

Aus dem pathologischen Institut
der Universität Würzburg
Lehrstuhl für Allgemeine Pathologie und pathologische Anatomie
Direktor: Professor Dr. H. K. Müller-Hermelink

Intrazelluläre Mechanismen bei der durch den monomeren
humanen IgM-Antikörper PAM-1 induzierten Apoptose

Inaugural – Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde der
Medizinischen Fakultät
der
Bayerischen Julius-Maximilians-Universität Würzburg

vorgelegt von
Joachim Wirth
aus Bad Kissingen

Würzburg, November 2005

Referent: Professor Dr. H. P. Vollmers

Koreferent: Professor Dr. H. J. Girschick

Dekan: Professor Dr. G. Ertl

Tag der mündlichen Prüfung: 08.03.2006

Der Promovend ist Arzt

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
1.1 Apoptose	1
1.2 Antikörper gegen Todesrezeptoren	1
1.3 Antikörper und direkte Apoptose	2
1.4 Immunüberwachung	3
1.4.1 Monoklonale Antikörper	4
1.4.2 Tod durch Lipidakkumulation	4
1.4.3 Tod durch Antikomplement	5
1.4.4 Tod durch „Verhungern“: PAM-1	5
2. Material und Methoden	7
2.1 Material	7
2.1.1 Chemikalien und Verbrauchsmittel	7
2.1.1.1 Verbrauchsmittel	7
2.1.1.2 Antikörper	7
2.1.1.3 Enzyme	8
2.1.2 Zelllinie	8
2.1.3 Geräte	8
2.1.4 Lösungen und Puffer	9
2.1.4.1 Lösungen zur Zellextraktion	9
2.1.4.2 Lösungen zur Proteinbestimmung	10
2.1.4.3 Lösungen zur SDS-Gel-Elektrophorese	10
2.1.4.4 Lösungen für Western-Blot	11
2.1.4.5 Lösungen für Immunodetektion	11
2.2 Zellbiologische Methoden	11
2.2.1 Zellkultur	11
2.2.2 MTT-Test	12
2.2.3 Phosphorylierungsstudien	13
2.3 Biochemische Methoden	13
2.3.1 Herstellung von Gesamtzellextrakten	13
2.3.2 Herstellung von Cytosolextrakten	14
2.3.3 Herstellung von Zellkernextrakten	14
2.3.4 Proteinbestimmung	15

2.3.4.1 BCA-Assay	15
2.3.4.2 Bradford-Proteinbestimmung	15
2.3.5 SDS-Page	16
2.3.6 Western-Blot	16
3. Ergebnisse	18
3.1 Proliferationsstudien	18
3.2 Phosphorylierungsstudien	20
3.2.1 Gesamtzell-Proteinextrakte	20
3.2.2 Cytosol-Proteinextrakte	22
3.3 Inhibitionsstudien	24
3.3.1 MTT-Assay	24
3.3.2 Western-Blot	25
4. Diskussion	29
5. Zusammenfassung	33
6. Literatur	35

1. Einleitung

1.1 Apoptose

Apoptose, also programmierter Zelltod, ist eine Zellrecycling-Methode, die ein „sauberes“ Entfernen unerwünschter Zellen garantiert, also ohne entzündliche oder destruktive Aktivität. Dieser physiologische Prozeß wurde in den frühen 70er Jahren entdeckt (1).

Apoptose kann entweder durch andere Zellen oder durch Antikörper, entweder **indirekt** (also **Rezeptor-vermittelt**) oder **direkt** (also **Todes-Domänen-unabhängig**) induziert werden. Beide dieser Pfade führen zu Caspase-Aktivierung, DNA-Zerfall sowie zur Formation von Apoptosekörpern (2).

Die Todesrezeptor-abhängige Apoptose wird induziert durch Liganden und deren Rezeptoren (z.B. Fas, TNF, TRAIL) und spielt eine große Rolle in der Lymphozytendifferenzierung (3,4).

Der Todesrezeptor-unabhängige Pfad ist ein Synonym für ein zelluläres Suizidprogramm, das im Falle einer zellulären Fehlfunktion greift. Apoptosestimuli können hierbei Strahlung, chemische Substanzen, Hitze oder „Hungern“ sein (5-7).

Weiterhin ist diese Art der Apoptose vermittelt durch die Freisetzung von Cytochrom C aus Mitochondrien, gefolgt von einem Cytochrom c/Apaf-1/procaspase-9-Komplex, der dann Effektorcaspasen aktiviert (8,9). Überdies haben Überlebensproteine aus der Bcl-2 Familie eine zentrale Rolle bei der Kontrolle dieses mitochondrialen Pfades (10).

1.2 Antikörper gegen „Todesrezeptoren“

Indem man Mäuse mittels menschlicher Lymphoblastom-Zellen immunisiert hat, konnte ein anti-APO-1 Antikörper isoliert werden, der Wachstumsinhibition triggert sowie rasche Apoptose induziert. Dieser Antikörper bindet an APO-1 und ist später identifiziert worden als Fas (anti-CD95). Nach Bindung agonistischer anti-CD95-Antikörper oder verwandter CD95-Liganden formiert sich ein Proteinkomplex,

der als death-inducing signaling complex bezeichnet wird (kurz DISC) und wiederum aus einem Adaptor-Protein sowie einer Initiator-Caspase besteht, woraufhin Apoptose eingeleitet wird (11).

Im weiteren zeigte sich jedoch, dass agonistische anti-Fas-Rezeptor-Antikörper *in vivo* eine signifikante Hepatotoxizität aufwiesen (12), zudem käme der Fas-Rezeptor auf einer Reihe von Normalgeweben vor, einschließlich Thymus, Leber, Herz und Niere (13).

Die Todesdomänen-Apoptose-Gen-Superfamilie beinhaltet TNF, Fas/APO-1 und Apo2L/TRAIL. Andere Antikörper, die auf der Zelloberfläche solider oder hämatopoetischer Krebszellen gefunden wurden, konnten Apoptose an verschiedenen Tumorzellen *in vitro* und *in vivo* induzieren (14).

Präklinische Experimente zeigten, dass TRAIL R1 mAb verschiedene menschliche Tumorzellen „killen“ kann und somit effektiv Brustkrebs, Colon- sowie Uterus-Ca`s bekämpfen kann (15). Auch hier wurde kürzlich nachgewiesen, dass TRAIL an menschlichen Hepatozyten Apoptose einleitet (16), also hepatotoxisch wirkt.

Überdies ist der therapeutische Gebrauch von Antikörpern gegen Todesrezeptoren umso fragwürdiger, als viele maligne Zellen resistent gegen Fas- oder TRAIL-induzierte Apoptose sind (17,18,19).

1.3 Antikörper und direkte Apoptose

Von verschiedenen anderen humanisierten Antikörpern, die bereits im Gebrauch sind oder zumindest klinisch getestet werden, um Carcinome und maligne hämatologische Erkrankungen zu bekämpfen, konnte gezeigt werden, dass sie Apoptose an Tumorzellen induzieren, indem sie direkt an Rezeptoren binden, die nicht an eine intrazelluläre Todesdomäne geknüpft sind.

Ein Beispiel hierfür ist der Antikörper rituximab (anti-CD20), der an das Differenzierungsantigen CD20 bindet, welches auf den meisten normalen und neoplastisch transformierten B-Zellen exprimiert ist (20).

Dieser Antikörper mag inzwischen Bestandteil vieler Therapieprotokolle für B-Zell-Tumoren sein, dennoch könnte die Fähigkeit, per passivem Antikörper Tumorzellen

stum zu hemmen nur vorübergehend sein und scheint am effektivsten in Kombination mit einer Chemotherapie zu sein (21).

Diese Art von Antikörpern, zu denen auch Herceptin zählt (trastuzumab)(22), binden sämtlich an nicht ausschließlich tumorspezifische Strukturen und wurden nicht selektiert nach ihrer apoptotischen Aktivität, sondern nach ihrer cytostatischen/-toxischen Wirkung (basierend auf ihrer antagonistischen oder complement-vermittelten Aktivität)(23,24).

Ihre Ziele sind Differenzierungsantigene oder Wachstumsfaktor-Rezeptoren, die auf malignen Zellen überexprimiert sind. Letztlich sind die Apoptose-induzierenden Mechanismen dieser anti-CD20 bzw. anti-EGFR Antikörper noch nicht geklärt.

1.4 Immunüberwachung

Der geschickteste Weg, tumorspezifische und Apoptose induzierende Antikörper zu finden, die an Krebszellen Stress induzieren, ist das menschliche Immunsystem selbst.

Jeder Organismus hat angeborenermaßen einen Pool an potenten Antikörpern, um malignes Wachstum zu hemmen. Hierzu musste die Natur ein effektives Erkennungssystem sowie einen sehr effektiven „Eliminationsmechanismus“ entwickeln, genannt Immunüberwachung.

Unter Anwendung der menschlichen Trioma Technologie konnten eine Reihe von Lymphozyten verschiedener Krebspatienten wie auch gesunder Spender immortalisiert werden und hinsichtlich Tumorspezifität und funktioneller Aktivität vorselektiert werden.

Alle auf diese Weise isolierten **monoklonalen Antikörper** waren IGM`s und keimbahnkodiert, sind also Teil der angeborenen Immunität. Zudem binden diese Ig`s sämtlich an posttranskriptionell modifizierte Zelloberflächenantigene, indem sie Kohlenwasserstoffepitope erkennen (25-27).

Ein weiteres typisches Feature dieser Ig`s ist ihre Fähigkeit, **Apoptose** in malignen Zellen zu induzieren(25,26,28,29,30-33).

1.4.1 Monoklonale Antikörper

Antikörper spielen eine entscheidende Rolle in allen Überwachungsmechanismen und sie sind die besten natürlichen Waffen, um unerwünschte Zellen und Moleküle zu entdecken und zu eliminieren (25,34).

Nach den Anfängen monoklonaler Antikörper durch sie produzierende Hybride Ende der 60er sowie Anfang der 70er durch die Pionierarbeit von Littlefield, Kohler, Milstein und Galfree (35-38) sind monoklonale Antikörper in unseren Tagen weitverbreitet akzeptiert als unterstützende oder sogar alternative Therapie zur Bekämpfung bestimmter menschlicher Erkrankungen (35-43).

Für eine gezielte Therapie sollten monoklonale Antikörper **spezifisch** und **funktionell aktiv** sein, zudem insbesondere fähig, ohne zusätzliche Hilfe Apoptose zu induzieren.

Die vielversprechendsten Antikörper, die diese „Anforderungen“ erfüllen, sind **humanen Ursprungs**.

Sie sind Teil der **humanen Immunität**, entweder angeboren oder erworben, und können wie beschrieben durch die humane Hybridoma-Technologie isoliert werden (25).

Auf diese Weise konnten eine Serie von Tumor-spezifischen und Apoptose-induzierenden monoklonalen Antikörpern von gesunden Spendern wie auch von Krebspatienten isoliert werden (25,28,29,44,45).

Sie definieren neue Mechanismen, um Tumorzellen selektiv zu beseitigen, indem sie programmierten Zelltod triggern (26,27,29,30,45,46).

Im folgenden werden drei verschiedene durch humane, monoklonale Antikörper induzierte Apoptosemechanismen – soweit bekannt – beschrieben:

1.4.2 Tod durch Lipidakkumulation

Ein ausgeglichener Lipidmetabolismus ist ganz entscheidend für das Überleben einer jeden Säugetier-Zelle. Jedes Ungleichgewicht dieser Homöostase durch eine über-

mäßige Akkumulation von Fettsäuren in der Zelle kann zur Apoptose führen, ein Mechanismus, der in Tierversuchen belegt ist und der für bestimmte menschliche Erkrankungen wie zum Beispiel der lipotoxischen Cardiomyopathie verantwortlich gemacht wird. Zwar hat man inzwischen einige Mechanismen dieser Lipo-Apoptose beschrieben, auslösende Reagenzien konnte man bisher jedoch nicht ausmachen. Der Antikörper SAM-6, ein tumorspezifischer IgM, induziert eine intrazelluläre Akkumulation neutraler Lipide in Tumorzellen, nicht jedoch in normalen Zellen (44). Per elektronenmikroskopischer Analyse konnte hierbei die Formation von Apoptosekörpern nachgewiesen werden, beweisend dafür, dass SAM-6 verantwortlich für Lipo-Apoptose an Tumorzellen ist.

1.4.3 Tod durch Antikomplement

CD55 (bzw. decay-accelerating factor, kurz DAF) ist ein Zelloberflächenmolekül, das Zell-Lyse durch autologes Komplement verhindert (47,48).

Der natürliche Antikörper SC-1 bindet an eine modifizierte Isoform von DAF-B, die ausschließlich auf der Membran von Magenkarzinomzellen exprimiert wird (26,28,30). SC-1 erkennt hierbei ein Kohlenwasserstoff-Epitop von CD55 und induziert Apoptose von Magenkarzinomzellen sowohl *in vitro* (26,30,49-52) als auch *in vivo* (28,31,49).

In klinischen Studien konnte gezeigt werden, dass SC-1 Regression sowie Apoptose primärer Magenkarzinome ohne Kreuzreaktivität an Normalzellen induziert.

Die monomere Form von SC-1 hingegen wies eine geringere apoptotische Aktivität auf als die intakte, also pentamere Form, was wiederum impliziert, dass die vollständige Wirkung von SC-1 ein cross-linking an CD55 erfordert.

1.4.4 Tod durch „Verhungern“: PAM-1

Wachstumsfaktorrezeptoren wie EGFR oder FGFR werden oft an malignen Zellen überexprimiert, weil schnelleres und aggressives Wachstum eine höhere Aufnahme

sowie einen höheren Energieumsatz erfordern.

Ein Blockieren dieser Rezeptoren führt zu Hungern und schließlich zum Zelltod.

Der humane keimbahnkodierte monoklonale IGM PAM-1 bindet an einen Membranrezeptor, der als ein 130 kDa Integralmembran-Glykoprotein identifiziert wurde (30, 53), der homolog zu CFR-1 (cysteine-rich fibroblast growth factor receptor) ist (54).

Der post-transkriptionell modifizierte CFR-1/PAM-1-Rezeptor ist exprimiert auf fast allen epithelialen Karzinomen jeden Typs und Ursprungs sowie auf deren Vorläuferläsionen, jedoch nicht auf gesundem Gewebe (27,55).

Von der monomeren Form von PAM-1 hat man sowohl *in vitro* wie auch *in vivo* einen inhibitorischen Effekt auf das Wachstum von Tumorzellen nachweisen können, indem er Apoptose induziert (46).

Dies legt nahe, dass ein cross-linking am Rezeptor für die toxische Wirkung dieses Antikörpers nicht notwendig ist. Möglicherweise blockiert PAM-1 seinen Rezeptor, wodurch die Zelle nicht mehr mit Nährstoffen versorgt wird und schlichtweg verhungert.

Der exakte Mechanismus, der hinter diesen Vorgängen steckt, ist schließlich noch unbekannt.

In dieser Arbeit sollen nun die intrazellulären Mechanismen, die durch den Kontakt von monomerem PAM-1 mit seinem Rezeptor induziert werden, anhand von Proteinphosphorylierungen und deren selektiver Hemmung näher charakterisiert werden.

2. Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Chemikalien und Verbrauchsmittel

2.1.1.1 Verbrauchsmittel

- MTT- Färbelösung (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium), bezogen von Fa. Sigma, München
- Nitrocellulose (Porenweite 0,2 µm), bezogen von Fa. Schleicher u. Schüll, Dassel
- Rotiquant (Bradford-Proteinbestimmung), bezogen von Fa. Roth, Karlsruhe
- Zellkulturmedium RPMI-1640 (+ 1% Glutamin, 1% Penicillin, 10% FCS = fetales Kälberserum), bezogen von Fa. PAA, Wien

Alle übrigen Reagenzien (s. auch Lösungen und Puffer) wurden von folgenden Firmen bezogen :

- Fa. Merck, Darmstadt
- Fa. Roth, Karlsruhe
- Fa. Sigma, München

2.1.1.2 Antikörper

Für die Detektion von Veränderungen der Proteinphosphorylierungsmuster wurden folgende Antikörper eingesetzt:

- Anti-Phospho-Tyrosin (Biotin Conjugat), Fa. Sigma, München
- Anti-Phospho-Serin (Biotin Conjugat), Fa. Sigma, München
- Anti-Phospho-Threonin (Biotin Conjugat), Fa. Sigma, München

2.1.1.3 Enzyme

Zur optischen Darstellung der veränderten Proteinphosphorylierungsmuster wurde folgendes Reagens verwendet:

- Extravidin (Peroxidase Conjugat), Fa. Sigma, München

2.1.2 Zelllinie

Bei allen unter 3. genannten Versuchen wurden Magen-Karzinom-Zellen der Zelllinie 23132 verwendet (56). Sie wurden von einem Magenbiopsat eines Magen-Karzinom-Patienten isoliert.

Die Auswahl fiel auf diese Zelllinie, weil mit ihr im Zusammenhang mit PAM-1 die eindeutigsten Resultate zu erzielen waren.

2.1.3 Geräte

Folgende Geräte kamen für die Versuche zum Einsatz:

- Aquabidest-Anlage Milli-Q Plus PF, Fa. Millipore, Eschborn
- Brutschrank, Fa. Heraeus, Hanau
- Gel-Elektrophorese-Kammer, Fa. Biometra, Göttingen
- Kühlzentrifuge J2-HS, Fa. Beckmann, München
- Photometer Uvikon 810, Fa. Kontron Instrument, Schweiz
- Pipetten, Fa. Gilson und Fa. Eppendorf, Hamburg
- Sonifikator Labsonic V, Fa. B. Braun, Melsungen
- Spannungsgerät Gene Power Supply GPS, Fa. Pharmacia, Freiburg
- Vortex Genie 2, Fa. Bender & Hobein, Zürich, Schweiz
- Waage, Fa. Sartorius, Göttingen

- Wasserbad Minitherm 2, Fa. Dinkelberg–Labortechnik, Neu-Ulm
- Western-Blot-Kammer, Fa. Bio-Rad, München
- Zentrifuge Minifuge T, Fa. Heraeus, Hanau

Die Kunststoffartikel wurden sämtlich von der Fa. Greiner, Frickenhausen bezogen.

2.1.4 Lösungen und Puffer

2.1.4.1 Lösungen zur Zellextraktion

- SDS – Lysis – Puffer: SDS 2%
Glycerol 10%

- Puffer A: HEPES pH 7,9 20mM
 - EDTA 0,1 mM
 - EGTA 0,1 mM
 - KCl 10 mM
 - DTT 1 mM
 - PMSF 1 mM

- Puffer C: HEPES pH 7,9 20 mM
 - EDTA 1 mM
 - EGTA 1 mM
 - KCl 0,4 mM
 - DTT 1 mM
 - PMSF 1 mM

- Probenpuffer (5 x SDS): Tris/HCl 250 mM
 - SDS 10%

Acrylamid-Mix	30%
TEMED	100%
APS	10%

- 10 x SDS-Laufpuffer: Tris 250 mM, pH 8,4
Glycin 1,92 M
SDS 1%

2.1.4.4 Lösungen für Western-Blot

- Transferpuffer: Tris 50 mM, pH 8,3
SDS 0,1%
Methanol 20%

2.1.4.5 Lösungen für Immunodetektion

- Blocklösung für die Inkubation mit den unter 2.1.1.2 genannten Antikörpern:

1 x PBS, pH 7,4
Tween 0,05%
BSA 3%

2.2 Zellbiologische Methoden

2.2.1 Zellkultur

Für die Versuche wurden ausschließlich adhärente Magen-Karzinom-Zellen der Zelllinie 23132 verwandt. Dazu wurden diese in Gewebekulturflaschen bzw. -platten mit dem Medium RPMI 1640 (+ 1% Glutamin, 1% Penicillin/Streptomycin, 10% FCS) im

Brutschrank (37°C, 7% CO₂) jeweils solange herangez üchtet, bis der Flaschen- bzw. Plattenboden zu ungefähr 60 – 70% bewachsen war. Diese Zelldichte hat sich zur weiteren Verarbeitung am besten bewährt. Die Dehärenz der Zellen wird schließlich durch ein Trypsin-/EDTA-Gemisch, mit dem diese für 7 – 8 Minuten bei 37°C im Brutschrank inkubiert werden, herbeigeführt. Unter Zugabe von frischem Medium wurde diese Suspension 5 Minuten lange bei 1500 rpm zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Zellpellet sorgfältig wiederum mit frischem Medium resuspendiert. Diese Zellsuspension konnte somit entweder der weiteren Verarbeitung oder, nach Verdünnung 1:10, der neuerlichen Kultivierung zugeführt werden.

2.2.2 MTT – Test

Der MTT – Test dient der relativen Quantifizierbarkeit von Zellproliferation, im Falle dieser Versuche der Zelllinie 23132. Er wurde in seinen Grundzügen von MOSMANN, 1983 bzw. CARMICHAEL, 1987 übernommen und in modifizierter Weise folgendermaßen ausgeführt (57,58):

Zunächst wurden Zellen in Kultur wie oben angegeben von ihrer Unterlage gelöst, zentrifugiert, resuspendiert und schließlich auf 10⁶ Zellen pro ml verdünnt. Von dieser Zellsuspension wurden dann je 50 µl in die Reihen 2 –12 sogenannter 96–Well–Platten pipettiert (d.h 5 x10⁴ Zellen/Well), Reihe 1 wurde als Negativkontrolle ausschließlich mit je 100 µl Medium aufgefüllt. Anschließend wurden den Reihen 2 – 12 noch 50 µl Medium mit entsprechenden PAM-1-Verdünnungen (bzw. Reihe 2 nur Medium als Positivkontrolle) hinzugegeben.

In dieser Konstellation wurden diese Platten schließlich für 24 bzw. 48 Stunden im Brutschrank inkubiert. Nach Ablauf dieser Zeit wurden jedem Well 50 µl MTT-Lösung hinzupipettiert, es folgte eine weitere Inkubation im Brutschrank für 15 – 30 Minuten. Danach wurden die Platten 10 Minuten lang bei 2800 rpm abzentrifugiert, der Überstand abgesaugt. Jedem Well wurden dann 150 µl DMSO hinzugefügt, die Zellpellets resuspendiert. Um nun aus der jeweiligen Farbintensität auf das Ausmaß der Proliferation schließen zu können, wurden im ELISA – Reader für jedes Well die Absorption bei $\lambda=540$ nm bzw. $\lambda=690$ nm bestimmt und deren Differenz gebildet.

2.2.3 Phosphorylierungstudien

Um eine durch PAM-1 induzierte Veränderung von Proteinphosphorylierungen sichtbar zu machen, wurde folgender Versuchsaufbau gewählt:

Zunächst wurden die unter in 2.2.1 genannten Bedingungen kultivierten Zellen für die bei den jeweiligen Versuchen genannten Zeiten im Brutschrank mit geringstem PAM-1 inkubiert. Nach Ablauf der jeweils angegebenen Zeiten Medium verwerfen, mit 1xPBS+0,05% Tween waschen (3 x 5 Minuten) und Zellen entweder in SDS-Lysis-Puffer (Gesamtzellextrakt) oder 1xPBS +0,05% Tween (Cytosol-/Zellkern extrakt) – jeweils 1 ml pro Kulturschale – mit dem Zellschaber abschaben. Nachdem die Proteinproben wie beschrieben vorbereitet wurden, wurden sie durch eine SDS-Page aufgetrennt und mittels Western-Blot vom Gel auf Nitrocellulose übertragen. Danach wurden diese Proteine mit Blocklösung zur Blockierung unspezifischer Bindungen inkubiert (1 h), weiterhin mit Primärantikörper (Anti-Phospho-Tyrosin, -Serin, oder -Threonin) und schließlich Extravidin (auch je 1 h). Die durch die Sekundärinkubation erzeugte Chemoluminiszenzreaktion wurde letztlich mittels Belichtung und somit Schwärzung eines Röntgenfilms sichtbar gemacht.

2.3 Biochemische Methoden

2.3.1 Herstellung von Gesamtzellextrakten

Zur Extrahierung der Gesamtzellproteine wurden die Zellen nach Ablauf der jeweiligen Inkubationszeit wie folgt behandelt:

Zunächst wurde die Inkubationslösung (Medium + PAM-1) bzw. im Falle der Kontrolle das Medium verworfen und die auf den Zellkulturschalen adhärenen Zellen mit 1xPBS+0,05% Tween gewaschen. Danach wurden jeder Schale 1 ml SDS – Lysis – Puffer hinzupipettiert, wodurch ein Auflösen der Zellen erreicht werden konnte. Nach mehmaligem Schwenken der Schalen wurde diese Suspension mit dem Zellschaber abgeschabt, in Eppendorf-Caps überführt und auf Eis inkubiert. Um beim Proteinge-

halt der Proben falsch hohe Werte durch DNA zu vermeiden, wurden diese im Sonifikator jeweils ungefähr für 40 Sekunden mit Ultraschall beschallt.

2.3.2 Herstellung von Cytosolextrakten

Nachdem die Zellen der Zelllinie 23132 wie unter 2.2.3 beschrieben mit gereinigtem PAM-1 inkubiert und gewaschen wurden, wurden diese in je 1 ml 1xPBS+0,05% Tween aufgenommen, die Suspension von den Schalen abgeschabt und in einem geeigneten Gefäß für 5 Minuten bei 2500 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das Pellet mit Puffer A (2.1.4.1) versetzt, sorgfältig resuspendiert und 15 – 30 Minuten auf Eis inkubiert, um die Zellen – osmotisch bedingt – anschwellen zu lassen. Um die geschwollenen Zellen zu zerstören, wurde diese Suspension anschließend 10 x durch eine Kunststoffspritze (10 ml) mit kleinkalibriger Kanüle gezogen, wieder in das Gefäß zurückgepresst und schließlich für 5 Minuten bei 13000 rpm in der Kühlzentrifuge zentrifugiert. Der Überstand wurde als Cytosol – Extrakt in ein neues Gefäß überführt, das Pellet als Zellkern – Extrakt bis zur Weiterverarbeitung (s. 2.3.3) auf Eis gelagert. Der Cytosol – Extrakt war nach weiterer Zentrifugation für 15 – 20 Minuten bei 13000 rpm gebrauchsfertig, die Lagerung erfolgte bei –20°C.

2.3.3 Herstellung von Zellkernextrakten

Zunächst wurde das Pellet (s. 2.3.2) mit Puffer A gewaschen (Zugabe Puffer A – Resuspendieren – Zentrifugation 5 Minuten bei 13000 rpm – Überstand verwerfen) und in Puffer C aufgenommen. Diese Suspension wurde 20 Minuten geschüttelt und letztlich 15 – 20 Minuten bei 13000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde als Zellkern – Extrakt bei –20°C gelagert.

2.3.4 Proteinbestimmung

Prinzipiell erfolgte bei beiden der folgenden Methoden ein durch Proteine erzeugter Farbumschlag der mit den entsprechenden Proben versetzten Färbelösungen, wobei dessen Intensität innerhalb eines gewissen Bereichs eine direkte lineare Abhängigkeit zum Proteingehalt aufweist. Aus der Bestimmung der Extinktion der jeweiligen Probe im Photometer bei einer bestimmten Wellenlänge (λ) konnten zunächst nur relative Werte erzeugt werden. Durch Bildung einer Eichgeraden durch einen Proteinstandard (BSA, 1 mg/ml) und Übertragung dieser Relativwerte auf diese Gerade konnten die entsprechenden Proteinmengen berechnet werden.

2.3.4.1 BCA - Assay

Diese Methode der Proteinbestimmung von SMITH et al. (59) wurde ausschließlich für die Proben mit Gesamtzellproteinextrakten verwendet, da diese bereits primär SDS enthalten und eben nur diese Methode SDS als Probenbestandteil (bis 1%) toleriert.

Die Färbelösungen wurden wie unter 2.1.4.2 angegeben gemischt, nach Zugabe der jeweiligen Probe folgte eine Inkubation im Brutschrank für etwa 20 Minuten und schließlich die Extinktionsmessung im Photometer bei $\lambda=562$ nm.

2.3.4.2 Bradford - Proteinbestimmung

Bei allen anderen Proben, die kein SDS enthielten, kam die Methode nach Bradford (60) zur Anwendung. Hierbei wurde eine bereits fertig lieferbare Färbelösung (Rotiquant) wie unter 2.1.4.2 beschrieben gemischt und konnte nach Probenzugabe umgehend der Extinktionsmessung im Photometer bei $\lambda=595$ nm zugeführt werden.

2.3.5 SDS-Page

Die Natriumdodecylsulfat – Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS – Page) stellt eine Methode dar, Proteine ausschließlich nach ihrem Molekulargewicht aufzutrennen, da SDS den Einfluß der unterschiedlichen Proteinladungen durch seine eigene negative Ladung zu überdecken und somit auszugleichen vermag.

Zunächst mussten die Proteinproben für den Gellauf vorbereitet werden, so dass alle folgende Endkonzentrationen aufwiesen:

SDS	2%
Tris/HCl, pH 6,8	65 mM
Glycerin	15%
Bromphenolblau	0,01%

Die Auftrennung der Proteinproben erfolgte auf 1,0 mm dicken Acrylamid-Gelen in vertikaler Anordnung in den unter 2.1.3 angegebenen Gel – Elektrophorese – Kammern. Je nach Größe der darzustellenden Proteine wurde der Acrylamidanteil der Gele variiert: 10% für Proteine mit MG 30-50 kDa bzw. 8% bei MG 50-120 kDa. Zum Gellauf schließlich wurde der unter 2.1.4.3 genannte SDS – Laufpuffer verwendet, eine Stromstärke von 20 mA am Spannungsgerät erwies sich als optimal. Das Ende des Gellaufs wurde schließlich durch den Übertritt von BPB in den Laufpuffer angezeigt. Die Gele wurden vorsichtig von den Glasplatten abgehoben und umgehend dem Western – Blot – Verfahren zugeführt.

2.3.6 Western-Blot

Dieses Verfahren von TOWBIN et al. (61) diente der Übertragung der mittels SDS – Page aufgetrennten Proteine auf eine Nitrocellulose – Membran.

Zunächst mussten Filterpapier, Membran und Gel in dem unter 2.1.4.4 genannten Blotpuffer äquilibriert werden, wonach Membran und Gel wie ein Sandwich zwischen das Filterpapier genommen wurden. Dieses Sandwich wurde in die Western – Blot –

Kammer (s.2.1.3) eingelegt, die Übertragung lief schließlich für 1,5 h bei einer Stromstärke von 55 mA pro Gel bzw. Blot.

Um den Erfolg der Übertragung zu prüfen und um den Proteinstandard einzuzeichnen, wurde der Blot nach Ablauf dieser Zeit reversibel mit 0,2%-iger Ponceau – Lösung angefärbt und zur weiteren Verarbeitung durch Waschen mit 1xPBS+0,05% Tween wieder entfärbt.

Mußte der Blot gelagert werden (bei -20°C , zwischen Filterpapier), so wurde er zunächst in Raumluft getrocknet.

3. Ergebnisse

3.1 Proliferationsstudien

Wie bereits beschrieben, weist PAM-1 über den Rezeptor CFR-1 einen inhibitorischen Effekt auf die Proliferation von Magenkarzinomzellen auf. Deshalb wurden MTT-Assays durchgeführt, bei denen diese Zellen mit einer steigenden PAM-1-Konzentration inkubiert wurden:

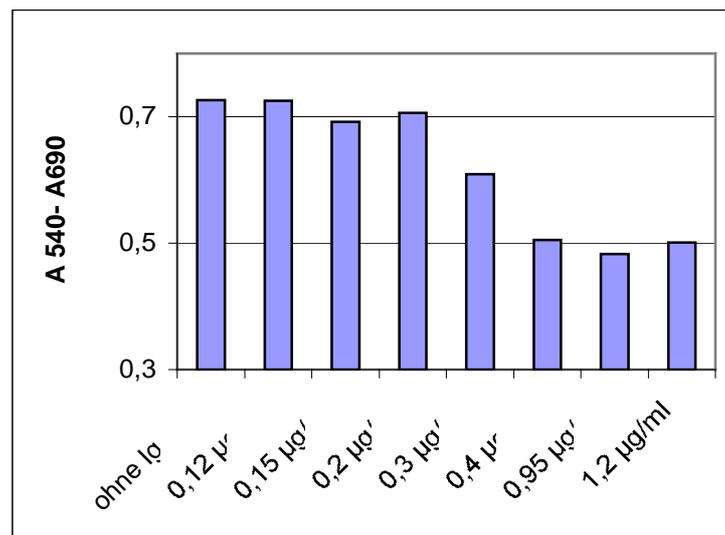


Abb.1: MTT-Proliferationstest von Zellen der Zellreihe 23132 unter dem Einfluß steigender PAM-1-Konzentrationen

Zellen der Zellreihe 23132 wurden in 96-Well-Platten 24 Stunden lang mit den oben angegebenen PAM-1-Konzentrationen im Brutschrank inkubiert; nach Ablauf dieser Zeit Zugabe von 50 µl MTT-Färbelösung/Well, Inkubation für 20 Minuten im Brutschrank, Zentrifugation bei 2500 rpm für 10 Minuten, Absaugen des Überstandes, Resuspendieren jedes Pellets mit 150 µl DMSO; Bestimmung der Farbintensität im ELISA-Reader bei $\lambda=540$ nm und $\lambda=690$ nm, Errechnung der Proliferationsrate aus deren Differenz; Abb.1 zeigt eine Abnahme der Zellproliferation unter steigender PAM-1-Konzentration;

Diese MTT-Assays wiesen dem gereinigten Antikörper PAM-1 übereinstimmend eine antiproliferative Wirkung nach, die sich in Abhängigkeit steigender Ig – Konzentrationen verstärkt.

Da dies genau der entgegengesetzten als der ursprünglich zugeschriebenen Wirkung dieses Antikörpers entsprach, wurde zur Prüfung der Intaktheit seiner in vivo pentameren Struktur eine SDS-Page von PAM-1 in gereinigter Form angefertigt.

Nach seiner Auftrennung erfolgte die Übertragung auf Nitrocellulose mittels Western-Blot-Verfahren:

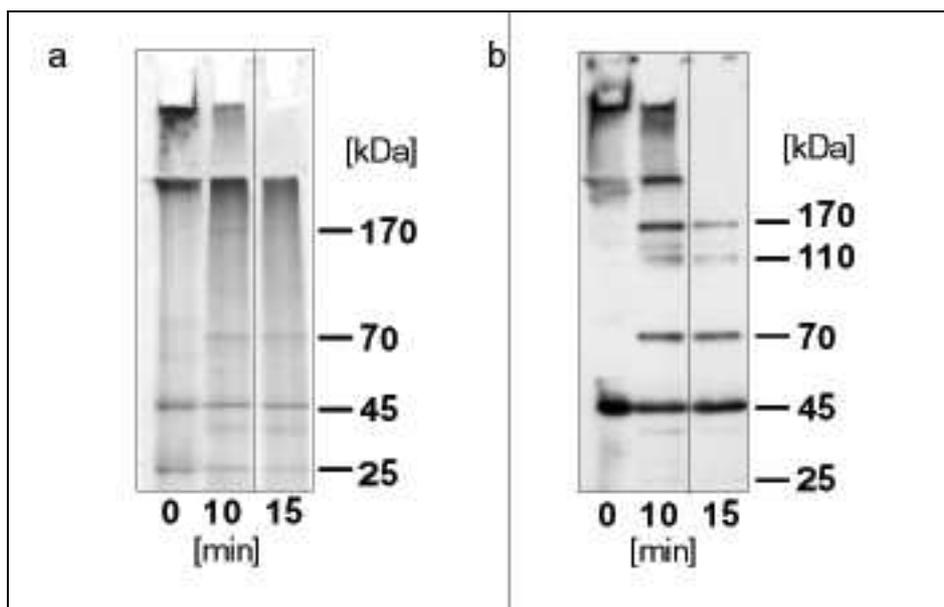


Abb.2a: SDS-Page, 2b: Western-Blot (freundlicherweise angefertigt und überlassen von Labor Prof. Dr. Vollmers, pathol. Institut der Universität Würzburg)

Abb. 2a und b zeigen ein Verharren des Antikörpers im Sammelgel vor der Pepsinverdauung (0 min) aber keine Auftrennung; nach Verdauung (10 und 15 min) Auftrennung in fragmentierter Form.

Die Tatsache, dass der humane Antikörper PAM-1 vor der Pepsinverdauung bei der Auftrennung per SDS-Page im Sammelgel sistierte, beweist, dass er in dieser Form ein höheres MG hat als der gereingte Antikörper, der sich im Trenngel auftrennen lässt. Dies wiederum bedeutet, dass der gereingte PAM-1 wohl nur noch monomere Struktur aufweist.

Somit bestätigt sich die Aussage, dass PAM-1 als Monomer eine antiproliferative Wirkung auf das Wachstum von Magenkarzinomzellen der Zellreihe 23132 hat.

3.2 Phosphorylierungsstudien

Der humane Antikörper PAM-1 inhibiert als Monomer beschrieben die Proliferation von Magen – Karzinom – Zellen der Zelllinie 23132. Da Zellwachstum bzw. Veränderungen in dessen Kinetik sehr häufig mit Phosphorylierungen oder/und Dephosphorylierungen in der Zelle verbunden sind, sollen hiermit genau diese etwaigen Veränderungen aufgezeigt werden

3.2.1 Gesamtzell – Proteinextrakte

Dazu wurden die Zellen wie beschrieben mit PAM-1 inkubiert (s. 2.2.3), Gesamtzellproteinextrakte gebildet und diese Proteine per SDS – Page aufgetrennt. Nach Übertragung der Proteinbanden auf Nitrocellulose durch das Western – Blot – Verfahren, wurden Phosphorylierungen der verschiedenen Proteinkinasen durch die entsprechenden Antikörper Anti – Phospho – Tyrosin (Abb.3), - Serin (Abb.4) und -Threonin (Abb.5) aufgedeckt:

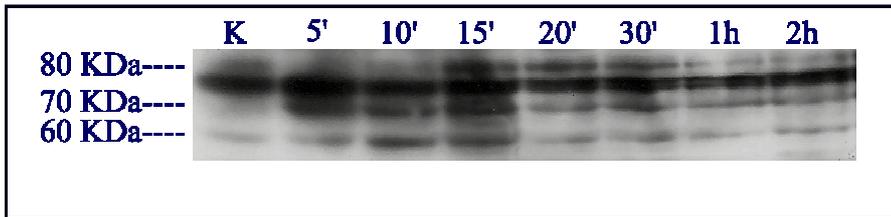


Abb.3: Veränderungen im Phospho-Tyrosin-Muster von Zellen der Zelllinie 23132 nach Inkubation mit PAM-1

Nach Inkubation der Zellen mit PAM-1 für die angegebenen Zeiten Extrahierung der Gesamtzellproteine; danach Auftrennung dieser Proteine mittels SDS-Page (10% Acrylamid-Anteil) und Übertragung auf Nitrocellulose per Western-Blot-Verfahren; nach Blocken der Membran Inkubation mit Primär-Ig Anti-Phospho-Tyrosin (Konzentration lt. Hersteller); Inkubation mit Extravidin und Belichtung eines Röntgenfilms; Abb.3 zeigt einen Anstieg der Tyrosinphosphorylierungen bei 60 KDa nach 10 und 15 Minuten Inkubationszeit, bei 70 Kda nach 5, 10 und 15 Minuten und bei 80 Kda nach 15, 20 und 30 Minuten;

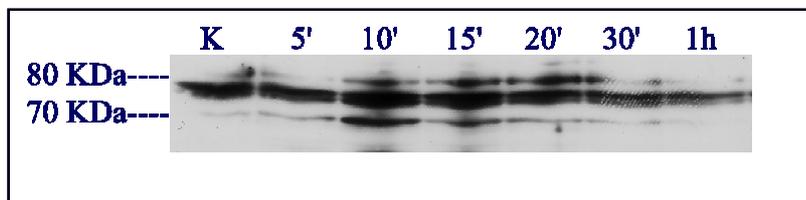


Abb.4: Veränderungen im Phospho-Serin-Muster von Zellen der Zelllinie 23132 nach Inkubation mit PAM-1

Nach Inkubation der Zellen mit PAM-1 für die angegebenen Zeiten Extrahierung der Gesamtzellproteine; danach Auftrennung dieser Proteine mittels SDS-Page (10% Acrylamid-Anteil) und Übertragung auf Nitrocellulose per Western-Blot-Verfahren; nach Blocken der Membran Inkubation mit Primär-Ig Anti-Phospho-Serin (Konzentration lt. Hersteller); Inkubation mit Extravidin und Belichtung eines Röntgenfilms; Abb.4 zeigt einen Anstieg der Serinphosphorylierungen bei 70 Kda nach 10 und 15 Minuten Inkubationszeit und bei 80 Kda nach 10, 15 und 20 Minuten;

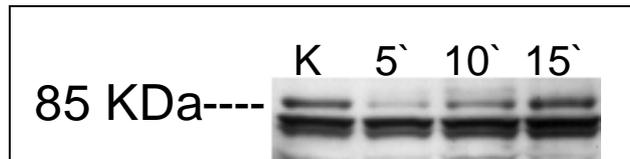


Abb.5: Veränderungen im Phospho-Threonin-Muster von Zellen der Zelllinie 23132 nach Inkubation mit PAM-1

Nach Inkubation der Zellen mit PAM-1 für die angegebenen Zeiten Extrahierung der Gesamtzellproteine; danach Auftrennung dieser Proteine mittels SDS-Page (10% Acrylamid-Anteil) und Übertragung auf Nitrocellulose per Western-Blot-Verfahren; nach Blocken der Membran Inkubation mit Primär-Ig Anti-Phospho-Threonin (Konzentration lt. Hersteller); Inkubation mit Extravidin und Belichtung eines Röntgenfilms; Abb.5 zeigt eine Threonin-Dephosphorylierung bei 85 KDa nach 5 Minuten, die sich über 10 und 15 Minuten wieder vollständig aufhebt;

Es ließen sich also Phosphorylierungen bzw. Dephosphorylierungen verschiedener Proteine nachweisen, die als eine frühe Antwort der Zellen auf den Kontakt mit dem humanen Antikörper PAM-1 gelten dürfen.

Zur Einschränkung des Arbeitsvolumens sollten die weiteren Versuche auf die Veränderungen im Tyrosin – und Serin – Phosphorylierungsmuster beschränkt bleiben, außerdem jeweils auf das 70 KDa – Protein, da dessen Phosphorylierung am sichersten zu reproduzieren war.

3.2.2 Cytosol – Proteinextrakte

Um Rückschlüsse auf die Lokalisation dieser womöglich sogar identischen 70 KDa – Proteine (kombinierte Tyrosin-/Serinkinase) ziehen zu können, wurden wiederum Zellen der Zelllinie 23132 mit PAM-1 inkubiert (s.2.2.3), Cytosolextrakte gebildet (s. 2.3.2), diese Cytosol-Proteine mittels SDS-Page aufgetrennt und per Western – Blot-Verfahren auf Nitrocellulose transferiert und die Veränderungen im Tyrosin- (Abb.6) und Serin-Phosphorylierungsmuster (Abb.5) mit den jeweiligen Antikörpern detektiert.

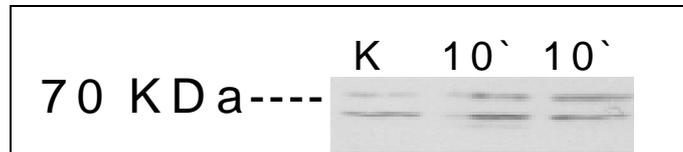


Abb.6: Cytosol-Extrakte von Zellen der Zelllinie 23132 nach Inkubation mit PAM-1; Veränderungen im Phospho-Tyrosin-Muster

Nach Inkubation der Zellen mit PAM-1 für die angegebene Dauer Extrahierung der Cytosol-Proteine; danach Auftrennung der Proteine mittels SDS-Page (8% Acrylamid-Anteil) und Transfer auf eine Nitrocellulose-Membran per Western-Blot; nach Blocken der Membran Inkubation mit Primär-Ig Anti-Phospho-Tyrosin; Inkubation mit Extravidin und Belichtung eines Röntgenfilms; Abb.6 zeigt eine gegenüber der Kontrolle zunehmende Phosphorylierung von Tyrosinresten eines 70 kDa – Proteins nach 10 Minuten;

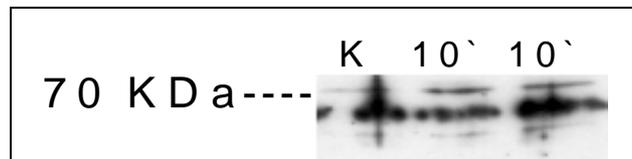


Abb.7: Cytosol-Extrakte von Zellen der Zelllinie 23132 nach Inkubation mit PAM-1; Veränderungen im Phospho-Serin-Muster

Nach Inkubation der Zellen mit PAM-1 für die angegebene Dauer Extrahierung der Cytosol-Proteine; danach Auftrennung der Proteine mittels SDS-Page (8% Acrylamid-Anteil) und Transfer auf eine Nitrocellulose-Membran per Western-Blot; nach Blocken der Membran Inkubation mit Primär-Ig Anti-Phospho-Serin; Inkubation mit Extravidin und Belichtung eines Röntgenfilms; Abb.7 zeigt eine gegenüber der Kontrolle ansteigende Phosphorylierung von Serinresten eines 70 kDa – Proteins nach 10 Minuten;

In beiden Fällen zeigten die Cytosol – Extrakte ein 70 KDa – Protein, dass eine Veränderung im Proteinphosphorylierungsmuster durch Kontakt mit dem Antikörper PAM-1 erfährt.

Die Proteine aus Zellkernextrakten ergaben keinen weiteren Aufschluß hinsichtlich Veränderungen im Tyrosin - / Serin – Phosphorylierungsmuster und somit auch nicht hinsichtlich deren Lokalisation. Aus diesen Gründen wurden entsprechende Abbildungen nicht dargestellt.

3.3 Inhibitionsstudien

3.3.1 MTT – Assay

Genistein ist ein Breitspektrum – Hemmstoff von Tyrosinkinase. Da Phosphorylierungen u.a. von Tyrosinresten wie unter 3.1 gezeigt eine frühe Antwort der Zelle auf die Inkubation mit PAM-1 darstellen, sollte im folgenden gezeigt werden, wie die Inhibition gerade dieser Phosphorylierungen sich auf die Antikörper – vermittelte Inhibition von Zellen der Zelllinie 23132 auswirkt.

Dazu wurden im MTT-Assay diese Zellen einer steigenden Genisteinkonzentration ausgesetzt. Dabei wurde der Genisteineffekt auf die Zellproliferation mit und ohne PAM-1 verglichen (s. Abb.8).

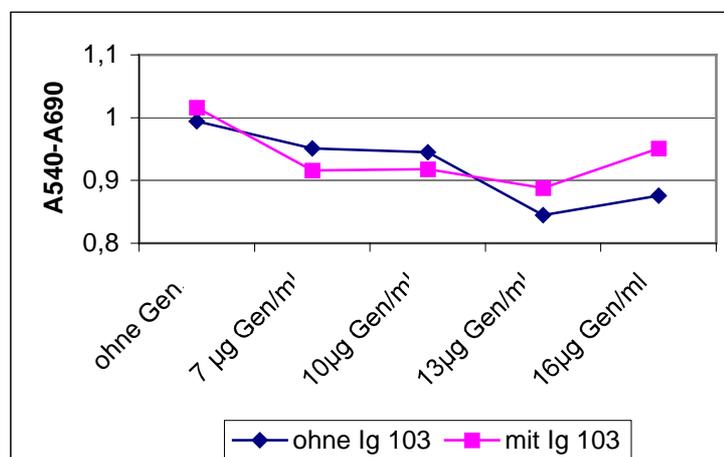


Abb.8: MTT-Proliferationstest von Zellen der Zellreihe 23132 unter dem Einfluß steigender Genisteinkonzentration; Vergleich mit/ohne Ig 103/51(PAM-1)-Inkubation

Zellen der Zellreihe 23132 wurden in 96-Well-Platten 2 Stunden lang mit den oben angegebenen Genistein-Konzentrationen im Brutschrank inkubiert; danach Zugabe von Ig 103/51 (PAM-1) zu jeder 2.Reihe, wiederum Inkubation im Brutschrank für 24 Stunden; nach Ablauf dieser Zeit Zugabe von 50 µl MTT-Färbelösung/Well, Inkubation für 20 Minuten im Brutschrank; Zentrifugation bei 2500 rpm für 10 Minuten, Absaugen des Überstandes, Resuspendieren jedes Pellets mit 150 µl DMSO; Bestimmung der Farbintensität im ELISA-Reader bei $\lambda=540$ nm und $\lambda=690$ nm, Bildung der Proliferationsrate aus deren Differenz; Abb.8 zeigt eine Abnahme der Zellproliferation unter steigender Genisteinkonzentration, demgegenüber Abschwächung dieses Effekts nach Inkubation mit PAM-1;

Wie erwartet führte die steigende Genisteinkonzentration zu einer Abnahme der Zellproliferationsrate.

Weiterhin wurde jedoch gezeigt, dass dieser bekannte Effekt durch die Inkubation mit dem humanen Antikörper PAM-1 im Bereich einer Dosierung von 7 –13 µg/ml Genistein keinen weiteren Effekt brachte.

Über einer Genistein-Konzentration von 13 µg/ml führte eine weitere Dosissteigerung zu keinem zunehmenden antiproliferativen Effekt mehr.

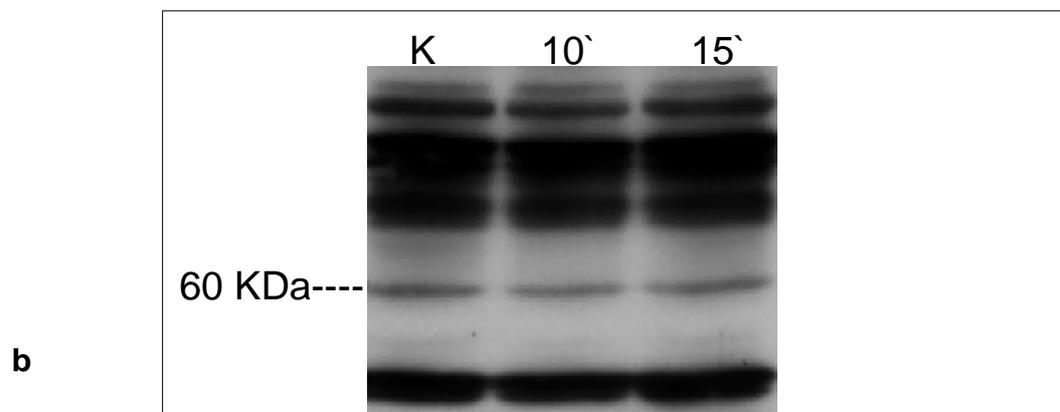
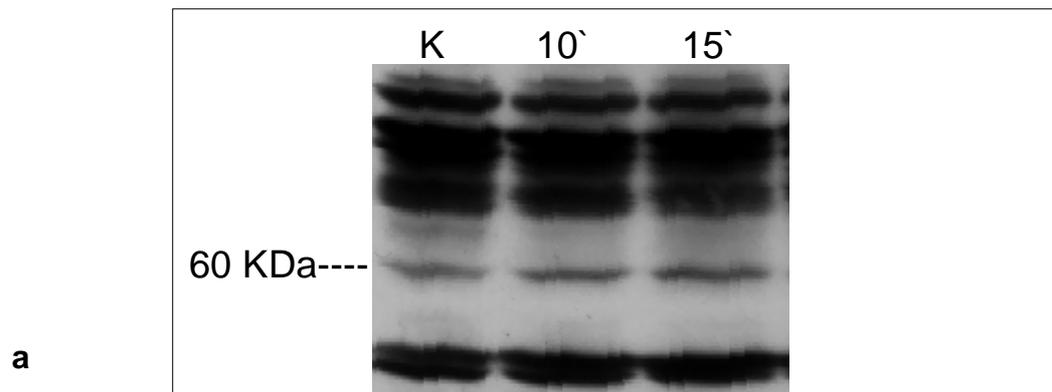
Durch Zugabe von PAM-1 ab dieser Genistein-Konzentration wird der antiproliferative Effekt zunehmend abgeschwächt.

3.3.2 Western – Blot

Hiermit sollte überprüft werden, ob die unter 3.1.1 gezeigten Phosphorylierungen von Tyrosinresten selektiv durch die Zugabe des Tyrosinkinase – Inhibitors Genistein gehemmt werden können und ob dadurch auch die Serinphosphorylierungen beeinflusst werden.

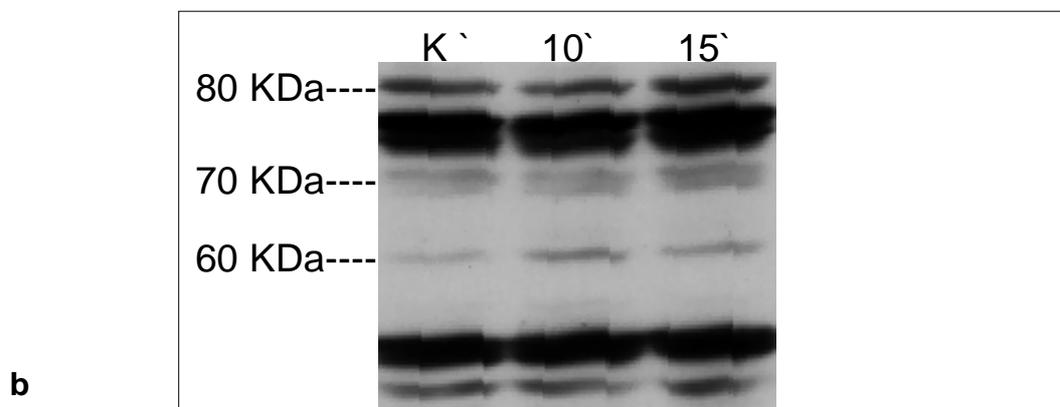
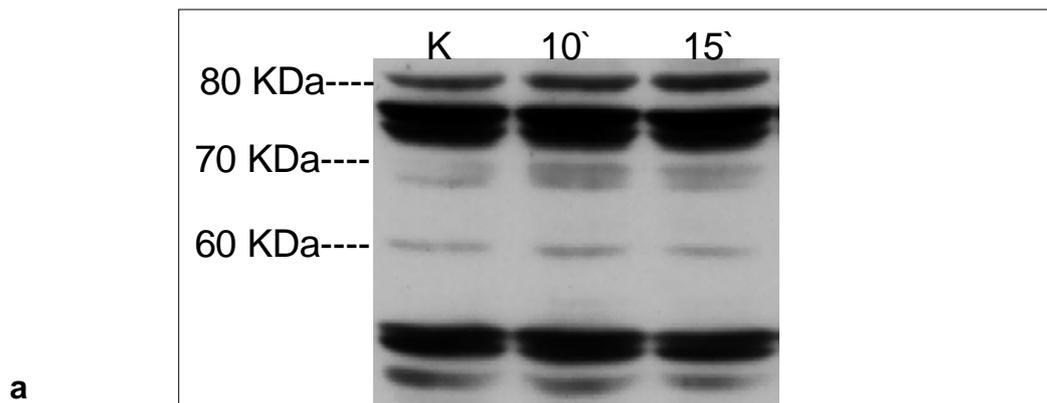
Es wurden erneut Zellen der Zellreihe 23132 mit PAM-1 inkubiert, nun aber mit Genistein vorbehandelt. Es wurden wiederum die Gesamtzellproteine extrahiert, per SDS-Page aufgetrennt und nach dem Western – Blot – Verfahren auf eine Nitrocellulose – Membran übertragen. Darauf folgte die Detektion veränderter Protein-

phosphorylierungsmuster mit den Primär – Ig's Anti – Phospho – Tyrosin (Abb.9)
bzw. – Serin (Abb.10):



**Abb.9: Gesamtzellproteinextrakte von Zellen der Zellreihe 23132 nach Inkubation mit PAM-1
Veränderungen im Phospho-Tyrosinmuster; a: keine Vorinkubation mit Genistein; b: Vorinku-
bation mit Genistein**

Nach Vorinkubation von Zellen der Zellreihe 23132 mit Genistein (14 µg/ml) für 2 Stunden im Brutschrank (b) Inkubation mit Ig 103/51 (PAM-1) für die angegebenen Zeiten ebenfalls im Brutschrank; Herstellung von Gesamtzellproteinextrakten; Auftrennung dieser Proteine per SDS-Page (8% Acrylamid-Anteil) und Transfer auf Nitrocellulose mittels Western-Blot; nach Blocken der Membran Inkubation mit Primär-Ig Anti-Phospho-Tyrosin (Konzentration lt. Hersteller); Inkubation mit Extravidin und Belichtung eines Röntgenfilms; Abb.9a zeigt im Vergleich zur Kontrolle eine Zunahme der Tyrosinphosphorylierungen bei 60 KDa nach 10 und 15 Minuten Inkubationszeit, die Abb.9b nicht aufweist;



**Abb.10: Gesamtzellproteinextrakte von Zellen der Zellreihe 23132 nach Inkubation mit PAM-1
Veränderungen im Phospho-Serinmuster; a: keine Vorinkubation mit Genistein; b: Vorinku-
bation mit Genistein**

Nach Vorinkubation von Zellen der Zellreihe 23132 mit Genistein (14 µg/ml) für 2 Stunden im Brutschrank (b) Inkubation mit Ig 103/51 (PAM-1) für die angegebenen Zeiten ebenfalls im Brutschrank; Herstellung von Gesamtzellproteinextrakten; Auftrennung dieser Proteine per SDS-Page (8% Acrylamid-Anteil) und Transfer auf Nitrocellulose mittels Western-Blot; nach Blocken der Membran Inkubation mit Primär-Ig Anti-Phospho-Serin (Konzentration lt. Hersteller); Inkubation mit Extravidin und Belichtung eines Röntgenfilms; Abb.10a zeigt eine Zunahme der Serinphosphorylierungen bei 60 und 80 KDa nach 10 und 15 Minuten Inkubationszeit; Abb.10b zeigt im Vergleich zur Kontrolle eine Zunahme der Serin- phosphorylierungen bei 60 KDa nach 10 und 15 Minuten und bei 70 und 80 KDa nach 15 Minuten;

Während also die durch PAM-1 induzierten Phosphorylierungen von Tyrosinresten der oben angegebenen Proteine durch Genistein inhibiert werden konnten, zeigten sich die Phosphorylierungen von Serinresten völlig unbeeinflusst.

4. Diskussion

Wie eingangs gezeigt, bestätigte sich die *in vitro* antiproliferative Wirkung von fragmentiertem, also monomerem PAM-1 auf Magenkarzinomzellen der Zellreihe 23132 in Abhängigkeit von steigenden Antikörperkonzentrationen (s. Abb. 1 u. 2). Wie bereits beschrieben ist inzwischen bekannt, dass sich dieser Effekt auch *in vivo* reproduzieren lässt. Hierzu wurden Mäusen zunächst Tumorzellen intraperitoneal injiziert. Vier Tage später erhielten diese Mäuse fragmentierten PAM-1, während eine Kontrollgruppe den intakten, also pentameren PAM-1 appliziert bekam. Erwartungsgemäß fiel das Tumorwachstum der Kontrollgruppe deutlich rascher aus als bei den Tieren, denen monomerer PAM-1 verabreicht wurde. Darüberhinaus ließen sich Effekte wie Tumor-Regression sowie reduzierte Infiltrationstendenz des Tumors nachweisen. Per cell death Detection ELISA konnte zudem Apoptose als der der Inhibition der Zellproliferation zugrundeliegende Mechanismus identifiziert werden (46).

Gegenstand dieser Arbeit ist es, die Vorgänge, die durch monomeren PAM-1 / CFR-1 in der Zelle induziert werden, anhand von Proteinphosphorylierungen näher zu charakterisieren.

Proteinphosphorylierungen sind essentielle Vorgänge in der durch Wachstumsrezeptoren beeinflussten Kinetik der (Säugetier-)Zellproliferation.

Deshalb wurden die durch (monomeren) PAM-1 / CFR-1 induzierten Veränderungen im Phosphotyrosin-, -serin- sowie -threoninmuster untersucht sowie versucht, entsprechende Proteine, die Veränderungen im Phosphorylierungsmuster erfuhren, zu lokalisieren.

Weiterhin wurde am Beispiel der Tyrosinphosphorylierungen untersucht, wie sich die selektive Hemmung eben der Tyrosinkinase durch Genistein auf die Zellproliferation auswirkt und somit welche Funktion dieser Phosphorylierung durch die Induktion durch PAM-1 / CFR-1 zukommt.

Hierbei zeigten sich nach Inkubation von Magenkarzinomzellen der Zellreihe 23132 mit PAM-1 signifikante Anstiege der Tyrosinphosphorylierungen bei 60, 70 und 80

kDa – Proteinen (s. Abb. 3), der Serinphosphorylierungen bei 70 und 80 kDa – Proteinen (s. Abb. 4) sowie eine Abnahme der Threoninphosphorylierungen bei 85 kDa – Proteinen (s. Abb. 5).

Die 70 kDa – Proteine, die PAM-1-induziert Zunahmen der Tyrosin- und Serinphosphorylierungen aufwiesen, konnten in beiden Fällen im Cytosol lokalisiert werden (s. Abb. 6 u. 7).

Nach selektiver Hemmung der Tyrosinkinase durch Genistein, einem z.B. in Sojabohnen enthaltenen Extrakt, zeigten die untersuchten Magenkarzinomzellen eine Inhibition der Zellproliferation, ein Effekt, der bereits 1993 beschrieben wurde (62). Im weiteren wurde die Aktivierung von EGF-Rezeptor-assoziierten Tyrosinkinase am Beispiel colorectaler Tumoren als ein frühes Zeichen einer malignen Transformation interpretiert (63).

Durch Zugabe von PAM-1 zu den steigenden Genistein-Konzentrationen (s. Abb. 8) ließ sich kein zusätzlicher antiproliferativer Effekt erzeugen, allerdings zeigte sich ab einer Genistein-Konzentration von etwa 13 µg/ml eine Abschwächung des antiproliferativen Genistein – Effekts unter dem Einfluß von PAM-1.

Zudem konnte per Western-Blot dargestellt werden, dass auch die Tyrosinphosphorylierungen, die durch Kontakt von PAM-1 mit Zellen der Zellreihe 23132 induziert werden, durch Genistein gehemmt werden (s. Abb. 9 a/b).

Die durch Inkubation mit PAM-1 ausgelösten Serinphosphorylierungen zeigen sich unter dem Einfluß von Genistein unbeeinflusst (s. Abb. 10 a/b).

Im Vergleich zu Genistein, wodurch Tyrosinkinase ja gehemmt werden, um eine Inhibition der Zellproliferation zu erreichen, ließen sich durch PAM-1 Tyrosinphosphorylierungen nachweisen. Wie oben beschrieben stellt die Aktivierung der EGF-Rezeptor-assoziierten Tyrosinkinase am Beispiel colorectaler Tumoren ein early sign der malignen Transformation dar (63), könnte somit also auch als eine Art Proliferationsmarker interpretiert werden. Somit müsste deren Inaktivierung – wie hier durch Genistein – einen antiproliferativen Effekt haben, der, wie oben gezeigt in einem bestimmten Bereich sogar eine Dosisabhängigkeit hat. Dass über diesen Dosen kein weiterer Effekt zu erzielen ist, könnte als eine Art Sättigung interpretiert werden.

Dass durch Genistein nach niedrig-dosierter Zugabe zu PAM-1 kein additiver inhibitorischer Effekt auf das Wachstum der Magenkarzinomzellen zu erzielen war, erklärt sich dadurch, dass hierbei zwar wohl nur die Rezeptor-assoziierten Tyrosinkinasen inhibiert werden, der Rezeptor aber ohnehin schon durch PAM-1 „geblockt“ ist.

Die durch PAM-1 induzierten Tyrosinphosphorylierungen ließen sich wie dargestellt an einem im Cytosol lokalisiertem Protein nachweisen, nicht wie im Falle der Rezeptor-assoziierten Tyrosinkinasen (RTK) membrangebunden.

Dass wie oben beschrieben ab einer Genistein-Dosis von 13 µg/ml eine Abschwächung der PAM-1 – Wirkung eintritt, könnte bedeuten, dass ab dieser Konzentration auch die PAM-1 induzierten Tyrosinphosphorylierungen im Cytosol gehemmt werden. Schließlich wurde für den in Abb. 7 b dargestellten Western-Blot, der die Phosphorylierungen im Tyrosinmuster nach Vorinkubation mit Genistein darstellt, eine Genisteinkonzentration von 14 µg/ml verwendet.

Die PAM-1 – induzierten Zunahmen im Serinphosphorylierungsmuster von ebenfalls im Cytosol lokalisierten 70 kDa – Proteinen (s. Abb. 4 bzw. 7) zeigten sich wie beschrieben von Genistein unbeeinflusst (s. Abb. 10 a/b), eine gegenseitige Beeinflussung der Veränderungen im Phosphotyrosin- und -serinmuster erscheint somit unwahrscheinlich. Davon unabhängig handelt es sich bei dem beschriebenen Protein möglicherweise um ein und dasselbe.

Anders als beispielsweise bei dem humanen, monoklonalen IgM SC-1, bei dem die Intaktheit seiner pentameren Struktur wie unter 1.4.3 beschrieben Voraussetzung für die durch ihn an Magenkarzinomzellen induzierte Apoptose ist, vermag PAM-1 gerade in seiner monomeren Struktur – also offensichtlich ohne cross-linking an CFR-1 – Apoptose einzuleiten.

Dies wiederum legt nahe, dass der Rezeptor durch die dadurch besetzten Epitope nicht mehr seiner eigentlichen, nämlich wachstumsfördernden Wirkung nachkommt, sondern dass die entsprechende Zelle mit dem nun „stillgelegten“ Rezeptor schlichtweg den Hungertod stirbt.

Somit ist der durch PAM-1/CFR-1 induzierte Zelltod nicht Folge der Aktivierung von CFR-1, sondern Folge der durch den besetzten Wachstumsrezeptor ausgelösten me-

tabolischen Störung.

Wie bereits unter 1.1 genannt ist dies eine Form der Todes-Domänen-unabhängigen Apoptose, in diesem Fall mit dem Stressfaktor „Hungern“ (5-7).

Zur Sonderform wird diese Art der Apoptose dadurch, dass dieser Stress nicht unspezifisch und unkontrolliert verursacht ist – wovon ja schließlich alle Zellen, und somit auch gesunde, betroffen wären – sondern spezifisch die Zellen betrifft, deren Ziel PAM-1 ist, weil nur dort CFR-1 (über)exprimiert wird, nämlich auf nahezu allen epithelialen Karzinomen und deren Vorläuferläsionen (27,55).

Was man von dieser Todes-Domänen-unabhängigen (2), in diesem Fall jedoch indirekt rezeptorabhängigen Apoptose weiß, ist, dass sie durch die Freisetzung von Cytochrom C aus Mitochondrien vermittelt wird, gefolgt von einem Cytochrom c/Apaf-1/procaspase-9-Komplex, der dann schließlich Effektorcaspasen aktiviert (8,9). Weiterhin haben wie bereits unter 1.1 beschrieben Überlebensproteine aus der Bcl-2 Familie hierbei eine zentrale Rolle (10).

Zusammenfassend lässt sich somit sagen, dass die genannten Voraussetzungen PAM-1 nicht nur als ein diagnostisches Instrument zur Erkennung von epithelialen Karzinomen nahezu jeglicher Art prädestinieren, sondern über die Apoptose-induzierende Wirkung eine zudem überaus spezifische therapeutische Waffe darstellen müsste, zumal toxische Effekte auf gesunde Zellen bisher nicht nachgewiesen wurden.

Gerade deshalb darf man auf die bislang noch ausstehenden, ersten klinischen Ergebnisse gespannt sein.

5. Zusammenfassung

Mittels humaner Hybridoma Technologie können wie beschrieben humane, tumorspezifische monoklonale IgM isoliert werden, die in der Lage sind, an Tumorzellen selektiv Apoptose zu induzieren (25,26,27,29,30,45,46).

Der Apoptose können hierbei verschiedene Mechanismen zugrunde liegen, im Falle des humanen, monoklonalen IgM PAM-1 vermutlich durch Stressinduktion, die schließlich zum programmierten Zelltod führt (64).

PAM-1 bindet hierbei an den post-transkriptionell modifizierten Rezeptor CFR-1, der auf fast allen epithelialen Karzinomen und deren Vorläuferläsionen, nicht jedoch auf gesundem Gewebe exprimiert ist (27,55).

Da Wachstumsrezeptoren wie auch FGFR jedoch unbedingt notwendig sind, um dem erhöhten Energiebedarf maligne entarteter Zellen Rechnung zu tragen, legt dies nahe, dass PAM-1 - auch ohne cross-linking am Rezeptor – CFR-1 „blockt“, wodurch die Tumorzelle verhungert (64).

In dieser Arbeit schließlich wurde die *in vitro* antiproliferative Wirkung von PAM-1 auf Magenkarzinomzellen zunächst nochmals dargestellt (s. Abb. 1 u. 2).

Da Protein(de)phosphorylierungen essentielle Vorgänge in der durch Wachstumsrezeptoren beeinflussten Kinetik der (Säugetier-)Zellproliferation sind, und Wachstumsfaktorrezeptoren wie EGFR oder FGFR (wie auch CFR-1) gerade an maligne entarteten Zellen eine große Rolle spielen, sollten zudem genau diese Vorgänge am Beispiel der PAM-1/CFR-1 induzierten Apoptose an Magenkarzinomzellen näher charakterisiert werden. Hierbei zeigten sich an Proteinen verschiedener Molekulargewichte Veränderungen im Phospho-Tyrosin-, -Serin- sowie -Threoninmuster (s. Abb. 3-5), wobei in den beiden letzten Fällen ein 70 kDa – Protein im Cytosol lokalisiert werden konnte (s. Abb. 6 u. 7). Dass durch Genistein, einem selektiven Inhibitor von Tyrosinphosphorylierungen, nach niedrig-dosierter Zugabe zu PAM-1 kein additiver inhibitorischer Effekt auf das Wachstum der Magenkarzinomzellen zu erzielen war, erklärt sich dadurch, dass hierbei wohl nur die Rezeptor-assoziierten Tyrosinkinase inhibiert werden, der Rezeptor aber ohnehin schon durch PAM-1 „geblockt“ ist. Dass in höher dosierter Genistein-Zugabe sogar eine Abschwächung der PAM-1-Wirkung eintritt, könnte darin begründet sein, dass dann auch die durch PAM-1 im Cyto-

sol ausgelösten Tyrosinphosphorylierungen gehemmt werden.

Da die PAM-1-induzierte Apoptose als eine Form des Todes-Domänen-unabhängigen programmierten Zelltods aufzufassen ist, die durch die Freisetzung von Cytochrom C aus Mitochondrien, gefolgt von einem Cytochrom c/Apaf-1/procaspase-9-Komplex vermittelt ist, der dann Effektorcaspasen aktiviert (8,9), sind die aufgeführten Proteinphosphorylierungen möglicherweise sogar essentielle Bestandteile dieser Kaskade.

PAM-1 müsste also somit unter den genannten Voraussetzungen das ideale diagnostische und vor allem therapeutische Mittel gegen epitheliale Karzinome sein, da toxische Wirkungen an Normalzellen eigentlich nicht auftreten dürften, weil CFR-1 dort nicht exprimiert wird.

5. Literatur

1. Kerr, J.F., Wyllie, A.H., Currie, A.R. *Apoptosis: A basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics*. Br J Cancer 1972, 26: 239.
2. Van Cruchten, S., van den Broeck, W. *Morphological and Biochemical aspects of apoptosis, oncosis and necrosis*. Anat Histol Embryol 2002, 31: 214-23.
3. Nagata, S. *Fas ligand: A death factor and its receptor*. Adv Immunol 1994, 57: 129-44.
4. Kitson, J., Raven, T., Jiang, Y.P. et al. *A death-domain-containing receptor that mediates apoptosis*. Nature 1996, 384: 372-5.
5. Slater, A.F., Stefan, C., Nobel, I., van den Dobbelsteen, D.J., Orrenius, S. *Signalling mechanisms and oxidative stress in apoptosis*. Toxicol Lett 1995, 82-83: 149-53.
6. Bosca, L., Hortelano, S. *Mechanisms of nitric oxide-dependent apoptosis: Involvement of mitochondrial mediators*. Cell signal 1999, 11: 239-44.
7. Ferri, K.F., Kroemer, G. *Organelle-specific initiation of cell-death pathways*. Nat Cell Biol 2001, 3: 255-63.
8. Liu, X., Kim, C.n., Yang, J., Jemmerson, R., Wang, X. *Induction of apoptotic program in cell-free extracts: Requirement for dATP and cytochrome c*. Cell 1996, 86: 147-57.
9. Li, P., Nijhawan, D., Budihardjo, I. et al. *Cytochrome c and dATP-dependent formation of Apaf-1/caspase-9 complex initiates an apoptotic protease cascade*. Cell 1997, 91 479-89.
10. Red, J.C. *Double identity for proteins of the Bcl-2 family*. Nature 1997, 387: 773-6.
11. Curtin, J.F., Cotter, T.G. *Live and let die: Regulatory mechanisms in Fas-mediated Apoptosis*. Cell signal 2003, 15:983-92.
12. Ogasawara, J., Watanabe-Fukunaga, R., Adachi, M. et al. *Lethal effect of the anti-Fas antibody in mice*. Nature 1993, 364: 806-9.
13. Nagata, S. *Apoptosis by death factor*. Cell 1997, 88: 355-65.
14. Ichikawa, K., Liu, W., Zhao, L. et al. *Tumoricidal activity of a novel anti-human DR5 monoclonal antibody without hepatocyte cytotoxicity*. Nat Med 2001, 7:

- 954-60.
15. Hu, W., Kavanagh, J.J. *Anticancer therapy targeting the apoptotic pathway*. *Lancet Oncol* 2003, 4: 721-9.
 16. Jo, M., Kim, T.h., Seol, D.W. et al. *Apoptosis induced in normal human hepatocytes by tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand*. *Nat Med* 2000, 6: 564-7.
 17. Trauth, B.C., Klas, C., Peters, A.M. et al. *Monoclonal antibody-mediated tumor regression by induction of apoptosis*. *Science* 1989, 245: 301-5.
 18. Scaffidi, C., Fulda, S., Srinivasan, A. Et al. *Two CD95 (APO-1/Fas) signaling pathways*. *Embo J* 1998, 17: 1675-87.
 19. Findley, H.W., Zhou, M. *The clinical significance of Fas expression in leukemia: Questions and controversies*. *Leukemia* 1999, 13: 147-9.
 20. Maloney, D.G., Grillo-Lopez, A.J., Bodkin, D.J. et al. *IDEC C2B8: Results of a phase I multiple-dose trial in patients with relapsed non-Hodgkin's lymphoma*. *J Clin Oncol* 1997; 15: 3266-74.
 21. Cheson, B.D. *Hematologic malignancies: New developments and future treatments*. *Semin Oncol* 2002, 29: 33-45.
 22. Ludwig, D.L., Pereira, D.S., Zhu, Z., Hicklin D.J., Bohlen, P. *Monoclonal antibody therapeutics and apoptosis*. *Oncogene* 2003, 22: 9097-106.
 23. Goodman, G.E., Hellstrom, I., Brodzinsky, L. et al. *Phase I trial of murine monoclonal antibody L6 in breast, colon, ovarian and lung cancer*. *J Clin Oncol* 1990, 8: 1083-92.
 24. Valerius, T., Stockmeyer, B., van Sriel, A.B. et al. *Fc α R1 (CD89) as a novel trigger molecule for bispecific antibody therapy*. *Blood* 1997, 90: 4485-92.
 25. Brändlein, S., Pohle, T., Ruoff, N. et al. *Natural IgM antibodies and immunosurveillance mechanisms against epithelial cancer cells in humans*. *Cancer Res* 2003, 63: 7995-8005.
 26. Hensel, F., Hermann, R., Schubert, C. et al. *Characterisation of glycosylphosphatidylinositol-linked molecule CD55/decay-accelerating factor as the receptor for antibody SC-1 induced apoptosis*. *Cancer Res* 1999, 59: 5299-306.
 27. Hensel, F., Brändlein, S., Eck, M. et al. *A novel proliferation-associated variant of*

- of CFR-1 defined by a human monoclonal antibody. Lab invest* 2001, 81: 1097-108.
28. Vollmers, H.P., O'Connor, R., Müller, J., Kirchner, T., Müller-Hermelink, H.K. *SC-1, a functional human monoclonal antibody against autologous stomach carcinoma cells. Cancer Res* 1989, 49: 2471-6.
29. Brändlein, S., Lorenz, J., Ruoff, N. et al. *Human monoclonal IgM antibodies with apoptotic activity isolated from cancer patients. Hum Antibodies* 2002, 11: 107-19.
30. Hensel, F., Hermann, R., Brändlein, S. et al. *Regulation of the new coexpressed CD55 (decay-accelerating-factor) receptor on stomach carcinoma cells involved in antibody SC-1 induced apoptosis. Lab Invest* 2001, 81: 1553-63.
31. Vollmers, H.P., Dämmrich, J., Ribbert, H., Wozniak, E., Müller-Hermelink, H.K. *Apoptosis of stomach carcinoma cells induced by a human monoclonal antibody. Cancer* 1995, 76: 550-8.
32. Ollert, M.W., David, K., Schmitt, C. et al. *Normal human serum contains a natural IgM antibody cytotoxic for human neuroblastoma cells. Proc Natl Acad Sci U S A* 1996, 93: 4498-503.
33. David, K., Ollert, M.W., Vollmert, C. et al. *Human natural immunoglobulin M antibodies induce apoptosis of human neuroblastoma cells by binding to a Mr 260.000 antigen. Cancer Res* 1999, 59: 3768-75.
34. Boes, M. *Role of natural and immune IgM antibodies in immune responses. Mol Immunol* 2000, 37: 1141-9.
35. Littlefield, J. *Selection of hybrids from matings of fibroblasts in vitro and their presumed recombinants. Science* 1964, 145: 709-11.
36. Littlefield, J.W. *The use of drug-resistant markers to study the hybridization of mouse fibroblasts. Exp Cell Res* 1966, 41: 190-6.
37. Kohler, G., Milstein, C. *Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. Nature* 1975, 256: 495-7.
38. Galfree, G., Howe, S.C., Milstein, C., Butcher, C.W., Howard, J.C. *Antibodies to major histocompatibility antigens produced by hybrid cell lines. Nature* 1977, 266: 550-2.
39. von Mehren, M., Weiner, L.M. *Monoclonal antibody-based therapy. Curr Opin On-*

- col 1996, 8: 493-8.
40. Dickman, S. *Antibodies stage a comeback in cancer treatment*. Science 1998, 280: 1196-7.
 41. McNeil, C. *Monoclonal antibodies progress to the next generation*. J Natl Cancer Inst 1995, 87: 1738-9.
 42. Hall, S.S. *Monoclonal antibodies at age 20: Promise at last ?* Science 1995, 270: 915-6.
 43. Houghton, A.N., Scheinberg, D.A. *Monoclonal antibody therapies – a `constant` threat to cancer*. Nat Med, 2000, 6: 373-4.
 44. Pohle T., Brändlein, S., Ruoff, N., Müller-Hermelink, H.K., Vollmers, H.P. *Lipoptosis: tumor-specific cell death by antibody-induced intracellular lipid accumulation*. Cancer Res 2004, 64: 3900-6.
 45. Brändlein, S., Vollmers, H.P. *Natural IgM antibodies, the ignored weapons in tumor immunity*. Histol Histopathol 2004, 19: 897-905.
 46. Brändlein, S., Pohle, T., Vollmers C. et al. *CFR-1 receptor as target for tumor-specific apoptosis induced by the natural human monoclonal antibody PAM-1*. Oncol Rep 2004, 11: 777-84.
 47. Davis, L.S., Patel, S.S., Atkinson, J.P., Lipsky, P.E. *Decay-accelerating factor functions as a signal transducing molecule for human T cells*. J Immunol 1988, 141: 2246-52.
 48. Kuraya, M., Fujita, T. *Signal transduction via a protein associated with a glycosylphosphatidylinositol-anchored protein, decay-accelerating factor (DAF/CD55)*. Int Immunol 1998, 10: 473-80.
 49. Vollmers, H.P., Dämmrich, J., Hensel, F. et al. *Differential expression of apoptosis receptors on diffuse and intestinal type stomach carcinoma*. Cancer 1997, 79: 433-40.
 50. Vollmers, H.P., Hensel, F., Hermann, R. et al. *Tumor-specific apoptosis by the human monoclonal antibody SC-1: A new therapeutical approach for stomach cancer*. Oncol Rep 1998, 5: 35-40.
 51. Vollmers, H.P., Zimmermann, U., Krenn, V. et al. *Adjuvant therapy for gastric adenocarcinoma with the apoptosis-inducing human monoclonal antibody SC-1: First clinical and histopathological results*. Oncol Rep 1998, 5: 549-52.

52. Hermann, R., Hensel, F., Muller, E.C. et al. *Deactivation of regulatory proteins hnRNP A1 and A2 during SC-1 induced apoptosis*. Hum Antibodies 2001, 10: 83-90.
53. Vollmers, H.P., Dämmrich, J., Ribbert, H. et al. *Human monoclonal antibodies from stomach carcinoma patients react with Helicobacter pylori and stimulate stomach cancer cells in vitro*. Cancer 1994, 74: 1525-32.
54. Burrus, L.W., Zuber, M.E., Lueddecke, B.A., Olwin, B.B. *Identification of a cysteine-rich receptor for fibroblast growth factors*. Mol Cell Biol 1992, 12: 5600-9.
55. Brändlein, S., Beyer, I., Ech, M. Et al. *CFR-1, a new marker for precancerous epithelial lesions defined by the human monoclonal antibody PAM-1*. Cancer Res 2003, 63: 2052-61.
56. Vollmers, H.P., Stulle, K., Dämmrich, J., Pfaff, M., Papadopoulos, T., Betz, C., Saal, K., Muller-Hermelink, H.K. *Characterization of four new gastric cancer cell lines*. Virchows Arch B Cell Pathol Incl Mol Pathol 1993, 63(6):335-43.
57. Mosmann, T. *Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays*. J Immunol Methods 1983, 65(1-2):55-63.
58. Carmichael, J., DeGraff, W.G., Gazdar, A.F., Minna, J.D., Mitchell, J.B. *Evaluation of a tetrazolium-based semiautomated colorimetric assay: assessment of chemosensitivity testing*. Cancer Res, 1987, 47(4):936-42.
59. Smith, P.K., Krohn, R.I., Hermanson, G.T., Mallia, A.K., Gartner, F.H., Provenzano, M.D., Fujimoto E.K., Goeke, N.M., Olson, B.J., Klenk, D.C. *Measurement of protein using bicinchoninic acid*. Anal Biochem 1987, 163(1):279.
60. Bradford MM. *A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding*. Anal Biochem. 1976, 72:248-54.
61. Towbin, H., Staehelin, T., Gordon, J. *Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications*. 1979. Biotechnology 1992, 24:145-9.
62. Piontek, M., Hengels, K.J., Porschen, R., Strohmeyer, G. *Antiproliferative effect of tyrosin kinase inhibitors in epidermal growth factor-stimulated growth of human gastric cancer cells*. Anticancer Res 1993,13: 2119-2123.
63. Malecka-Panas, E., Kordek, R., Biernat, W., Tureaud, J., Liberski, P.P., Majum-

dar, A.P. *Differential activation of total and EGF receptor tyrosine kinase in the rectal mucosa in patients with adenomatous polyps, ulcerative colitis and colon cancer.* Hepatogastroenterology 1997, 44: 435-40.

64. Vollmers, H.P., Brändlein, S. *Death by Stress: Natural IgM-induced Apoptosis.* Methods Find Exp Clin Pharmacol 2005, 27(3): 1-7.

Lebenslauf

Joachim Wirth, geb. am 29.07.1974 in Münnerstadt

Vater: Hubert Wirth, geb. am 01.10.1950

Mutter: Theresia Wirth, geb. am 11.05.1949

Geschwister: 2 Brüder, 33 und 35 Jahre alt

Schulbildung: 1980 - 82 Grundschule Münnerstadt
1982 - 84 Grundschule Burkardroth
1984/85 Hauptschule Brendlorenzen
1985 – 94 Gymnasium Bad Neustadt
1994 Allgemeine Hochschulreife

Zivildienst: 11/94 – 02/96 im Kreiskrankenhaus Bad Neustadt, Pflegedienst
auf Internist. Station

Studium: 05/96 Beginn Studium der Humanmedizin an der Julius-
Maximilians Universität Würzburg
03/98 Physikum
03/99 1. Staatsexamen
09/01 2. Staatsexamen
11/02 3. Staatsexamen

Praktisches Jahr: 1. Terial (22.10.01 – 10.02.02): Innere Medizin am Leopoldina-
Krankenhaus in Schweinfurt
2. Terial (01.03.02 – 20.06.02): Chirurgie am Universitätsspital
Zürich
3. Terial (21.06.02 – 10.10.02): Pädiatrie am Klinikum Coburg

AIP: 01.01.03 – 30.06.04 an der Herz – und Gefäßklinik Bad
Neustadt in der Abt. für **Kardiologie**

Assistenz:

seit 01.07.04 am St-Elisabeth Krankenhaus in Bad Kissingen,
Innere Medizin

Bad Kissingen,

04.11.05

