Mai J. C., Mi Z., Kim S. H., Ng B. and Robbins P. D. (2001) A proapoptotic peptide for the treatment of solid tumors. *Cancer Res* **61**, 7709-12.
- Mann K. G. (1999) Biochemistry and physiology of blood coagulation. *Thromb Haemost* **82**, 165-74.
- Mann K. G., Nesheim M. E., Church W. R., Haley P. and Krishnaswamy S. (1990) Surface-dependent reactions of the vitamin K-dependent enzyme complexes. *Blood* **76**, 1-16.
- Manz R. A., Hauser A. E., Hiepe F. and Radbruch A. (2005) Maintenance of serum antibody levels. *Annu Rev Immunol* **23**, 367-86.
- Martin F. and Chan A. C. (2006) B cell immunobiology in disease: evolving concepts from the clinic. *Annu Rev Immunol* **24**, 467-96.
- Mason D. (1998) A very high level of crossreactivity is an essential feature of the T-cell receptor. *Immunol Today* **19**, 395-404.
- Mathias M., Khair K., Hann I. and Liesner R. (2004) Rituximab in the treatment of alloimmune factor VIII and IX antibodies in two children with severe haemophilia. *Br J Haematol* **125**, 366-8.
- Matthews T., Salgo M., Greenberg M., Chung J., DeMasi R. and Bolognesi D. (2004) Enfuvirtide: the first therapy to inhibit the entry of HIV-1 into host CD4 lymphocytes. *Nat Rev Drug Discov* **3**, 215-25.
- McGinniss M. J., Kazazian H. H., Jr., Hoyer L. W., Bi L., Inaba H. and Antonarakis S. E. (1993) Spectrum of mutations in CRM-positive and CRM-reduced hemophilia A. *Genomics* **15**, 392-8.
- McHeyzer-Williams L. J. and McHeyzer-Williams M. G. (2005) Antigen-specific memory B cell development. *Annu Rev Immunol* **23**, 487-513.
- Michnick D. A., Pittman D. D., Wise R. J. and Kaufman R. J. (1994) Identification of individual tyrosine sulfation sites within factor VIII required for optimal activity and efficient thrombin cleavage. *J Biol Chem* **269**, 20095-102.
- Miller G. and Lipman M. (1973) Release of infectious Epstein-Barr virus by transformed marmoset leukocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **70**, 190-4.
- Moreau V., Granier C., Villard S., Laune D. and Molina F. (2006) Discontinuous epitope prediction based on mimotope analysis. *Bioinformatics* **22**, 1088-95.
- Mosmann T. R., Cherwinski H., Bond M. W., Giedlin M. A. and Coffman R. L. (1986) Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. *J Immunol* **136**, 2348-57.
- Moussalli M., Pipe S. W., Hauri H. P., Nichols W. C., Ginsburg D. and Kaufman R. J. (1999) Mannose-dependent endoplasmic reticulum (ER)-Golgi intermediate compartment-53-mediated ER to Golgi trafficking of coagulation factors V and VIII. *J Biol Chem* **274**, 32539-42.
- Muhle C., Schulz-Drost S., Khrenov A. V., Saenko E. L., Klinge J. and Schneider H. (2004) Epitope mapping of polyclonal clotting factor VIII-inhibitory antibodies using phage display. *Thromb Haemost* **91**, 619-25.
- Muraille E., De Trez C., Pajak B., Brait M., Urbain J. and Leo O. (2002) T cell-dependent maturation of dendritic cells in response to bacterial superantigens. *J Immunol* **168**, 4352-60.
- Murray A., Smith R. G., Brady K., Williams S., Badley R. A. and Price M. R. (2001) Generation and refinement of peptide mimetic ligands for paratope-specific purification of monoclonal antibodies. *Anal Biochem* **296**, 9-17.
- Ngo JC., Huang M., Roth DA., Furie BC. and Furie B. Crystal Structure of Human Factor VIII: Implications for the Formation of the Factor IXa-Factor VIIIa Complex. (2008) *Structure* **16**, 597-606.

- Nilsson I. M., Berntorp E. and Zettervall O. (1988) Induction of immune tolerance in patients with hemophilia and antibodies to factor VIII by combined treatment with intravenous IgG, cyclophosphamide, and factor VIII. *N Engl J Med* **318**, 947-50.
- Nordfang O., Ezban M. and Hansen J. J. (1987) F VIII subunits: purification and antigenic properties. *Thromb Haemost* **58**, 1043-8.
- Numa F., Hirabayashi K., Tsunaga N., Kato H., O'Rourke K., Shao H., Stechmann-Lebakken C., Varani J., Rapraeger A. and Dixit V. M. (1995) Elevated levels of syndecan-1 expression confer potent serum-dependent growth in human 293T cells. *Cancer Res* **55**, 4676-80.
- Odendahl M., Mei H., Hoyer B. F., Jacobi A. M., Hansen A., Muehlinghaus G., Berek C., Hiepe F., Manz R., Radbruch A. and Dorner T. (2005) Generation of migratory antigen-specific plasma blasts and mobilization of resident plasma cells in a secondary immune response. *Blood* **105**, 1614-21.
- Oldenburg J., Ananyeva N. M. and Saenko E. L. (2004) Molecular basis of haemophilia A. *Haemophilia* **10** Suppl 4, 133-9.
- Olsson S., van Hage-Hamsten M. and Magnusson C. G. (2001) IgG1, IgG4 and IgE antibody reactivity to mutant forms of the major dust mite allergen Lep d 2 among atopic and nonatopic subjects naturally exposed to *Lepidoglyphus destructor*. *Int Arch Allergy Immunol* **126**, 50-8.
- Oshiba A., Renz H., Yata J. and Gelfand E. W. (1994) Isolation and characterization of human antigen-specific B lymphocytes. *Clin Immunol Immunopathol* **72**, 342-9.
- Oudin S., Libyh M. T., Goossens D., Dervillez X., Philbert F., Reveil B., Bougy F., Tabary T., Rouger P., Klatzmann D. and Cohen J. H. (2000) A soluble recombinant multimeric anti-Rh(D) single-chain Fv/CR1 molecule restores the immune complex binding ability of CR1-deficient erythrocytes. *J Immunol* **164**, 1505-13.
- Palmer D. S., Dudani A. K., Drouin J. and Ganz P. R. (1997) Identification of novel factor VIII inhibitor epitopes using synthetic peptide arrays. *Vox Sang* **72**, 148-61.
- Palmer E. (2003) Negative selection--clearing out the bad apples from the T-cell repertoire. *Nat Rev Immunol* **3**, 383-91.
- Paradis-Bleau C., Sanschagrin F. and Levesque R. C. (2005) Peptide inhibitors of the essential cell division protein FtsA. *Protein Eng Des Sel* **18**, 85-91.
- Parker E. T., Healey J. F., Barrow R. T., Craddock H. N. and Lollar P. (2004) Reduction of the inhibitory antibody response to human factor VIII in hemophilia A mice by mutagenesis of the A2 domain B-cell epitope. *Blood* **104**, 704-10.
- Pemberton S., Lindley P., Zaitsev V., Card G., Tuddenham E. G. and Kemball-Cook G. (1997) A molecular model for the triplicated A domains of human factor VIII based on the crystal structure of human ceruloplasmin. *Blood* **89**, 2413-21.
- Pfistershammer K., Stockl J., Siekmann J., Turecek P. L., Schwarz H. P. and Reipert B. M. (2006) Recombinant factor VIII and factor VIII-von Willebrand factor complex do not present danger signals for human dendritic cells. *Thromb Haemost* **96**, 309-16.
- Pini A., Runci Y., Falciani C., Lelli B., Brunetti J., Pileri S., Fabbrini M., Lozzi L., Ricci C., Bernini A., Tonello F., Dal Molin F., Neri P., Niccolai N. and Bracci L. (2006) Stable peptide inhibitors prevent binding of lethal and oedema factors to protective antigen and neutralize anthrax toxin in vivo. *Biochem J* **395**, 157-63.
- Pipe S. W., Saint-Remy J. M. and Walsh C. E. (2004) New high-technology products for the treatment of haemophilia. *Haemophilia* **10** Suppl 4, 55-63.
- Pittman D. D., Wang J. H. and Kaufman R. J. (1992) Identification and functional importance of tyrosine sulfate residues within recombinant factor VIII. *Biochemistry* **31**, 3315-25.

- Pratt K. P., Shen B. W., Takeshima K., Davie E. W., Fujikawa K. and Stoddard B. L. (1999) Structure of the C2 domain of human factor VIII at 1.5 Å resolution. *Nature* **402**, 439-42.
- Prescott R., Nakai H., Saenko E. L., Scharer I., Nilsson I. M., Humphries J. E., Hurst D., Bray G. and Scandella D. (1997) The inhibitor antibody response is more complex in hemophilia A patients than in most nonhemophiliacs with factor VIII autoantibodies. Recombinate and Kogenate Study Groups. *Blood* **89**, 3663-71.
- Prezzi C., Nuzzo M., Meola A., Delmastro P., Galfre G., Cortese R., Nicosia A. and Monaci P. (1996) Selection of antigenic and immunogenic mimics of hepatitis C virus using sera from patients. *J Immunol* **156**, 4504-13.
- Proby C. M., Ota T., Suzuki H., Koyasu S., Gamou S., Shimizu N., Wahl J. K., Wheelock M. J., Nishikawa T. and Amagai M. (2000) Development of chimeric molecules for recognition and targeting of antigen-specific B cells in pemphigus vulgaris. *Br J Dermatol* **142**, 321-30.
- Pulendran B. (2004) Immune activation: death, danger and dendritic cells. *Curr Biol* **14**, R30-2.
- Purohit V. S., Ramani K., Sarkar R., Kazazian H. H., Jr. and Balasubramanian S. V. (2005) Lower inhibitor development in hemophilia A mice following administration of recombinant factor VIII-O-phospho-L-serine complex. *J Biol Chem* **280**, 17593-600.
- Rao L. V. and Rapaport S. I. (1987) Studies of a mechanism inhibiting the initiation of the extrinsic pathway of coagulation. *Blood* **69**, 645-51.
- Reding M. T., Lei S., Lei H., Green D., Gill J. and Conti-Fine B. M. (2002) Distribution of Th1- and Th2-induced anti-factor VIII IgG subclasses in congenital and acquired hemophilia patients. *Thromb Haemost* **88**, 568-75.
- Reineke U., Sabat R., Misselwitz R., Welfle H., Volk H. D. and Schneider-Mergener J. (1999) A synthetic mimic of a discontinuous binding site on interleukin-10. *Nat Biotechnol* **17**, 271-5.
- Reiners K. S., Hansen H. P., Krussmann A., Schon G., Csernok E., Gross W. L., Engert A. and Von Strandmann E. P. (2004) Selective killing of B-cell hybridomas targeting proteinase 3, Wegener's autoantigen. *Immunology* **112**, 228-36.
- Reipert B. M., van Helden P. M., Schwarz H. P. and Hausl C. (2007) Mechanisms of action of immune tolerance induction against factor VIII in patients with congenital haemophilia A and factor VIII inhibitors. *Br J Haematol* **136**, 12-25.
- Renschler M. F., Bhatt R. R., Dower W. J. and Levy R. (1994) Synthetic peptide ligands of the antigen binding receptor induce programmed cell death in a human B-cell lymphoma. *Proc Natl Acad Sci USA* **91**, 3623-7.
- Roberts H. R. (1999) The use of agents that by-pass factor VIII inhibitors in patients with haemophilia. *Vox Sang* **77** Suppl 1, 38-41.
- Rock K. L., Hearn A., Chen C. J. and Shi Y. (2005) Natural endogenous adjuvants. *Springer Semin Immunopathol* **26**, 231-46.
- Rowley M. J., O'Connor K. and Wijeyewickrema L. (2004) Phage display for epitope determination: a paradigm for identifying receptor-ligand interactions. *Biotechnol Annu Rev* **10**, 151-88.
- Saenko E. L., Ananyeva N. M., Kouiyavskaya D. V., Khrenov A. V., Anderson J. A., Shima M., Qian J. and Scott D. (2002) Haemophilia A: effects of inhibitory antibodies on factor VIII functional interactions and approaches to prevent their action. *Haemophilia* **8**, 1-11.
- Saenko E. L. and Scandella D. (1995) A mechanism for inhibition of factor VIII binding to phospholipid by von Willebrand factor. *J Biol Chem* **270**, 13826-33.
- Saenko E. L. and Scandella D. (1997) The acidic region of the factor VIII light chain and the C2 domain together form the high affinity binding site for von Willebrand factor. *J Biol Chem* **272**, 18007-14.

- Saenko E. L., Shima M., Rajalakshmi K. J. and Scandella D. (1994) A role for the C2 domain of factor VIII in binding to von Willebrand factor. *J Biol Chem* **269**, 11601-5.
- Sasaki T., Koide Y. and Yoshigaga K. (1989) Immune suppression of anti-DNA antibody production using anti-idiotypic antibody-neocarzinostatin conjugates. *Methods Enzymol* **178**, 422-32.
- Scala G., Chen X., Liu W., Telles J. N., Cohen O. J., Vaccarezza M., Igarashi T. and Fauci A. S. (1999) Selection of HIV-specific immunogenic epitopes by screening random peptide libraries with HIV-1-positive sera. *J Immunol* **162**, 6155-61.
- Scandella D., DeGraaf Mahoney S., Mattingly M., Roeder D., Timmons L. and Fulcher C. A. (1988) Epitope mapping of human factor VIII inhibitor antibodies by deletion analysis of factor VIII fragments expressed in *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **85**, 6152-6.
- Scandella D., Gilbert G. E., Shima M., Nakai H., Eagleson C., Felch M., Prescott R., Rajalakshmi K. J., Hoyer L. W. and Saenko E. (1995) Some factor VIII inhibitor antibodies recognize a common epitope corresponding to C2 domain amino acids 2248 through 2312, which overlap a phospholipid-binding site. *Blood* **86**, 1811-9.
- Scandella D., Mattingly M., de Graaf S. and Fulcher C. A. (1989) Localization of epitopes for human factor VIII inhibitor antibodies by immunoblotting and antibody neutralization. *Blood* **74**, 1618-26.
- Scandella D. H., Nakai H., Felch M., Mondorf W., Scharrer I., Hoyer L. W. and Saenko E. L. (2001) In hemophilia A and autoantibody inhibitor patients: the factor VIII A2 domain and light chain are most immunogenic. *Thromb Res* **101**, 377-85.
- Schreiber A., Humbert M., Benz A. and Dietrich U. (2005) 3D-Epitope-Explorer (3DEX): localization of conformational epitopes within three-dimensional structures of proteins. *J Comput Chem* **26**, 879-87.
- Schwaab R., Brackmann H. H., Meyer C., Seehafer J., Kirchgesser M., Haack A., Olek K., Tuddenham E. G. and Oldenburg J. (1995) Haemophilia A: mutation type determines risk of inhibitor formation. *Thromb Haemost* **74**, 1402-6.
- Scott J. K. and Smith G. P. (1990) Searching for peptide ligands with an epitope library. *Science* **249**, 386-90.
- Shi Y., Evans J. E. and Rock K. L. (2003) Molecular identification of a danger signal that alerts the immune system to dying cells. *Nature* **425**, 516-21.
- Shima M., Yoshioka A., Nakajima M., Nakai H. and Fukui H. (1992) A monoclonal antibody (NMC-VIII/10) to factor VIII light chain recognizing Glu1675-Glu1684 inhibits factor VIII binding to endogenous von Willebrand factor in human umbilical vein endothelial cells. *Br J Haematol* **81**, 533-8.
- Siggs O. M., Makaroff L. E. and Liston A. (2006) The why and how of thymocyte negative selection. *Curr Opin Immunol* **18**, 175-83.
- Slifka M. K. and Ahmed R. (1996) Long-term antibody production is sustained by antibody-secreting cells in the bone marrow following acute viral infection. *Ann N Y Acad Sci* **797**, 166-76.
- Smith G. P. (1985) Filamentous fusion phage: novel expression vectors that display cloned antigens on the virion surface. *Science* **228**, 1315-7.
- Smith G. P. and Petrenko V. A. (1997) Phage Display. *Chem Rev* **97**, 391-410.
- Spiegel P. C., Jr., Jacquemin M., Saint-Remy J. M., Stoddard B. L. and Pratt K. P. (2001) Structure of a factor VIII C2 domain-immunoglobulin G4kappa Fab complex: identification of an inhibitory antibody epitope on the surface of factor VIII. *Blood* **98**, 13-9.
- Stocker M., Klockenbring T., Huhn M., Nachreiner T., Wicklein D., Petersen A., Bauer R., Goerlich R., Fischer R. and Barth S. (2005) Antigen-specific targeting and elimination of EBV-transformed B cells by allergen toxins. *J Allergy Clin Immunol* **116**, 910-5.

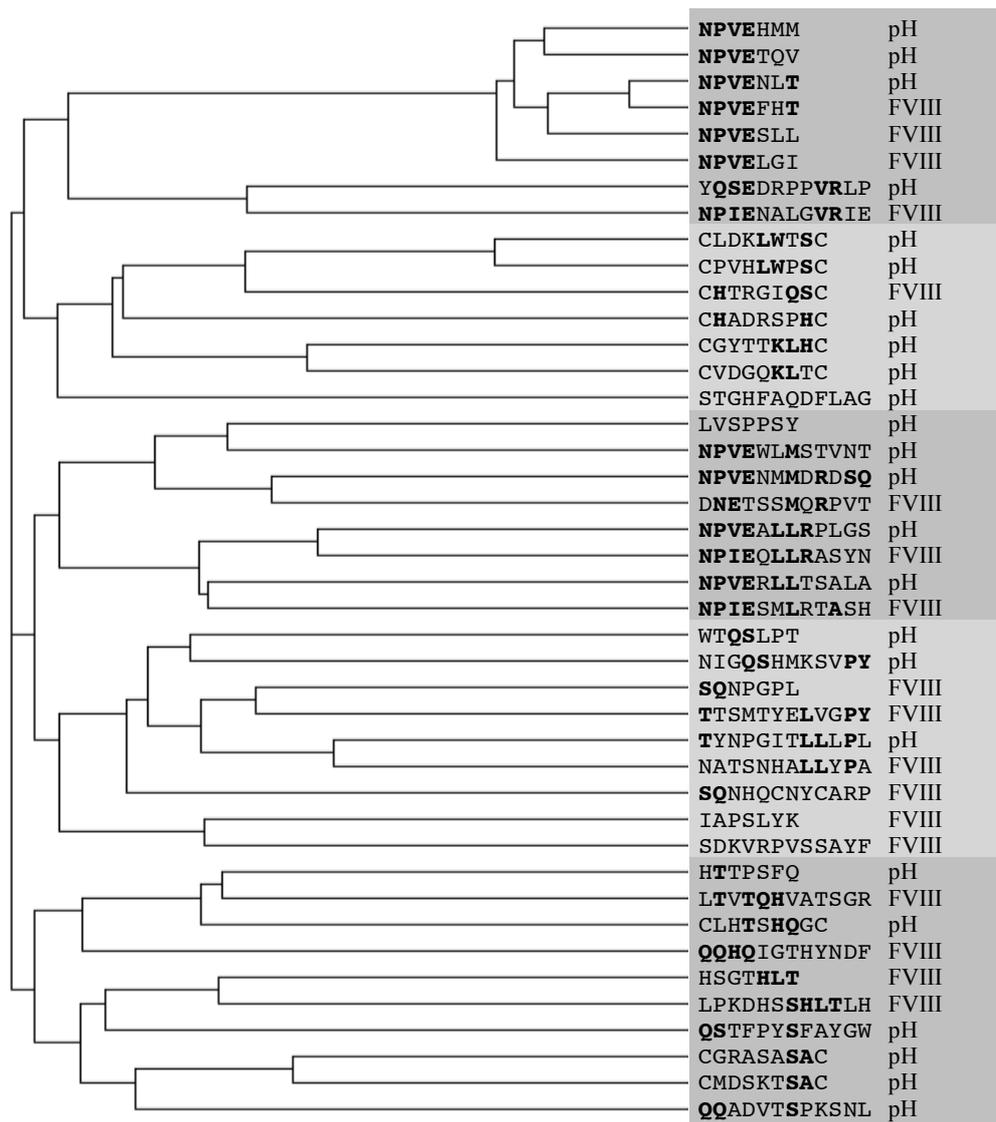
- Stoilova-McPhie S., Villoutreix B. O., Mertens K., Kembell-Cook G. and Holzenburg A. (2002) 3-Dimensional structure of membrane-bound coagulation factor VIII: modeling of the factor VIII heterodimer within a 3-dimensional density map derived by electron crystallography. *Blood* **99**, 1215-23.
- Szodoray P., Alex P., Dandapani V., Nakken B., Pesina J., Kim X., Wallis G. L., Wilson P. C., Jonsson R. and Centola M. (2004) Apoptotic effect of rituximab on peripheral blood B cells in rheumatoid arthritis. *Scand J Immunol* **60**, 209-18.
- Tainer J. A., Getzoff E. D., Alexander H., Houghten R. A., Olson A. J., Lerner R. A. and Hendrickson W. A. (1984) The reactivity of anti-peptide antibodies is a function of the atomic mobility of sites in a protein. *Nature* **312**, 127-34.
- Tam J. P. (1988) Synthetic peptide vaccine design: synthesis and properties of a high-density multiple antigenic peptide system. *Proc Natl Acad Sci U S A* **85**, 5409-13.
- Thorpe R., Dilger P., Dawson N. J. and Barrowcliffe T. W. (1989) Inhibition of interleukin-2 secretion by factor VIII concentrates: a possible cause of immunosuppression in haemophiliacs. *Br J Haematol* **71**, 387-91.
- Toole J. J., Knopf J. L., Wozney J. M., Sultzman L. A., Buecker J. L., Pittman D. D., Kaufman R. J., Brown E., Shoemaker C., Orr E. C. and et al. (1984) Molecular cloning of a cDNA encoding human antihemophilic factor. *Nature* **312**, 342-7.
- Torres M., May R., Scharff M. D. and Casadevall A. (2005) Variable-region-identical antibodies differing in isotype demonstrate differences in fine specificity and idiotype. *J Immunol* **174**, 2132-42.
- Townsend S. E., Goodnow C. C. and Cornall R. J. (2001) Single epitope multiple staining to detect ultralow frequency B cells. *J Immunol Methods* **249**, 137-46.
- Tracy P. B., Nesheim M. E. and Mann K. G. (1981) Coordinate binding of factor Va and factor Xa to the unstimulated platelet. *J Biol Chem* **256**, 743-51.
- Tuddenham E. G. and McVey J. H. (1998) The genetic basis of inhibitor development in haemophilia A. *Haemophilia* **4**, 543-5.
- van der Kolk L. E., Baars J. W., Prins M. H. and van Oers M. H. (2002) Rituximab treatment results in impaired secondary humoral immune responsiveness. *Blood* **100**, 2257-9.
- van Dieijen G., Tans G., Rosing J. and Hemker H. C. (1981) The role of phospholipid and factor VIIIa in the activation of bovine factor X. *J Biol Chem* **256**, 3433-42.
- van Helden PMW, Gouw SC, Mauser-Bunnschoten EP, van den Berg HM, Voorberg J. (2005) Faktor VIII inhibitors in hemophilia A during immune tolerance induction. *J Thromb Haemos* **3**, Sup 1, P0219
- Van Regenmortel M. H. V. (1996) Mapping Epitope Structure and Activity: From One-Dimensional Prediction to Four-Dimensional Description of Antigenic Specificity. *Methods* **9**, 465-72.
- Vehar G. A., Keyt B., Eaton D., Rodriguez H., O'Brien D. P., Rotblat F., Oppermann H., Keck R., Wood W. I., Harkins R. N. and et al. (1984) Structure of human factor VIII. *Nature* **312**, 337-42.
- Villard S., Lacroix-Desmazes S., Kieber-Emmons T., Piquer D., Grailly S., Benhida A., Kaveri S. V., Saint-Remy J. M. and Granier C. (2003) Peptide decoys selected by phage display block in vitro and in vivo activity of a human anti-FVIII inhibitor. *Blood* **102**, 949-52.
- Vlot A. J., Koppelman S. J., Meijers J. C., Dama C., van den Berg H. M., Bouma B. N., Sixma J. J. and Willems G. M. (1996) Kinetics of factor VIII-von Willebrand factor association. *Blood* **87**, 1809-16.
- Wadhwa M., Dilger P., Tubbs J., Barrowcliffe T., Mahon B. and Thorpe R. (1992) Mechanisms of inhibition of T cell IL-2 secretion by factor VIII concentrates. *Br J Haematol* **82**, 575-83.
- Wadhwa M., Dilger P., Tubbs J., Mire-Sluis A., Barrowcliffe T. and Thorpe R. (1994) Identification of transforming growth factor-beta as a contaminant in factor VIII concentrates: a possible link with immunosuppressive effects in hemophiliacs. *Blood* **84**, 2021-30.

- Weiss H. J., Sussman, II and Hoyer L. W. (1977) Stabilization of factor VIII in plasma by the von Willebrand factor. Studies on posttransfusion and dissociated factor VIII and in patients with von Willebrand's disease. *J Clin Invest* **60**, 390-404.
- Westhof E., Altschuh D., Moras D., Bloomer A. C., Mondragon A., Klug A. and Van Regenmortel M. H. (1984) Correlation between segmental mobility and the location of antigenic determinants in proteins. *Nature* **311**, 123-6.
- White G. C., 2nd, Rosendaal F., Aledort L. M., Lusher J. M., Rothschild C. and Ingerslev J. (2001) Definitions in hemophilia. Recommendation of the scientific subcommittee on factor VIII and factor IX of the scientific and standardization committee of the International Society on Thrombosis and Haemostasis. *Thromb Haemost* **85**, 560.
- Wiesner M., Zentz C., Mayr C., Wimmer R., Hammerschmidt W., Zeidler R. and Moosmann A. (2008) Conditional immortalization of Human B Cells by CD40 Ligation. *PLoS ONE* **3**, e1464.
- Wiestner A., Cho H. J., Asch A. S., Michelis M. A., Zeller J. A., Peerschke E. I., Weksler B. B. and Schechter G. P. (2002) Rituximab in the treatment of acquired factor VIII inhibitors. *Blood* **100**, 3426-8.
- Wilson D. R. and Finlay B. B. (1998) Phage display: applications, innovations, and issues in phage and host biology. *Can J Microbiol* **44**, 313-29.
- Yayon A., Aviezer D., Safran M., Gross J. L., Heldman Y., Cabilly S., Givol D. and Katchalski-Katzir E. (1993) Isolation of peptides that inhibit binding of basic fibroblast growth factor to its receptor from a random phage-epitope library. *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**, 10643-7.
- Zhong D., Saenko E. L., Shima M., Felch M. and Scandella D. (1998) Some human inhibitor antibodies interfere with factor VIII binding to factor IX. *Blood* **92**, 136-42.
- Zocher M., Baeuerle P. A., Dreier T. and Iglesias A. (2003) Specific depletion of autoreactive B lymphocytes by a recombinant fusion protein in vitro and in vivo. *Int Immunol* **15**, 789-96.

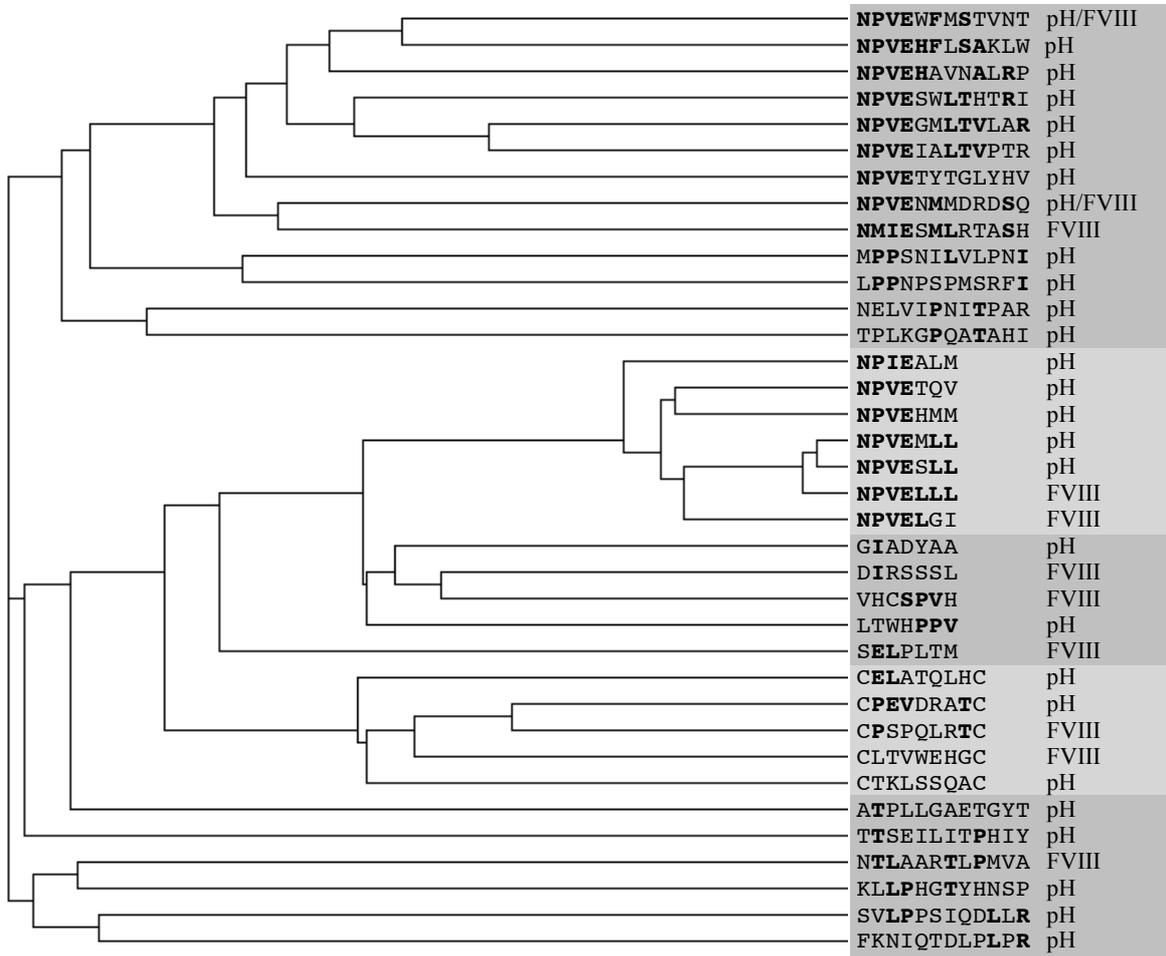
## 6. Anhang

### 6.1 Kladogrammanalysen der Sequenzen ELISA-positiver Phagenklone

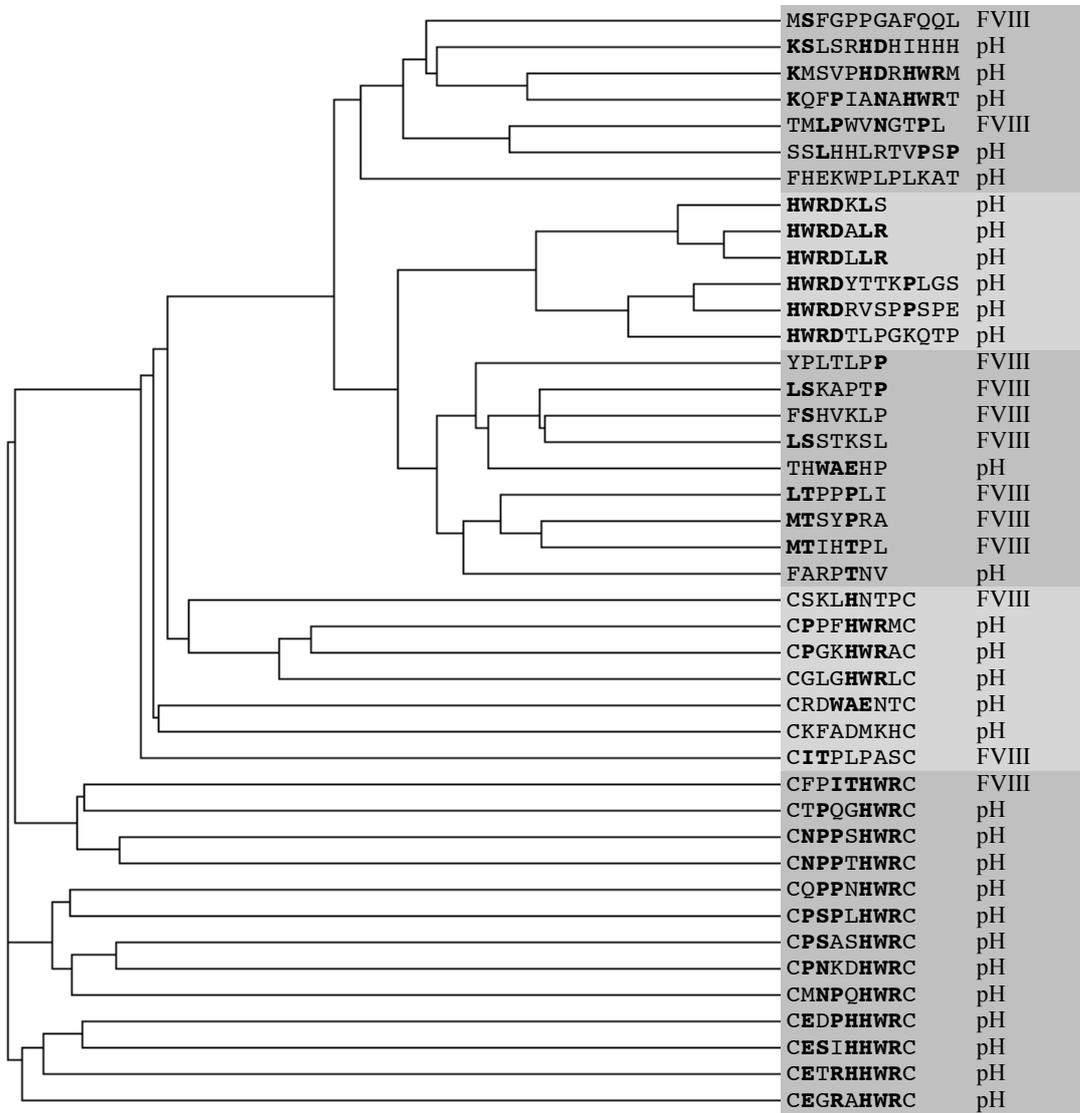
#### 6.1.1 Patient 1 (A)



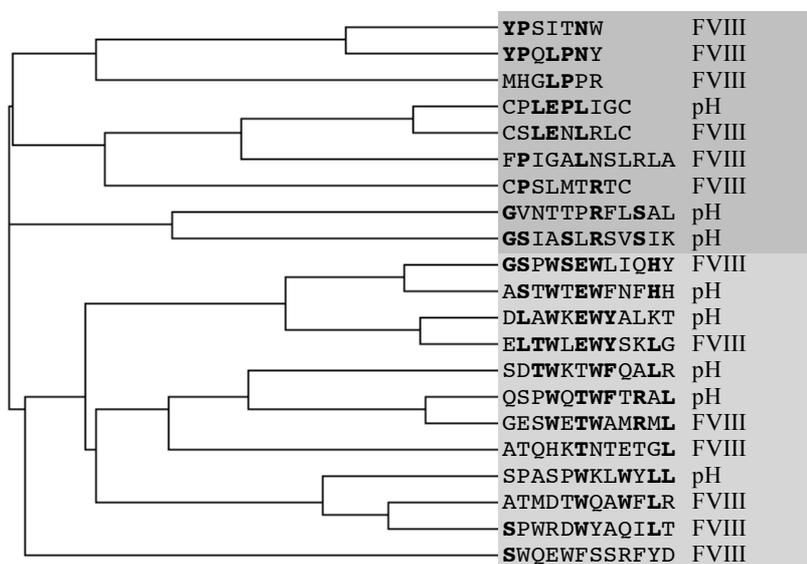
## 6.1.2 Patient 1 (B)



## 6.1.3 Patient 2 (A)



## 6.1.4 Patient 2 (B)



## 6.2 Abkürzungsverzeichnis

Amp R	Ampicillin Resistenz
APC	Allophycyanin
APC	Antigen präsentierende Zelle ( <i>antigen presenting cell</i> )
AS	Aminosäure
ASC	Antikörper sekretierende Zelle ( <i>antibody secreting cell</i> )
ATCC	American tissue culture collection
BE	Bethesda Einheit
bp	Basenpaare
BCR	B-Zell Rezeptor ( <i>B cell receptor</i> )
BSA	Bovines Serumalbumin
cDNA	complementäre DNA
ddH <sub>2</sub> O	Autoklaviertes Reinstwasser
DMEM	Dulbesso's Modified Eagles Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dsDNA	doppelsträngige DNA
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ER	endoplasmatisches Retikulum
FV	Faktor V
FIIV	Faktor VII
FVIII	Faktor VIII
FIX	Faktor IX
FX	Faktor X
FXI	Faktor XI
FACS	Fluoreszenzaktivierte Zellsortierung ( <i>fluorescence-activated cell sorting</i> )
FCS	Fötale Kälberserum ( <i>fetal calf serum</i> )
FITC	Fluorescein-Isothiocyanat
gp41	41kDa großes Glykoprotein von HIV-1
h	Stunde
HA	Hämophilie A

HEPES	N-(2-Hydroxyethyl)piperazin-N'-2-ethansulfonsäure
HIV	Humanes Immundefizienzvirus
IE	Internationale Einheit (FVIII-Konzentration, 200ng/ml)
IRES	<i>Internal ribosomal entry site</i>
ITI	Immuntoleranz-Induktion ( <i>immune tolerance induction</i> )
kb	Kilobase
kDa	Kilodalton
MCS	<i>Multiple cloning site</i>
min	Minute
mRNA	<i>messenger RNA</i>
Neo R	Neomycin Resistenz
pIII	Hüllprotein III des Phagen M13
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBMC	Periphere mononukleäre Blutzellen
PBS	Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung ( <i>phosphat buffered saline</i> )
PCR	Polymerasekettenreaktion ( <i>polymerase chain reaction</i> )
PDB	<i>Protein Data Bank</i> Dateiformat
PE	Phycoerythrin
pEF1 $\alpha$	Humaner Elongationsfaktor 1 $\alpha$ ( <i>elongation factor 1<math>\alpha</math></i> )
RNA	Ribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur
sec	Sekunde
SP	Signalpeptid
ssDNA	einzelsträngige ( <i>single stranded</i> ) DNA
SV40	<i>Simian virus 40</i>
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TCR	T-Zell Rezeptor ( <i>T cell receptor</i> )
v/v	Verhältnisangabe Volumen zu Volumen ( <i>volume per volume</i> )
vWF	von Willebrand Faktor
w/v	Verhältnisangabe Gewicht zu Volumen ( <i>weight per volume</i> )
wt	Widtyp

**6.3 Einbuchstabencode für Aminosäuren**

A	Alanin	M	Methionin
C	Cystein	N	Asparagin
D	Aspartat	P	Prolin
E	Glutamat	Q	Glutamin
F	Phenylalanin	R	Arginin
G	Glycin	S	Serin
H	Histidin	T	Threonin
I	Isoleucin	V	Valin
K	Lysin	W	Thryptophan
L	Leucin	Y	Thyrosin

## 6.4 Publikationen und Kongressbeiträge

Königs C., Pustowka A., Irving J., Kessel C., Klich K., Wegner V., Rowley M.J., Mackay I.R., Kreuz W., Griesinger C., and Dietrich U. (2007) Peptide mimotopes selected with HIV-1-blocking monoclonal antibodies against CCR5 represent motifs specific for HIV-1 entry. *Immunol Cell Biol* **85**, 511-517.

Kessel C., Königs C., Linde R., Escuriola-Ettingshausen C., Stoll H., Klingebiel T., Dietrich U. and Kreuz W. (2008) Humoral immune responsiveness to a defined epitope on factor VIII before and after B-cell ablation with rituximab. *Mol Immunol* (2008), doi:10.1016/j.molimm.2008.06.015

Kessel C., Kreuz W., Klich K., Becker-Peters K., Vorpahl F., Dietrich U., Klingebiel T. and Königs C. Multimeric peptides for blocking of factor VIII neutralizing antibodies. (Manuskript in Vorbereitung)

C. Kessel, C. Königs, R. Linde, C. Escuriola-Ettingshausen, J. Roland, H. Stoll, T. Klingebiel, U. Dietrich and W. Kreuz. (2006) Epitope Mapping during FVIII Inhibitor Elimination with Rituximab Reveals Conformational Epitopes on FVIII and Identifies Small Molecules Blocking Inhibitor and Targeting B Cells. *35<sup>th</sup> Hemophilia Symposium*, 66-80; Springer Verlag Berlin Heidelberg

### Ausgewählte Kongressbeiträge, Vorträge

#### **50. Jahrestagung der Gesellschaft für Thrombose- und Hämostaseforschung (GTH), Basel, 2006**

Kessel C., Kreuz W, Brassat K, Klingebiel T and Königs C. Ligand mediated targeting of FVIII inhibitor specific primary memory B cells – a basis for a novel inhibitor elimination approach.

**XXIst Congress of the International Society on Thrombosis and Haemostasis (ISTH),  
Genf, 2007**

C. Kessel, W. Kreuz, K. Klich, K. Becker, F. Vorpahl, C. Königs. Potential use of ligands to FVIII inhibitors.

Vortrag in Verbindung mit einem **ISTH Young Investigators Award** in der Sparte **Novel Technologies**

**Ausgewählte Kongressbeiträge, Poster**

**XXst Congress of the International Society on Thrombosis and Haemostasis (ISTH),  
Sydney, 2005**

Kessel C, Linde R, Kreuz W, Königs C. (2005) Antiidiotypic single chain fragments specific for inhibitors to coagulation factor VIII isolated by phage display screening of polyclonal haemophilia A patient's plasma. *J Thromb Haemos*, **3**, Supplement 1, P0738

Kessel C, Königs C, Roland J, Linde R, Escuriola C, Stoll H, Figura S, Dunsch D, Dietrich U, Klingebiel T, Kreuz W. (2005) Epitope mapping during FVIII inhibitor elimination with rituximab reveals conformational epitopes on FVIII and identifies small molecules blocking inhibitor and targeting B cells. *J Thromb Haemos*, **3**, Supplement 1, P1929

**American Society of Hematology, 47<sup>th</sup> Annual Meeting, Atlanta, 2005**

Christoph Kessel, Wolfhart Kreuz, Katharina Brassat, Thomas Klingebiel and Christoph Königs. (2005) Ligand Mediated Targeting of FVIII Inhibitor Specific Primary B Cells Via Surface Immunoglobulin. *Blood* **106**, Abstract 3206

## Lebenslauf

### Christoph Michael Kessel

---

Geburtsdatum: 30.12.1978  
Geburtsort: Mainz  
Staatsangehörigkeit: deutsch  
Familienstand: ledig  
Anschrift: Rheinallee 21  
55283 Nierstein

### Schulbildung

---

1985 – 1989 Grundschule Nierstein  
1989 – 1998 Neusprachliches Gymnasium zu St. Katharinen, Oppenheim  
1998 Abitur  
Sprachen: Englisch, Latein

### Zivil-/ Wehrdienst

---

Aufgrund des Beschlusses des Kreiswehrrersatzamtes Mainz vom Wehrdienst befreit

### Hochschulstudium

---

seit dem Wintersemester 1998: Studiengang Biologie (Diplom) an der Johann Wolfgang Goethe-Universität, Frankfurt am Main  
seit dem Wintersemester 2000: Hauptstudium mit Schwerpunkt Genetik, Biochemie und Mikrobiologie an der J. W. G.-Universität, Frankfurt am Main  
Oktober 2002: Diplomprüfung im Hauptfach Genetik sowie den Nebenfächern Biochemie und Mikrobiologie  
November 2002 – Juli 2003: Diplomarbeit am Chemotherapeutischen Forschungsinstitut Georg-Speyer-Haus, Frankfurt am Main im Bereich Virologie und angewandte Genterapie, AG Prof Dr. Dorothee Meike von Laer.  
Thema: Identifikation eines konformationellen Epitops im Glykoprotein des Lymphocytären Choriomeningitis Virus  
21.07.2003: Studienabschluß als Diplom-Biologe

### **Promotion**

---

März 2004 – Juli 2008: Promotion am Klinikum für Kinderheilkunde III der J. W. G.-Universität, Frankfurt am Main, AG PD. Dr. W. Kreuz  
Thema: Identifizierung und Charakterisierung von Liganden für FVIII neutralisierende Antikörper

### **Auszeichnungen**

---

Juli 2007: Young Investigators Award „Novel Technologies“ der International Society on Thrombosis and Haemostasis

### **Eidesstattliche Erklärung**

Hiermit erkläre ich, dass die vorliegende Arbeit mit dem Titel „Identifizierung und Charakterisierung von Liganden für Faktor VIII neutralisierende Antikörper“ von mir selbstständig und nur unter Verwendung der darin angegebenen Hilfsmittel angefertigt wurde.

Frankfurt am Main, im März 2008

Christoph M. Kessel