

Aus dem Pathologischen Institut

der Universität Würzburg

Vorstand: Professor Dr. med. H.K. Müller-Hermelink

Tumorthherapie mit Cocktails aus humanen monoklonalen Antikörpern

Inaugural - Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde der

Medizinischen Fakultät

der

Julius-Maximilians-Universität Würzburg

vorgelegt von

Leo Rasche

aus Berlin

Würzburg, Dezember 2008

Referent: Professor Dr. rer. nat. Dr. med. H.P. Vollmers

Koreferent: Professor Dr. rer. nat. K. Ullrichs

Dekan: Professor Dr. med. M. Frosch

Tag der mündlichen Prüfung : 25.03.2009

Der Promovend ist Arzt

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Neue Strategien in der Onkologie	1
1.2	Monoklonale Antikörper	2
1.3	Humane monoklonale Antikörper	4
1.4	Ziel der Arbeit	5
2	Material und Methoden	6
2.1	Material	6
2.1.1	Puffer, Lösungen und Medien	6
2.1.2	Chemikalien und Antikörper	6
2.1.3	Verwendete humane monoklonale Antikörper	7
2.1.4	Zelllinien	8
2.1.5	Häufig verwendete Verbrauchsmaterialien und Laborgeräte	8
2.1.6	Software	9
2.2	Methoden der Zellbiologie	9
2.2.1	Zellkultur	9
2.2.2	Zellviabilitätsbestimmung	9
2.2.2.1	Remnant-Viabilitäts Test	9
2.2.2.2	Proliferationstest (MTT-Assay)	10
2.2.3	Antikörper Depletion	11
2.3	Durchflusszytometrie (FACS-Analyse)	11
2.3.1	Apoptose Detektion durch Propidiumiodidfärbung	11
2.3.2	Bindung	12

2.4.	Methoden der Immunfluoreszenz	13
2.4.1	Antikörperkonjugation mit FITC/ Orange reactive 548	13
2.4.2	Endozytose	13
2.4.3	Bindung kombinierter Antikörper/ Doppelfärbung	13
2.5	Imaging als Apoptosenachweis	13
2.5.1	Hanging Drops	13
2.5.2	Herstellung von Zellkulturen in 3D Kollagenmatrices	14
2.5.3	Zeitraffervideomikroskopie	14
3.	Ergebnisse	15
3.1	Apoptose Sequenz	15
3.2	DNA Fragmentierung	16
3.3	Endozytose	17
3.4	Immunfluoreszenz/ Doppelfärbung	20
3.5	Vorbemerkung zum Arbeiten mit Hybridom-Überständen	22
3.6	Cocktails mit humanen Antikörpern	23
3.7	5-Fluorouracil und humane Antikörper	26
3.8	FACS Analysen mit 5-FU vorbehandelten Zellen und humanen Antikörpern	28
4.	Diskussion	30
4.1	Apoptose durch humane Antikörper	31
4.2	Cocktails mit humanen Antikörpern	34
5.	Zusammenfassung	42
6.	Literaturverzeichnis	43
7.	Abkürzungsverzeichnis	54
	Danksagung	
	Lebenslauf	

1. Einleitung

1.1 Neue Strategien in der Onkologie

Mit über 420.000 Neuerkrankungen und mehr als 200.000 Todesfällen pro Jahr stellen Krebserkrankungen die bedeutendste Todesursache zwischen dem 30. und 60. Lebensjahr dar (Statistisches Bundesamt, 2005; RKI, 2006). Diese Zahlen gelten für Deutschland und führen dramatisch vor Augen, wie unzureichend die aktuelle Krebstherapie ist und wie notwendig neue Strategien und Konzepte für die Onkologie sind.

Während die konventionelle Onkologie sich vornehmlich auf die drei Säulen Chirurgie, Bestrahlung und Chemotherapie stützt, rücken zunehmend die Erkenntnisse der Tumorbio­logie in den Mittelpunkt therapeutischer Überlegungen, die eine zielgerichtete Therapie von malignen Zellen ermöglichen sollen. Diese „Targeted Therapy“ soll effizienter und bekömmlicher sein als die etablierten Zytostatika-Regime, da sie exklusiv die Tumorzellen bekämpfen will.

Hintergrund für diese Entwicklung ist die Identifizierung einiger Zielstrukturen, die transformierte Zellen vom Normalgewebe unterscheiden und sich zur therapeutischen Intervention anbieten. Diese können sich sowohl auf der Membran als auch intrazellulär befinden.

Ist ersteres der Fall, so besteht die Möglichkeit monoklonale Antikörper zu generieren und sie anschließend im Sinne einer passiven Immunisierung dem Patienten zu verabreichen. Diese binden dann an die Tumorzellen und führen zu einer Interaktion, die im Idealfall zum Zelltod führt. Antikörper sind dabei die Klassiker der Targeted Therapy und sind seit Jahren erfolgreich im Einsatz.

Im zweiten Fall handelt es sich vor allem um Abberationen in der Signaltransduktion von Wachstumsrezeptoren, die als Zielstruktur in Frage kommen. Krebszellen sind unabhängig von endokrinen und parakrinen Wachstumssignalen, deshalb können sie unkontrolliert wachsen und überleben (Hanahan und Weinberg, 2000). So erklären sich die Mutationen, die man an Tyrosinkinasen und vielen weiteren an der Signaltransduktion beteiligten Proteinen findet. Sie ermöglichen einen ständigen Proliferationsstimulus auch ohne Wachstumsfaktor. Als gutes Beispiel kann hier das Krankheitsbild der Chronisch Myeloischen Leukämie (CML) dienen: Durch die in über 90% der Patienten anzutreffende Translokation t(9,22) wird hier ein Fusionsgen gebildet, das für eine Tyrosinkinase kodiert, die als autokriner Wachstumsfaktor für die Krankheit verantwortlich ist. Diese sog. BCR-ABL Proteinkinase ist Ziel des Wirkstoffs Imatinib. Er gehört zur Substanzklasse der „small molecules“ und inhibiert relativ

unspezifisch dieses transformierte Enzym (Giles et al., 2005). Imatinib ist hochwirksam, so dass in der IRIS- Studie nach 4 Jahren immer noch 98% aller Patienten eine komplette hämatologische Remission zeigen (Kammerer, 2006).

Doch solche Erfolge lassen sich nur bei Tumoren erzielen, die ausschließlich auf einen einzigen veränderten Signalweg angewiesen sind. Leider gibt es mit Ausnahme der seltenen gastrointestinalen Stromatumoren (GIST) keinen einzigen soliden Tumor, der solch eine Achillesferse aufzeigen würde (Broxterman und Georgopapadakou, 2005). Dazu kommt noch die ausgeprägte genetische Instabilität von Tumorzellen (Hanahan und Weinberg, 2000), die zur Resistenz gegenüber der „small molecules“/ Tyrosinkinaseinhibitoren führen kann.

Allerdings zeigen aktuelle Studien, dass es auch bei soliden Tumoren innerhalb einer Tumorentität Subgruppen gibt, die vom Einsatz bestimmter Inhibitoren profitieren können (Tsao et al., 2005). Eine weitere Strategie ist es, Kinaseinhibitoren zu entwickeln, die ein ganzes Spektrum an Onkoproteinen blockieren können. Diese „multi-targeted therapy“ feiert derzeit die ersten großen Erfolge (Branca, 2005; Rini, 2006).

Analog zu dieser Entwicklung werden mittlerweile auch Antikörper kombiniert und in Studien getestet. Erste Zwischenergebnisse zeigen eine ausgeprägte Überlegenheit der Kombinationen gegenüber den Monosubstanzen mit einer Verdopplung der Ansprechrate und verlängertem progressionsfreien Intervall (Chung und Saltz, 2005). Die Zukunft wird eine Vielzahl an neuen zielgerichteten Tumortherapeutika bringen, die eines Tages ebenfalls zur Kombination bereit stehen werden. Wenn die Nebenwirkungen kontrollierbar bleiben, könnte das ein entscheidender Schritt zu einer neuen Wirksamkeit in der Onkologie werden.

1.2 Monoklonale Antikörper

Monoklonale Antikörper sind als Substanzgruppe in der Onkologie längst etabliert. Seit 1998 wurden in Deutschland acht Antikörper zur Behandlung von verschiedenen hämatologischen und soliden Tumoren zugelassen. Durch ihren Einsatz hat sich die therapeutische Situation für einige Tumore entscheidend verbessert. Antikörper können hier das Ansprechen verbessern (Chung und Saltz, 2005), Zellen für Chemo- und Strahlentherapie sensibilisieren (Carter, 2006), Angiogenese inhibieren (de Castro Junior et al., 2006) und dadurch die Lebenszeit verlängern wie sogar in seltenen Fällen heilen (Thuro-Schöffel, 2006).

Dennoch bleiben für die Zukunft dieser neuen Substanzen einige Herausforderungen bestehen. Dabei ist die Identifizierung neuer Zielstrukturen entscheidend. Die Auswahl etablierter Targets ist nicht nur bescheiden (siehe **Tabelle 1**), sondern auch mitnichten tumorspezifisch. CD 20 zum Beispiel ist als Differenzierungsantigen auf allen B- Zellen

vorhanden. Andere Tumorantigene wie Her2/neu für das Mammakarzinom oder der EGF-Rezeptor für das Kolonkarzinom sind in Tumorzellen zwar überexprimiert, befinden sich aber auch auf gesunden Zellen. Sie werden dem zu Folge auch nur als tumorassoziierte Antigene bezeichnet.

Tumorspezifische Antigene zu finden, gestaltet sich schwierig. Dem zu Grunde liegen methodische Mängel. Antikörper wurden nämlich vor allem durch das Immunisieren von Mäusen generiert, das heißt, sie sind murinen Ursprungs. Daraus ergeben sich drei Problemfelder. Erstens: Murine Antikörper sind für das menschliche Immunsystem fremdes Protein. Dies hat die Eliminierung aus dem Organismus zur Folge. Eine besondere Rolle dabei scheinen menschliche Anti- Maus Antikörper (HAMAs, human anti-mouse antibodies) zu spielen. Sie können murine Antikörper binden und damit ihre Bioverfügbarkeit reduzieren. Gleichzeitig wird aber auch ein anti- Tumor Effekt diskutiert (Khazaeli et al., 1994; Mirick et al., 2004). Zum zweiten Problemfeld gehören allergische Reaktionen, die von harmlosen grippeähnlichen Symptomen bis hin zu schweren anaphylaktischen Schockzuständen reichen können. Abhilfe brachte die Gentechnik, mit deren Hilfe das tierische Protein der Antikörper durch menschliches ersetzt werden konnte. Das Ergebnis sind chimäre (66% menschlich) und humanisierte (90% menschlich) Antikörper.

Tabelle 1: In Deutschland zugelassene Antikörper zur Krebstherapie (Stand 4/2007))

Generika Name	Format	Target	Indikation
<i>Unkonjugierte Antikörper</i>			
Rituximab	chimärisiert, IgG1	CD 20	NHL
Trastuzumab	humanisiert, IgG1	Her2/neu	Her2/neu+ Brustkrebs
Alemtuzumab	humanisiert, IgG1	CD 52	CLL
Cetuximab	chimärisiert, IgG1	EGFR	metastasiertes kolorektales Karzinom
Bevacizumab	humanisiert, IgG1	VEGF	metastasiertes kolorektales Karzinom
<i>Konjugierte Antikörper</i>			
Ibritumomab tiuxetan	murin, IgG1	CD 20	NHL
¹³¹ I-tositumomab	murin, IgG2a	CD 20	NHL
Gemtuzumab	humanisiert, IgG4	CD 33	CD 33+ AML

Als drittes Problemfeld bleiben die durch Maus-Immunisierung gewonnenen Targets bestehen. Da die Unterschiede zwischen gesunden und transformierten Zellen gering sind (Prendergast, 2004), wird das Immunsystem einer Maus nach Konfrontation mit menschlichen Tumorzellfragmenten vor allem eine Immunantwort induzieren, die gegen das artfremde, menschliche Protein gerichtet ist. Im besten Fall erhält man so Antikörper gegen

stark überexprimierte, tumorassoziierte Antigene. Membranständige, tumorspezifische Antigene ließen sich durch Mausimmunisierung noch nicht identifizieren. (Vollmers und Brändlein, 2005)

Die Zukunft der monoklonalen Antikörper liegt wegen der besseren Verträglichkeit, längeren Halbwertszeit und der exakteren Spezifität daher in der Herstellung rein humaner Antikörper. (Vollmers und Brändlein, 2006a; Vollmers und Brändlein, 2005)

1.3 Humane monoklonale Antikörper

Das aktive Immunisieren von gesunden Menschen mit Tumorzellen verbietet sich aus ethischen Gründen. Dennoch existieren derzeit drei Methoden, vollständig humane Antikörper herzustellen. Zum einen stehen transgene Mäuse (HumAB-mice) zur Verfügung, die mit dem genetischen Bestand für humane Immunglobuline ausgestattet sind (Lonberg, 2005), zum anderen kann man mit Phagenbanken (phage display) auch ohne die Immunisierung von Versuchstieren vollständig humane Antikörper generieren (Boel et al., 2000; Huls et al., 1999).

In der dritten Methode unterstellt man, dass auch in Krebspatienten eine humorale Immunantwort auf Tumorzellen stattfindet. Die Antikörper produzierenden B-Zellen können aus Milzen, Lymphknoten oder dem Blut erkrankter Patienten isoliert und mit Hilfe der konventionellen Hybridomtechnik für menschliche Lymphozyten (Triomtechnik) immortalisiert werden (beschrieben in Vollmers et al., 1989). Diese Methode konnte als einzige bisher humane, tumorspezifische Antikörper liefern (Vollmers und Brändlein, 2006b; Vollmers und Brändlein, 2005).

Diese Immunglobuline sind in zweierlei Hinsicht interessant. Zum einen geben sie Einblicke in die menschliche Tumormunität (Brändlein et al., 2003b), zum anderen können sie selbst zur Diagnostik und Therapie maligner Erkrankungen eingesetzt werden (Brändlein et al., 2003a; Brändlein et al., 2004a).

Einige Eigenschaften haben humane tumorspezifische Antikörper gemeinsam: Sie werden von CD5 + B-Zellen gebildet und sind damit Produkt der natürlichen Immunität (Brändlein et al., 2003b). Sie sind vorwiegend vom IgM-Isotyp, wenngleich auch wenige IgGs identifiziert werden konnten. Ihre Targets sind modifizierte Karbohydrate der Glykokalix, die nur auf malignen Zellen exprimiert werden (Vollmers und Brändlein, 2005b). Nach ihrer Bindung lösen die Antikörper Apoptose aus, und zwar in vitro und in vivo (Brändlein et al., 2002; Brändlein und Vollmers, 2004; Illert et al., 2005a). Dabei benötigen sie weder Komplement noch Effektorzellen. Die molekularen Mechanismen der Apoptoseinduktion sind von

Antikörper zu Antikörper verschieden. Tumorzellen die mit dem humanen Antikörper SAM-6 behandelt wurden, zeigen beispielsweise eine intrazelluläre Akkumulation von Neutralfetten, die die Apoptose (sog. Lipoptose) der Zelle einleitet (Pohle et al., 2004). Als gemeinsamer Nenner kann das Auslösen von Stress gesehen werden (Vollmers und Brändlein, 2005a). Dabei spielen Mitochondrien eine wesentliche Rolle, die durch Freisetzung von Cytochrom c die endogene Apoptosekaskade starten und zur Eliminierung der Tumorzelle führen.

Dieses gezielte Beseitigen von Tumorzellen ist therapeutisch nutzbar und wurde exemplarisch für den humanen Antikörper SC-1 in einer Phase I/II-Studie demonstriert (Illert et al., 2005b; Timmermann et al., 2002; Vollmers et al., 2000). Die histomorphologische Evaluation zeigte bei 84% der Patienten eine Zunahme der Apoptose im Vergleich zum Zustand vor Antikörper-Gabe sowie eine Tumorregression in 60% der Patienten (Vollmers und Brändlein, 2005).

Neben dem großen klinischen Potential dieser Moleküle gibt die schlichte Existenz Apoptose-auslösender, tumorspezifischer Antikörper starke Hinweise auf das Zutreffen der Immunsurveillance-Theorie, die in den 70er Jahren etwa zeitgleich von Burnet und Thomas aufgestellt wurde (Burnet, 1970; Burnet, 1971; Thomas, 1982). Diese besagt, dass das Immunsystem neben infektiösen Erregern auch maligne Zellen erkennen kann und an deren Beseitigung beteiligt ist. Das gilt insbesondere, seitdem es gelang, tumorreaktive Antikörper auch in gesunden Spendern nachzuweisen. Sie könnten an einer frühen Immunantwort auf transformierte Zellen beteiligt sein und das Heranwachsen solider Tumore in vielen Fällen verhindern (Vollmers und Brändlein, 2005b; Vollmers und Brändlein, 2006b).

1.4 Ziel der Arbeit

Ziel der Arbeit ist es, aus einer Reihe von humanen Antikörpern, die am Würzburger Institut für Pathologie entwickelt wurden, sinnvolle Kombinationen zu bilden (sog. Cocktails) und diese hinsichtlich ihrer Zytotoxizität zu untersuchen. Des Weiteren sollen auch Kombinationen mit Zytostatika evaluiert werden. Die Untersuchungen sollen mit Hilfe von *in vitro* Tests auf verschiedenen Tumor- Zelllinien durchgeführt werden. Darüber hinaus sollen weitere Schritte in der Aufklärung der Apoptoseinduktion und der unterschiedlichen Wirkungsweisen der untersuchten Antikörper unternommen werden.

2. Material und Methoden

2.1 Material:

2.1.1 Puffer, Lösungen und Medien

PBS:	8 g NaCl 0,2 g KCl 1,15 g Na ₂ HPO ₄ ·2 H ₂ O 0,2 g KH ₂ PO ₄ 1 l A. bidest
Lyse-Puffer:	0,1 % Natriumcitrat 0,1 % Triton X-100
FACS-Puffer	1 x PBS 0,01% NaN ₃ (w/v) Lösung durch 0,1 µm Nitrozellulosemembran filtriert
BSA/PBS:	5 mg BSA (Albumin bovine, fraction V; Roth, Karlsruhe) / ml PBS
MTT-Reagenz:	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid (Sigma, Steinheim) 5 mg/ ml PBS
Trypanblau:	0,5% Trypanblau (Sigma, Steinheim) 0,9% NaCl
RPMI 1640:	Basismedium (500 ml) (PAA Laboratories, Linz/ Österreich) 1 % Glutamin (5 ml) 1 % Penicillin / Streptomycin (5 ml) 10 % FCS (Fetal Calf Serum) (50 ml) vor Gebrauch auf 37°C vorgewärmt
Trypsin/EDTA	PAA Laboratories, Linz/ Österreich

2.1.2 Chemikalien und Antikörper

Die Chemikalien und Antikörper wurden von folgenden Firmen bezogen:

5- FU (5-Fluorouracil)	Sigma
DMSO (Dimethylsulfoxid)	Merck, Darmstadt
Fluorescent orange 548 reactive	Fluka
Fluoro Tag TM Conjugation Kit	Sigma
Propidium Iodid	Sigma

RNaseA	Sigma
Chrom Pure Human IgM	Dako, Dänemark
Rabbit anti human IgM, FITC	Dako, Hamburg

2.1.3 Verwendete humane monoklonale Antikörper:

Alle in dieser Arbeit verwendeten Antikörper sind mit Hilfe der konventionellen Hybridom Technik (Köhler und Milstein, 1975) am Pathologischen Institut der Universität Würzburg entstanden. Sie wurden direkt aus den Milzen oder Lymphknoten von Tumorpatienten und gesunden Spendern isoliert, immortalisiert und hinsichtlich ihrer antitumoralen Eigenschaften selektioniert. Alle Antikörper sind vom IgM Typ und werden von CD5+ B - Zellen produziert, gehören also zur natürlichen Immunität.

Tabelle 2 : Übersicht der verwendeten humanen monoklonalen Antikörper

Name	Herkunft der Lymphozyten	Isotyp	Target	Spezifität	Funktion	
					In vitro	In vivo
LM-1	Lymphknoten, NSCLC	IgM	N-verknüpftes Karbohydrat	Karzinome	Apoptose	Regression
SAM-3	Milz, Magenkarzinom	IgM, κ	n. b.	Karzinome	Apoptose	n. b.
SAM-5	Milz, Magenkarzinom	IgM, λ	n. b.	Karzinome	Apoptose	n. b.
SAM-6	Milz, Magenkarzinom	IgM, λ	O-verknüpftes Karbohydrat	Karzinome	Lipoptose	Regression
PM-1	Milz, Pankreaskarzinom	IgM, λ	N-verknüpftes Karbohydrat	Karzinome	Apoptose	n. b..
PM-2			N-/O-verknüpftes Karbohydrat	Karzinome	Apoptose	n. b..
CM-1	Milz, Kolonkarzinom	IgM, λ	N-verknüpftes Karbohydrat	Karzinome	Apoptose	Regression
NORM-1	Milz, gesunder Spender	IgM, λ	n. b.	Karzinome	Apoptose	n. b..
NORM-2			N-/O-verknüpftes Karbohydrat	Karzinome	Apoptose	Regression

Die verwendeten Antikörper standen in folgender Konzentration bereit:

LM-1:	7,6 µg/ ml
SAM-3:	9,55 µg/ ml
SAM-5:	13,6 µg/ ml
SAM-6:	10 µg/ ml
PM-1:	30,8 µg/ ml
PM-2:	22,3 µg/ ml
CM-1:	9,7 µg/ ml
NORM-1:	11,6 µg/ ml
NORM-2:	42,4 µg/ ml

2.1.4 Zelllinien:

BxPC-3: Pankreas	Adenokarzinom, adhären wachsend,	Verdopplungszeit ca. 16h
HT29: Kolon	Adenokarzinom, adhären wachsend,	Verdopplungszeit ca. 40h

Die Kultivierung erfolgte in RPMI 1640 Medium/ 1 % Glutamin/1 % Penicillin/ Streptomycin/ 10 % FCS bei 37° und 8 % CO₂.

2.1.5 Häufig verwendete Verbrauchsmaterialien und Laborgeräte:

Aquabidest-Anlage Milli-Q Plus PF	Millipore, Eschborn
Brutschränke	Heraeus Thermotech, Hanau
ELISA-Reader	Bio-Rad, München
FACScan	BD Bioscience, San Jose, USA
FPLC	Pharmacia, Freiburg
Minifuge T	Heraeus, Hanau
Mikroskop Leica DMLB	Leica Mikrosystems, Wetzlar
Neubauer-Zählkammer	Hartenstein, Würzburg
pH-Meter pH 525	WTW, Weilheim i. OB
Photometer Uvikon 810	Kontron Instrument, Schweiz
Pipetten	Gilson, Middleton, USA
Pipettierhelfer accu-jet	Brand, Wertheim am Main
Sephadex Protein A Säule	Sigma
Sterilbank Lamin Air HLB 2448	Heraeus, Hanau
Vortex-Genie	Bender & Hobein, Zürich, Schweiz

Wasserbad, WB10

Memmert, Schwabach

Waage

Sartorius, Göttingen

Zentrifuge Biofuge 15R

Heraeus Sepatech, Osterode

2.1.6 Software

Für die graphische Darstellung wurden die Programme EXCEL, POWERPOINT und Adobe Photoshop verwendet. Zur FACS Analyse diente Lysis II, zur FACS Auswertung WinMDI 2.

2.2 Methoden der Zellbiologie

2.2.1 Zellkultur

Die Kultivierung von Tumorzelllinien erfolgte in RPMI 1640 Medium mit 10% FCS und den Supplementen L-Glutamin (20 mM) und Penicillin/Streptomycin (1%). Die Zellen wurden in Zellkulturflaschen bei 37°C und 8% CO₂ im Brutschrank inkubiert. Zur Subkultivierung wurden die Zellen mit 5 ml Trypsin/EDTA-Lösung vom Flaschenboden abgelöst, die Reaktion mit 10 ml Medium abgestoppt und die Zellen bei 1500 rpm 5 min zentrifugiert. Das Zellpellet wurde in frischem Medium aufgenommen und entsprechend verdünnt zurück in Zellkulturflaschen gegeben.

2.2.2 Zellviabilitätsbestimmung:

2.2.2.1 Remnant-Viabilitäts Test

Um antiproliferative Effekte kombinierter Antikörper zu untersuchen, wurde der Remnant-Viabilitäts Test gewählt. Das Prinzip dieser Methode beruht auf der Änderung der Zellzahl nach Behandlung mit Antikörpern im Vergleich zu einer Kontrolle.

Hierzu wurden 1ml einer auf 10⁶ Zellen pro Milliliter eingestellten Zellsuspension der Zelllinie BxPC-3 in die Näpfe einer sterilen 6 Well Platte gegeben und 4 Stunden im Brutschrank inkubiert, bis die Zellen am Boden der Näpfe adhären konnten. Anschließend wurde 1ml Antikörper-Überstand bzw. 1ml Medium als Kontrolle zu den Zellen gegeben, um anschließend mit einem weiteren Milliliter Medium auf das Zielvolumen von 3ml aufzufüllen. Bei Antikörperkombinationen wurde je 1ml des entsprechenden Antikörper-Überstands pro Napf zu den Zellen gegeben. Jeder Ansatz lag in doppelter Ausführung vor. Nach 48 Stunden Inkubation im Brutschrank bei 37°C und 8% CO₂ wurden die Zellen abgelöst und gezählt. Dazu wurde der Überstand aus einem Napf in ein 50ml Röhrchen pipettiert um tote oder nicht

adhärente Zellen beim späteren Zählen mit zu berücksichtigen. Dann wurden die Zellen mit 500µl Trypsin/EDTA abgelöst (37°, 10min) und mit 1ml frischem Medium versetzt und zu dem bereits gesammelten Überstand gegeben. Im Napf zurückbleibende Zellen wurden mit einem weiteren Milliliter Medium abgespült und ebenfalls gesammelt. Diese Zellsuspension wurde nun 5 min bei 1500 rpm zentrifugiert, das Zellpellet in 1ml frisches Medium aufgenommen und resuspendiert.

Zu letzt wurden die Zellen zur tot/ lebend Differenzierung mit Trypanblau gefärbt und mit Hilfe einer Neubauer Zählkammer gezählt. Trypanblau gehört zu den Azofarbstoffen und bindet zytosolische Proteine wodurch tote Zellen lichtmikroskopisch blau erscheinen, lebende hingegen ungefärbt bleiben (Luttmann, Mai, 2004; Phillips und Terryberry, 1957). Es wurden nur lebende Zellen gezählt. Hierzu wurden 20µl der Zellsuspension in 180µl Trypanblau gegeben und in die Zählkammer pipettiert. Es wurde darauf geachtet, dass die Zellsuspension gut durchmischt war, nicht zu hoch verdünnt wurde (ggf. anderer Verdünnungsfaktor berechnet) und die Zählkammer nicht überfüllt wurde.

2.2.2.2 Proliferationstest (MTT-Assay)

Um die Effekte einer Kombination von Antikörpern und dem Chemotherapeutikum 5-Fluorouracil zu untersuchen, wurde der MTT Test eingesetzt. Mit einem verhältnismäßig geringen eingesetzten Volumen (50µl) eignet sich diese Methode im besonderen Maße für die Untersuchung toxischer Reagenzien wie 5- FU.(Carmichael et al., 1987)

Das Prinzip dieser Methode beruht auf der Reduktion des gelben Tetrazoliumsalses (MTT) zur violetten Formazankristallen. Für diese Reaktion sind mitochondriale Dehydrogenasen verantwortlich. Diese Enzyme sind nur in vitalen Zellen aktiv, so dass die Reduktion von MTT zu Formazan als Maß für die Proliferation dienen kann.

Hierzu wurden 50 µl einer auf 2×10^5 eingestellten Zellsuspension in die Näpfe einer sterilen 96 Well Platte (flacher, transparenter Boden) pipettiert. Anschließend wurden 50µl einer entsprechend vorbereiteten 5-FU/ RPMI Lösung zu den Zellen gegeben, in den Endkonzentrationen von 5µg, 2µg und 1 µg 5-FU pro ml. Als Kontrolle wurde RPMI 1640 eingesetzt. Schließlich wurden die Zellen 24 Stunden bei 37°C und 8% CO₂ im Brutschrank inkubiert. Jeder Ansatz lag in vierfacher Ausführung vor. Nachdem der Überstand vorsichtig abgesaugt worden war, wurde der zu testende Antikörper/ Kontrolle (Chrompure IgM, Dianova, in der gleichen Konzentration) auf die Zellen gegeben und für weitere 24 und 48 Stunden bei 37°C und 8% CO₂ im Brutschrank inkubiert. Ausgewertet wurde indem 50 µl MTT Lösung (5 mg/ml MTT Pulver in PBS, steril filtriert) in jeden Napf gegeben, 30 min bei

37° inkubiert und dann die Platte bei 2800 rpm 10 min zentrifugiert wurde. Nachdem der Überstand vorsichtig abgesaugt worden war, wurde mit 150 µl DMSO pro Napf resuspendiert und die Farbintensität als Differenz der Absorption bei $\lambda = 540\text{nm}$ und $\lambda = 690\text{nm}$ mit Hilfe eines ELISA Readers gemessen.

2.2.3 Antikörper Depletion

Um die Vergleichbarkeit von Hybridom-Überständen und frischem Kulturmedium einzuschätzen, wurden Überstände der humanen Antikörper CM-1 und NORM-2 über eine Protein A Säule gereinigt und der antikörper-freie Durchlauf (nephelometrisch bestimmt) im Remnant-Viabilitäts Test hinsichtlich seiner Wirkung auf die Zellproliferation untersucht. Als Kontrolle diente RPMI 1640.

2.3 Durchflusszytometrie (FACS-Analyse)

Mit Hilfe eines Durchflusszytometers/ fluorescence-activated-cell-sorter (FACS) lassen sich Zellen, Partikel und deren gegebenenfalls vorhandene fluoreszenzmarkierte Marker detektieren. Dies geschieht durch einen Laser in einem komplexen optischen System, mit dessen Hilfe sich Aussagen über die Größe, Granularität und viele weitere Eigenschaften von Zellen treffen lassen.

2.3.1 Apoptose Detektion durch Propidiumiodidfärbung

Propidiumiodid (PI) interkaliert in doppelsträngige DNA und eignet sich zur Darstellung des DNA Gehalts einer Zelle. Zellen in der G₁-Phase des Zellzyklus weisen einen zweifachen Chromosomensatz (2n) auf, während Zellen nach erfolgter Mitose in G₂ vierfach ausgestattet sind (4n). Während des Vorgangs der Apoptose bauen verschiedene Enzyme die DNA ab, so dass Fragmente entstehen, die kleiner als 2n sind. Diese SubG₁ Fragmente sind spezifisch für Apoptose und lassen sich durchflusszytometrisch bestimmen. (Bertho et al., 2000; Darzynkiewicz et al., 1992; Darzynkiewicz et al., 2001; Tang et al., 2005a; Tang et al., 2005b)

Vorbereitung

Um die Eignung dieser Methode für humane Antikörper zu testen, wurde 1ml einer auf 5×10^5 Zellen eingestellten Zellsuspension der Zelllinie BxPC-3 in die Näpfe einer sterilen 6 Well Platte gegeben und mit 1ml unverdünntem SAM-6 Überstand im Brutschrank (37°C, 8%CO₂) stimuliert. Als Kontrolle wurde Chrompure IgM versetztes Medium verwendet. Es wurden über 5 Tage hinweg täglich Messungen vorgenommen. Dazu wurden die Zellen aus den Näpfen geerntet und zweimal mit kaltem FACS Puffer gewaschen (mit 500µl FACS

Puffer versetzte Zellen bei 1400 rpm zentrifugiert). Anschließend wurden die pelletierten Zellen direkt vor der Messung am FACS in 700µl fertigen Lyse Puffer (0,1% Natriumcitrat, 0,1% Triton X-100, 50µg/ml Propidiumiodid, 100µg/ml RNase, frisch zubereitet) auf Eis resuspendiert. Da die Zellen innerhalb von Minuten lysieren, sollte dies erst unmittelbar vor der Messung erfolgen.

FACS-Messung

Das Ausmaß der Apoptose wurde über die Anzahl der SubG₁ Fragmente im Fluoreszenzkanal 2 bestimmt. Dabei erfolgte die Darstellung linear. Pro Probe wurden 30.000 Ereignisse gemessen, die Zählung erfolgte ohne Einschränkung.

2.3.2 Bindung

Über das Bindungsverhalten einzelner Antikörper und deren Kombinationen an Karzinomzellen kann die Durchflußzytometrie ebenfalls Auskunft geben.

Vorbereitung der Zellen

Zellen wurden trypsinisiert, pelletiert (5min, 1500 rpm) und in frischem Medium zur Rekonstitution der Zellmembranen für 30min auf Eis gestellt. 2×10^5 Zellen wurden jeweils in ein FACS Röhrchen überführt und anschließend mit kaltem FACS Puffer gewaschen (500µl, 5 min, 1400 rpm) und mit den Primär-Antikörpern für 15 min auf Eis inkubiert (Gesamtvolumen 200 µl/ Röhrchen). Als Isotyp-Kontrolle diente Chrompure IgM. Nach der Inkubation wurden die Zellen abzentrifugiert, der Überstand verworfen und die Pellets mit 500 µl kaltem FACS-Puffer gewaschen. Danach erfolgte eine 15minütige lichtgeschützte Inkubation mit dem FITC gekoppelten Sekundär-Antikörper (Rabbit anti human IgM, FITC-gekoppelt, 1:50 in FACS-Puffer). Nach einem erneuten Waschgang wurden die Zellen in 200µl kaltem FACS-Puffer aufgenommen und bis zur Messung lichtgeschützt auf Eis aufbewahrt.

FACS-Messung

Die Bindung der humanen Antikörper wurde als Verschiebung zur Isotyp-Kontrolle auf Fluoreszenzkanal 1 gemessen. Die Darstellung erfolgte logarithmisch. Bei jeder Probe wurden 15.000 Zellen gemessen, die Zählung erfolgte ohne Einschränkung. Vgl. (Brändlein, 2003)

2.4. Methoden der Immunfluoreszenz:

2.4.1 Antikörperkonjugation mit FITC/ Orange reactive 548

Die Markierung von Antikörpern mit Fluorochromen erfolgte mit Hilfe des Fluoro Tag™ Conjugation Kit (Sigma) und dem Farbstoff Fluorescent orange 548 reactive (Fluka) nach den Angaben der Hersteller.

Zuerst wurden die gereinigten Antikörperlösungen (Konzentrationen zwischen 400µg/ml und 5mg/ml) mit Hilfe einer Sephadex G 25 Säule in 0,1 M Natriumbikarbonat Puffer (pH 9) überführt. Anschließend wurde für die FITC Konjugation 250µl Antikörperlösung mit 50µl einer FITC- Stammlösung (FITC in 2 ml 0,1M Natriumbikarbonat Puffer) versetzt und 2 Stunden lichtgeschützt auf dem Schüttler inkubiert. Für Fluorescent orange reactive wurde 1000µl Antikörperlösung mit 50µl Stammlösung (1mg Fluorescent orange reactive in 400µl Bikarbonat Puffer) versetzt und für eine Stunde auf dem Schüttler inkubiert. In einem letzten Schritt wurden freie Fluorochrome säulenchromatographisch mit Hilfe einer FPLC Anlage von den markierten Antikörpern abgetrennt.

2.4.2 Endozytose

10⁶ Zellen wurden trypsinisiert, pelletiert und in 500µl fluoreszenz-markierter Antikörperlösung aufgenommen und resuspendiert. Während die Zellen im Brutschrank (37°C, 8%CO₂) inkubiert wurden, wurde nach 30, 60 und 120min je 10µl der Suspension auf einen Objektträger ausgestrichen, trockenfixiert und mit einem konfokalen Mikroskop ausgewertet.

2.4.3 Bindung kombinierter Antikörper/ Doppelfärbung

10⁶ Zellen wurden trypsinisiert, pelletiert und in 1000µl fluoreszenz-markierter Antikörperlösung (500µl Antikörper A und 500µl Antikörper B) aufgenommen. Nach 60min Inkubation auf Eis wurden ungebundene Antikörper durch Zentrifugieren (5min, 1500rpm) abgetrennt, die Zellen in 1000µl PBS aufgenommen und je 10µl der Suspension auf einen Objektträger ausgestrichen, trockenfixiert und mit einem konfokalen Mikroskop ausgewertet.

2.5 Imaging als Apoptosenachweis

2.5.1 Hanging Drops

Als dreidimensionales in vitro Tumormodell wurden Sphäroide der Zelllinie BXPC-3 generiert. Hierzu wurde die von Kelm et al. (Del Duca et al., 2004; Kelm et al., 2005; Kelm et

al., 2003) beschriebene „Hanging Drops“ Methode in modifizierter Form angewendet. 20µl einer auf 10^3 Zellen eingestellten Zellsuspension wurden als Tropfen in eine Zellkulturschale gegeben und über Kopf 24 Stunden inkubiert (37°C, 8% CO₂). Am Platz gehalten durch die Oberflächenspannung des Mediums, wandern die Zellen der Schwerkraft folgend in den basalen Abschnitt des Tropfens und lagern sich zu dreidimensionalen Tumorstrukturen zusammen. Diese Sphäroide wurden anschließend durch Abspülen von der Zellkulturschale geerntet und weiterverwendet.

2.5.2 Herstellung von Zellkulturen in 3D Kollagenmatrices

Um die Struktur der Sphäroide zu erhalten und deren dreidimensionales Wachstum zu verfolgen, wurden diese in Kollagengele eingebettet. Hierzu wurde zunächst der Gelansatz vorbereitet, bestehend aus 50µl BIC, 100µl MEM und 375µl Rattenschwanzkollagen (2mg/ml). Anschließend wurden je ein Sphäroide zum Ansatz gegeben. Gelpartien von etwa 150µl wurden in vorbereitete selbstkonstruierte Glaskammern bestehend aus Objektträgern, Deckgläsern und Wachs überführt. Nach Polymerisierung des Gels (~20 min bei 37°C und 5% CO₂) wurden die Kammern mit in CO₂ equilibriertem SAM-6 Überstand gefüllt und mit Wachs luftdicht verschlossen. Als Kontrolle wurde Chrompure IgM versetztes Medium eingesetzt. Beobachtungen unter dem Mikroskop waren ohne Mediumwechsel über 48 h möglich.

2.5.3 Zeitraffervideomikroskopie

Die Wirkung des humanen Antikörpers SAM-6 auf dreidimensional proliferierende Tumorzellen wurde mit Hilfe eines Umkehrlichtmikroskop (DM-IL, Leica®) bei 400 facher Vergrößerung gefilmt. Die Umgebungstemperatur wurde durch ein Rotlichtsystem konstant auf 37°C gehalten. Die Aufnahme Frequenz lag bei 1 Bild pro 4 Minuten.

3. Ergebnisse

3.1 Apoptose Sequenz (Abb.1)

Zur Untersuchung der Apoptoseinduktion durch humane Antikörper wurde stellvertretend für diese Gruppe Hybridomüberstand des Antikörpers SAM-6 in einer Konzentration von 30µg/ml zu Sphäroiden der Zelllinie BxPC-3 gegeben und mit Hilfe der Zeitraffer-Mikroskopie gefilmt. Als Kontrolle diente Chrompure IgM versetztes RPMI 160 in der gleichen Konzentration.

Nach 5 Stunden Proliferation erschienen die ersten apoptotischen Zellen, erkennbar durch das Zerfallen in viele Fragmente (sog. *apoptotic bodies* oder *blebs*). Ab diesen Zeitpunkt nahm die Proliferation im Vergleich zur Kontrolle deutlich ab. Gleichzeitig begannen sich die Zell-Zell-Kontakte aufzulösen und die einzelnen Tumorzellen bekamen eine rundliche Morphologie. Das Zentrum des Sphäroids begann zu zerfallen (**Abbildung 1B**). Immer mehr Zellen wurden apoptotisch, bis nach 48 Stunden keine vitale Zelle mehr vorhanden war (**Abbildung 1C**). Im Gegensatz dazu, zeigte der mit Kontroll-IgM behandelte Sphäroid ein kontinuierliches Wachstum ohne relevante Apoptose. Das Experiment wurde drei Mal wiederholt.

Nicht dargestellt sind Untersuchungen mit Monolayern derselben Linie am Boden einer Zellkulturflasche. Hier zeigten alle behandelten Zellen die bereits beschriebenen spindelförmigen Veränderungen der Morphologie. (Pohle et al., 2004) Apoptotische Körperchen ließen sich nach 48 Stunden Beobachtung nicht im selben Ausmaß beobachten wie in 3 dimensionaler Anordnung der Sphäroide.

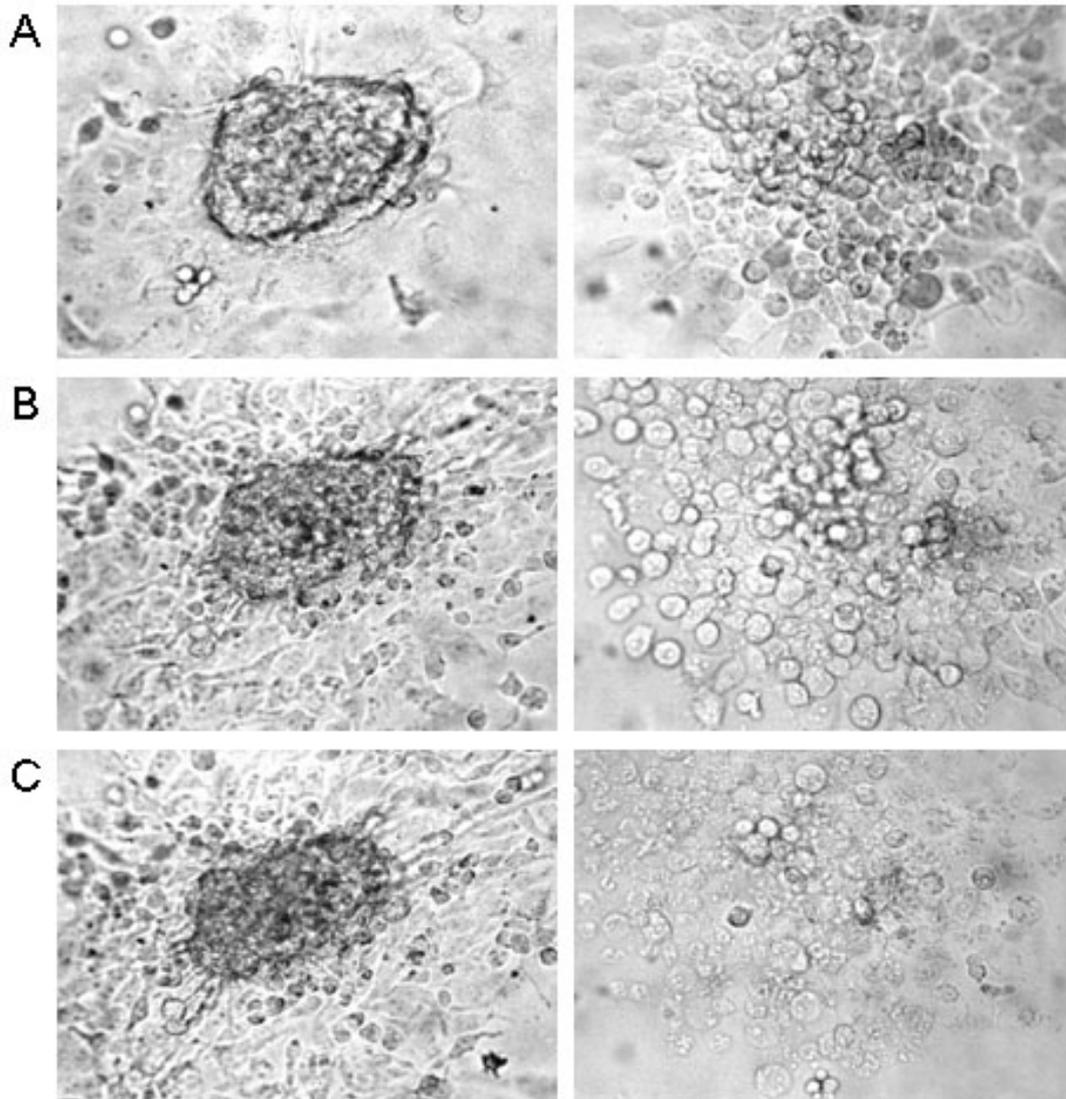


Abbildung 1: Apoptoseinduktion an dreidimensionalen Sphäroiden

Sphäroide wurden in Kollagengele eingebettet und anschließend in selbstkonstruierte Glaskammern bestehend aus Objektträgern, Deckgläsern und Wachs überführt. Nach Polymerisierung des Gels wurden die Kammern mit in CO₂ equilibriertem SAM-6 Überstand gefüllt und mit Wachs luftdicht verschlossen. Als Kontrolle wurde Chrompure IgM versetztes Medium eingesetzt. Beobachtungen unter dem Mikroskop waren ohne Mediumwechsel über 48 h möglich. Die Wirkung des humanen Antikörpers SAM-6 auf dreidimensional proliferierende Tumorzellen wurde mit Hilfe eines Umkehrlichtmikroskop (DM-IL, Leica®) bei 400 facher Vergrößerung gefilmt. (A) zeigt das Bild nach 8 Stunden, (B) nach 24 Stunden und (C) nach 48 Stunden. Die Umgebungstemperatur wurde durch ein Rotlichtsystem konstant auf 37°C gehalten.

3.2 DNA Fragmentierung

Als weitere Methode zur Untersuchung der Apoptoseinduktion durch den humanen Antikörper SAM-6 wurden Zellzyklusanalysen mit Propidium Iodid durchgeführt (Abbildung 2). Dabei zeigten die SAM-6-stimulierten Zellen im Vergleich zur Kontrolle ein unterschiedliches Zellzyklusprofil. Während am Tag 1 und 2 die Verteilung der Zellen in G₁, S und G₂ noch annähernd gleich war, zeigte sich an Tag drei eine deutliche Akkumulation der SAM-6 behandelten Zellen in den Phasen S und G₂. Das spricht für einen Zellzyklusarrest, da

die Zellen nicht mehr die Mitose durchlaufen und somit nicht mehr proliferieren. Am Tag 4 und noch deutlicher an Tag 5 formiert sich zunehmend ein weiterer Peak noch vor den G₁ Zellen. Diese SubG₁ Formation entspricht denen durch Apoptoseinduktion fragmentierten Zellkernen. Diese DNA Fragmente sind hochspezifisch für die Apoptose und vergleichbar mit der DNA- Leiter. Die mit Kontroll IgM behandelten Zellen zeigen keine SubG₁ Fragmente und auch keine wesentlichen Veränderungen im Zellzyklusprofil.

3.3 Endozytose

Pankreaskarzinomzellen der Linie BxPC-3 wurden mit FITC bzw. Orange reactive gekoppelten humanen Antikörpern gefärbt, um beurteilen zu können, ob eine Internalisierung der Antikörper stattfindet. Getestet wurden SAM-6, NORM-2, LM-1 und CM-1. Nach 60 Minuten Inkubation im Brutschrank zeigte sowohl SAM-6 als auch LM-1 eine Konzentration an den Polen von Zellen, die dem so genannten *capping* entspricht und einer Vorstufe der Endozytose entspricht. Nach 120 Minuten sind beide Antikörper internalisiert. Die Antikörper CM-1 und NORM-2 hingegen bleiben über den gesamten Untersuchungszeitraum streng auf der Oberfläche der Zellen und werden nicht aufgenommen.

Tabelle 3: Endozytose humaner Antikörper

Antikörper	Gekoppeltes Fluorochrom	Reaktion
SAM-6	FITC	Endozytose
LM-1	FITC	Endozytose
CM-1	Orange reactive	Membranfärbung
NORM-2	Orange reactive	Membranfärbung

Abbildung 3 zeigt als Beispiel für eine Endozytose mit *capping* die Sequenz für den Antikörper SAM-6 (oben), sowie eine membranständige Bindung für den Antikörper NORM-2 (unten). Die entsprechenden Abbildungen für die Antikörper LM-1 und CM-1 sind nicht gezeigt.

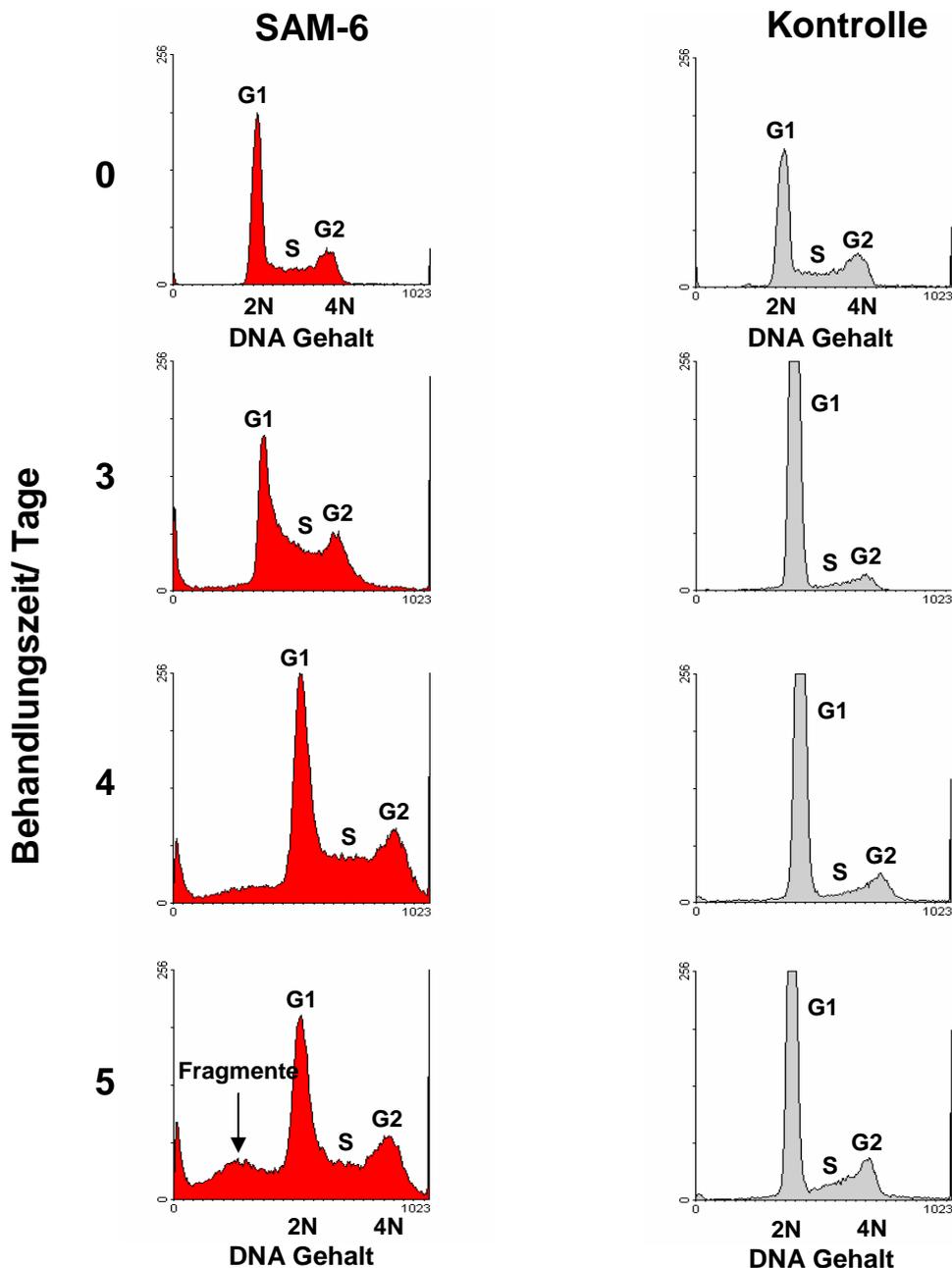


Abbildung 2: SAM-6 führt zur DNA Fragmentierung

5×10^5 Zellen der Zelllinie BxPC-3 wurden mit einem Milliliter Medium in die Nüpfle einer sterilen 6 Well Platte gegeben und mit 1ml unverdünntem SAM-6 Überstand im Brutschrank (37°C , $8\% \text{CO}_2$) stimuliert. Als Kontrolle wurde Chrompure IgM versetztes Medium verwendet. Es wurden über 5 Tage hinweg täglich Messungen vorgenommen. Dazu wurden die Zellen aus den Nüpfeln geerntet und zweimal mit kaltem FACS Puffer gewaschen. Anschließend wurden die Zellen direkt vor der Messung am FACS in $700\mu\text{l}$ fertigen Lyse Puffer ($0,1\%$ Natriumcitrat, $0,1\%$ Triton X-100, $50\mu\text{g/ml}$ Propidiumiodid, $100\mu\text{g/ml}$ RNase, frisch zubereitet) auf Eis resuspendiert. Das Ausmaß der DNA Fragmentierung wurde über die Anzahl der SubG₁ Fragmente im Fluoreszenzkanal 2 bestimmt. Dabei erfolgte die Darstellung linear. Pro Probe wurden 30.000 Ereignisse gemessen, die Zählung erfolgte ohne Einschränkung.

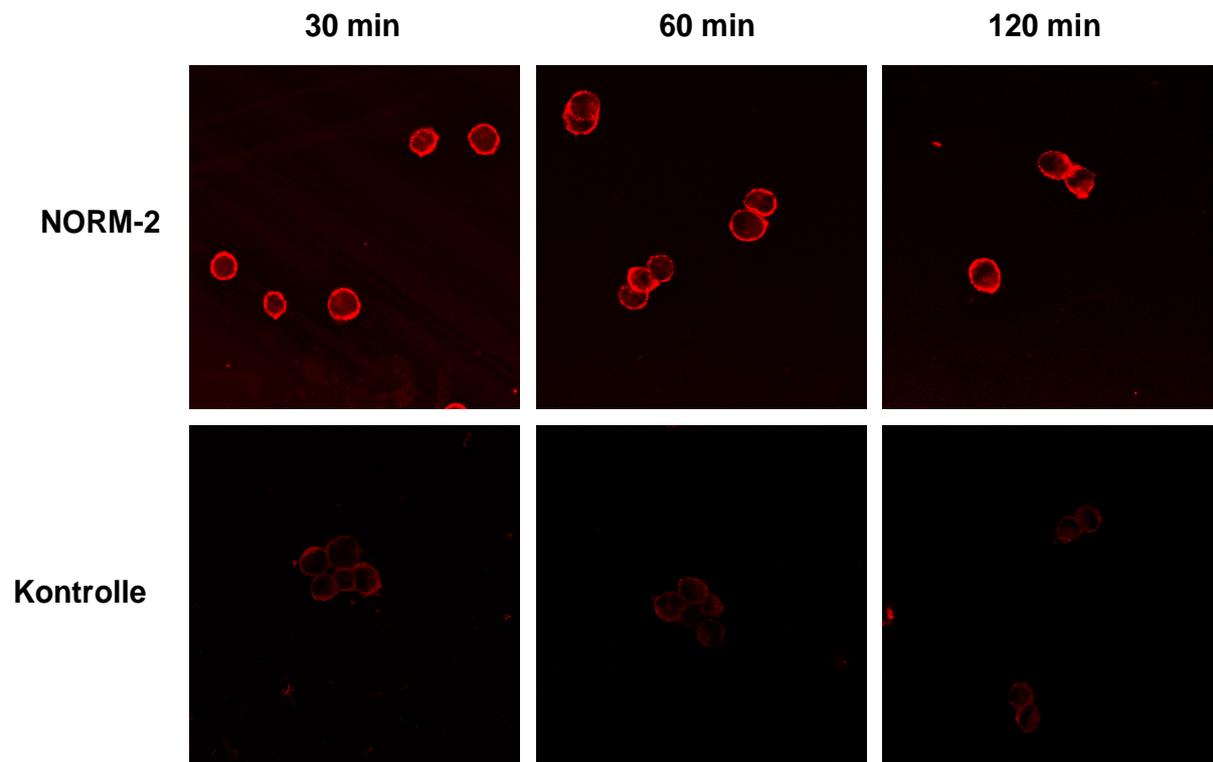
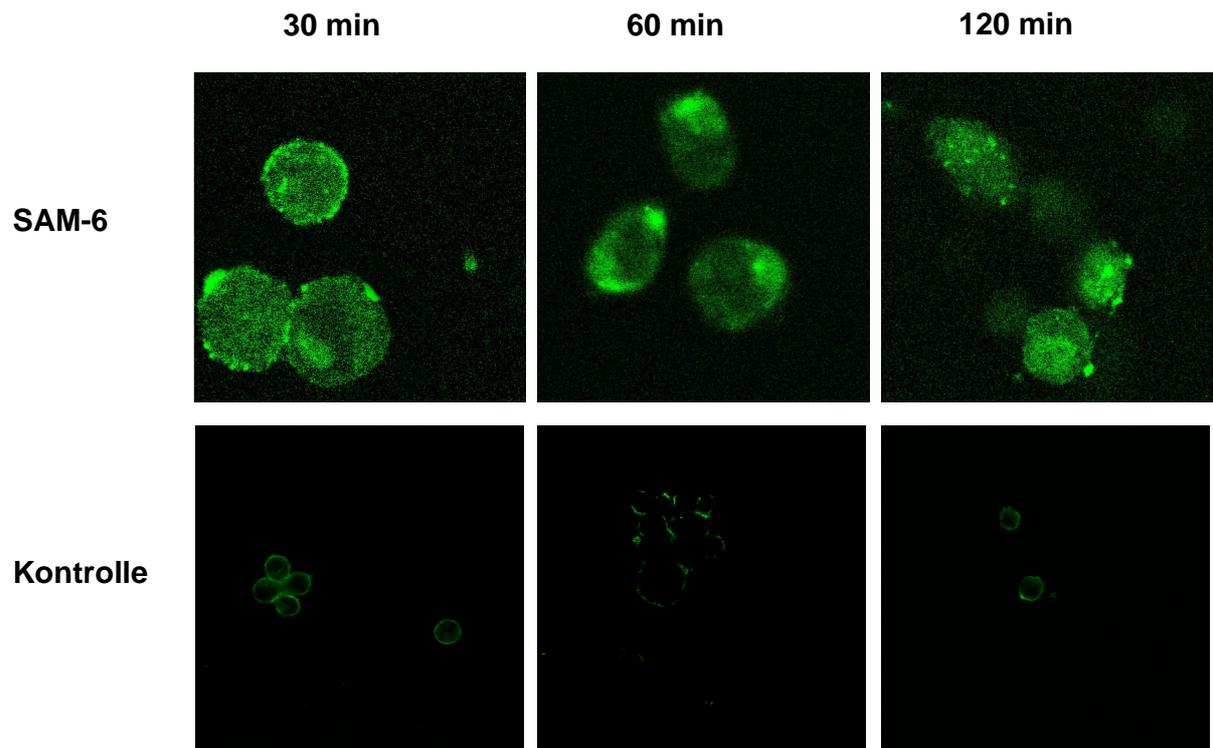


Abbildung 3: Endozytose, Immunfluoreszenz auf BxPC-3 Zellen

10^6 Zellen wurden trypsinisiert, pelletiert und in 500 μ l fluoreszenz-markierter Antikörperlösung aufgenommen und resuspendiert. Während die Zellen im Brutschrank (37°C, 8% CO₂) inkubiert wurden, wurde nach 30, 60 und 120min je 10 μ l der Suspension auf einen Objektträger ausgestrichen, trockenfixiert und mit einem konfokalen Mikroskop ausgewertet. Die obere Sequenz zeigt dabei die Endozytose des Antikörpers SAM-6, die untere die Membranfärbung von NORM-2. Als Kontrolle diente fluoreszenz-gekoppelter Chrompure IgM.

3.4 Immunfluoreszenz/ Doppelfärbung

Um Aussagen zum Bindungsverhalten kombinierter Antikörper zu erlangen, wurden für fünf Cocktails Doppelfärbungen durchgeführt. Dazu wurden die kombinierten Antikörper mit unterschiedlichen Fluoreszenzfarbstoffen konjugiert und mit Pankreaskarzinomzellen der Linie BxPC-3 Färbungen durchgeführt. Als Fluorochrom diente entweder FITC oder Orange reactive, als Kontrolle diente Chrompure IgM, ebenfalls als Doppelfärbung angefertigt.

Tabelle 4: Färbungen mit zwei Antikörpern

Cocktail	Flouorchrom	Färbung
CM-1+NORM2	FITC/Orange reactive	unterschiedliche Epitope
CM-1+SAM-6	FITC/Orange reactive	ähnliche Epitope
LM-1+SAM-6	FITC/Orange reactive	ähnliche Epitope
LM-1+NORM-2	FITC/Orange reactive	unterschiedliche Epitope
SAM-6+NORM-2	FITC/Orange reactive	unterschiedliche Epitope
Chrompure IgM	FITC/Orange reactive	Keine Färbung

In den untersuchten Cocktails haben die Antikörper an alle Zellen gebunden, und es ließen sich keine Subpopulationen ohne Färbung ausmachen. Dafür zeigten einige Kombinationen unterschiedliche Farbtensitäten an verschiedenen Stellen einer Zelle auf. In diesen Cocktails binden die Antikörper an unterschiedliche Epitope. Interessanterweise sind diese Epitope auch innerhalb einer Zelllinie unterschiedlich stark ausgeprägt, sodass einige Zellen stärker grün (FITC) und andere eher rot (Orange reactive) erscheinen. Andere Kombinationen zeigen eine homogene, membranständige Doppelfärbung. Die Antikörper dieser Cocktails haben offensichtlich sehr ähnliche Zielstrukturen, die gleichmäßig in der untersuchten Zelllinie exprimiert sind. Die **Abbildung 4** zeigt zwei Beispiele.

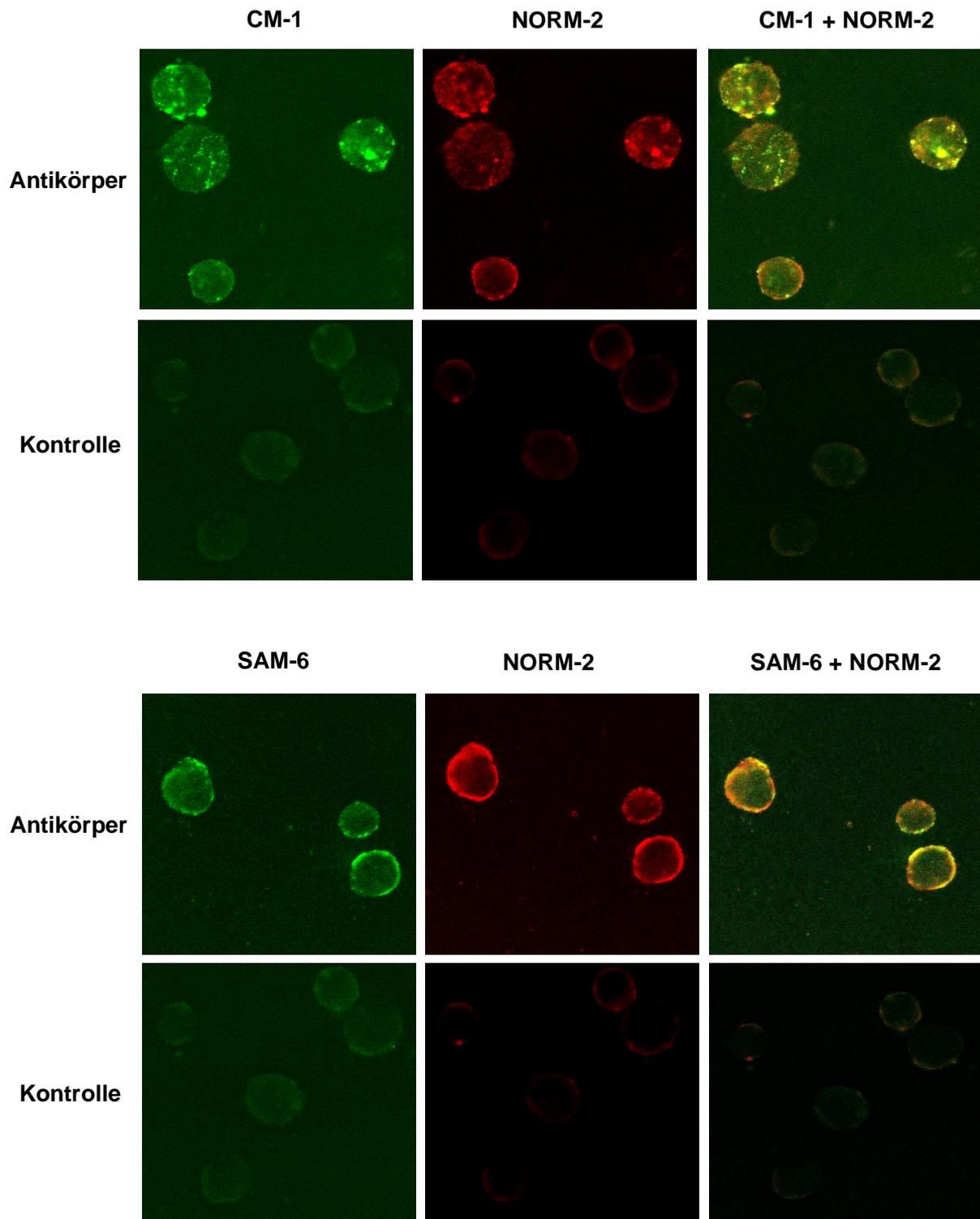


Abbildung 4: Bindung kombinierter Antikörper/ Doppelfärbung

10^6 Zellen wurden trypsinisiert, pelletiert und in $1000\mu\text{l}$ fluoreszenz-markierter Antikörperlösung ($500\mu\text{l}$ Antikörper A und $500\mu\text{l}$ Antikörper B) aufgenommen. Nach 60min Inkubation auf Eis wurden ungebundene Antikörper durch Zentrifugieren (5min, 1500rpm) abgetrennt, die Zellen in $1000\mu\text{l}$ PBS aufgenommen und je $10\mu\text{l}$ der Suspension auf einen Objektträger ausgestrichen, trockenfixiert und mit einem konfokalen Mikroskop ausgewertet.

3.5 Vorbemerkung zum Arbeiten mit Hybridom-Überständen

Da die folgenden Experimente zur Zytotoxizität von Antikörperkombinationen ausschließlich mit Hybridom-Überständen durchgeführt worden sind, bedarf es einer kurzen Vorbemerkung: Für die teilweise sehr sensitiven Methoden zur Messung von Proliferationshemmung und Zelltod, werden repräsentative Kontrollen benötigt. Für Hybridom-Überstände ist das schwierig, da es sich nicht um eine einheitliche Gruppe handelt, sondern viel mehr jeder Überstand unterschiedlich stark verbraucht ist, das heißt, die Nährstoffe des Mediums sind ungleich erschöpft und auch der pH Wert unterscheidet sich. Dieser Erschöpfungszustand des Mediums kann einen antiproliferativen Effekt haben.

Um dieses Problem zu umgehen, wurde für die folgenden Experimente zum einen ein Versuchsaufbau gewählt, in dem wenige Zellen in sehr großen Volumina untersucht werden (10^6 Zellen in $3000\mu\text{l}$) und zum anderen Vorversuche mit Antikörper-freiem, aber verbrauchtem Hybridom-Überstand durchgeführt.

Dazu wurden zwei unterschiedliche Überstände sowohl mit als auch ohne Antikörper hinsichtlich ihrer Proliferationshemmung untersucht und mit frischem Medium verglichen. Ausgewählt wurden die Antikörper NORM-2 und CM-1, da sich diese im Gegensatz zu anderen leicht über eine Protein A Säule reinigen lassen. Für CM-1 gelang die Antikörperdepletion auf $<0,002\mu\text{g/ml}$, für NORM-2 wurde ein Antikörperkonzentration von weniger als $<0,0001\mu\text{g/ml}$ erreicht (nephelometrisch bestimmt). Die Ergebnisse des Remnant Tests zeigt **Abbildung 5**.

Aus den Ergebnissen wird ersichtlich, dass in diesem Versuchsaufbau verbrauchtes Medium eine untergeordnete Rolle spielt. Im Falle des Antikörpers CM-1 reduziert dieser das Wachstum der Pankreaskarzinomzellen um etwa 40%, während derselbe Überstand ohne Antikörper keinen antiproliferativen Effekt hat. Für den Antikörper NORM-2 ergab sich eine Wachstumshemmung von 22%, wobei der depletierte Überstand zu einer Inhibition von 10% führte. Weitere Experimente mit verbrauchtem Medium des Fusionspartners HAB-1 und einem weiteren humanen Antikörper kamen zu ähnlichen Ergebnissen. Dabei war die maximal antiproliferative Wirkung eines verbrauchten Mediums nie größer als 10%. Diese 10% Inhibition sind bei den folgenden Ergebnissen gegebenenfalls abzuziehen, um sicher Effekte eines verbrauchten Mediums auszuschließen.

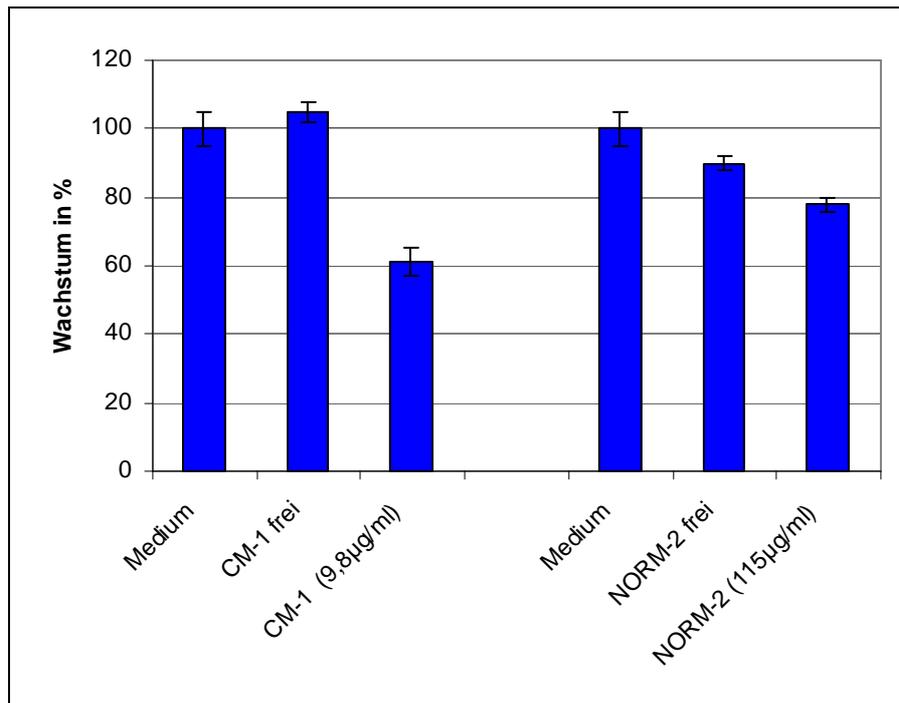


Abbildung 5: Remnant Assay mit Antikörper freiem Hybridom-Überstand

Um die Vergleichbarkeit von Hybridom-Überständen und frischem Kulturmedium einzuschätzen, wurden Überstände der humanen Antikörper CM-1, NORM-2 und M6 über eine Protein A Säule gereinigt und der Antikörper freie Durchlauf (nephelometrisch bestimmt) im Remnant-Viabilitäts Test hinsichtlich seiner Wirkung auf die Zellproliferation untersucht. Als Kontrolle diente RPMI 1640.

3.6 Cocktails mit humanen Antikörpern

Um die zytotoxischen Effekte kombinierter humaner monoklonaler Antikörper zu untersuchen, wurden insgesamt 32 verschiedene Kombinationen auf der Pankreaskarzinomzelllinie BxPC-3 durchgeführt. Kombiniert wurden immer zwei Antikörper miteinander. Gemessen wurde die Zellzahl einer Antikörper-behandelten Probe im Vergleich zur Negativ Kontrolle, bestehend aus frischem Medium und Chrompure IgM. Ausgewertet wurde nach 48 Stunden.

Insgesamt ließen sich die Effekte der Kombinationen in vier Gruppen unterteilen: 1) Eine additive Gruppe, 2) eine synergistische, 3) eine inhibitorische und 4) Kombinationen, die keine relevante Veränderung der Aktivität verursachten.

1) Bei additiven Kombinationen handelt es sich um Cocktails, in denen sich die anti-tumorale Aktivität der Antikörper addiert. Das heißt, ihr Wirkungsgrad ist mindestens stärker als die Inhibition des aktiveren Kombinationspartners, aber nicht höher als die Summe der Einzelaktivitäten. **Abbildung 6** verdeutlicht diesen Zusammenhang. Von 32 getesteten Kombinationen waren 11 additiv (34%). Der stärkste additive Effekt ließ sich bei der Kombination aus SAM-6 und LM-1 beobachten, mit einer Reduktion der Tumorzellen um 67,2%; am zweitstärksten wirkte der Cocktail aus PM-1 und SAM-5 mit 58% weniger Zellen.

2) Bei synergistisch wirkenden Cocktails ist die antiproliferative Aktivität der Kombination größer als Summe der Einzelaktivitäten. Diese Antikörper scheinen sich in ihrer Wirkung zu unterstützen. Von 32 getesteten Kombinationen fanden sich neun Cocktails mit synergistischer Wirkung (28%). Dabei war die Kombination aus PM-2 und NORM-2 am stärksten synergistisch. Die Aktivität dieses Cocktails war um 19,3% höher als die zu erwartende Summe der Einzelaktivitäten. Den stärksten Effekt auf die Gesamtzahl der Tumorzellen hatte in der synergistischen Gruppe die Kombination aus LM-1 und PM-1 mit einer Reduktion um 49,5%. Cocktails mit dem Antikörper LM-1 zeigten am häufigsten synergistische Effekte (4/ 8 Kombinationen). **Abbildung 7** zeigt zwei Beispiele.

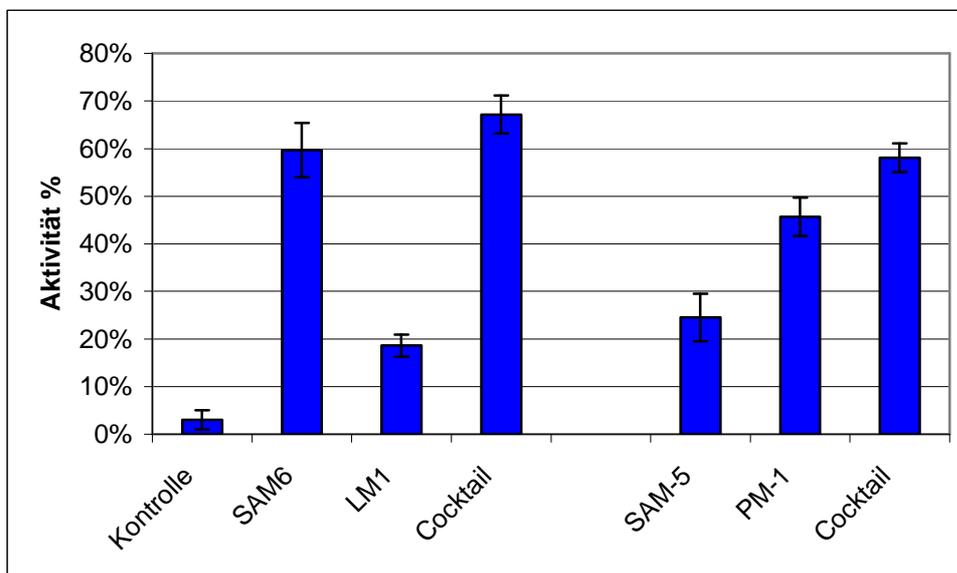


Abbildung 6: Beispiele für additive Kombinationen, Remnant Assay

1ml einer auf 10^6 Zellen pro Milliliter eingestellten Zellsuspension der Zelllinie BxPC-3 wurde in die Näpfe einer sterilen 6 Well Platte gegeben und 4 Stunden im Brutschrank inkubiert, bis die Zellen am Boden adhären konnten. Anschließend wurde 1ml Antikörper-Überstand bzw. 1ml Medium als Kontrolle zu den Zellen gegeben, um anschließend mit einem weiteren Milliliter Medium auf das Zielvolumen von 3ml aufzufüllen. Bei Antikörperkombinationen wurde je 1ml des entsprechenden Antikörper-Überstands pro Napf zu den Zellen gegeben. Jeder Ansatz lag in doppelter Ausführung vor. Nach 48 Stunden Inkubation im Brutschrank bei 37°C und 8% CO₂ wurden die Zellen abgelöst und zur tot/ lebend Differenzierung mit Trypanblau gefärbt und mit Hilfe einer Neubauer Zählkammer gezählt.

3) In der Gruppe der inhibitorischen Kombinationen fanden sich Cocktails, deren Antikörper sich in ihrer Aktivität abschwächen, das heißt ihre Wirkung ist schwächer als der stärkste Kombinationspartner. Das war der Fall für sieben aus 32 Kombinationen (22%). Die ausgeprägteste Inhibition war bei der Kombination von SAM-3 und PM-1 zu beobachten mit einem Wirkungsverlust von 25,4%. Die zweitstärkste Inhibition zeigte der Cocktail aus LM-1 und PM-2 mit 20% weniger Aktivität. Interessanterweise handelt es sich bei vier der sieben getesteten inhibitorischen Kombinationen um Cocktails, deren Antikörper aus ein und

demselben Patienten isoliert wurden. Auch für die übrigen Cocktails gilt, dass sich keine günstigen Effekte (additiv/ synergistisch) einstellten, wenn Antikörper aus dem selben Patienten miteinander kombiniert wurden.

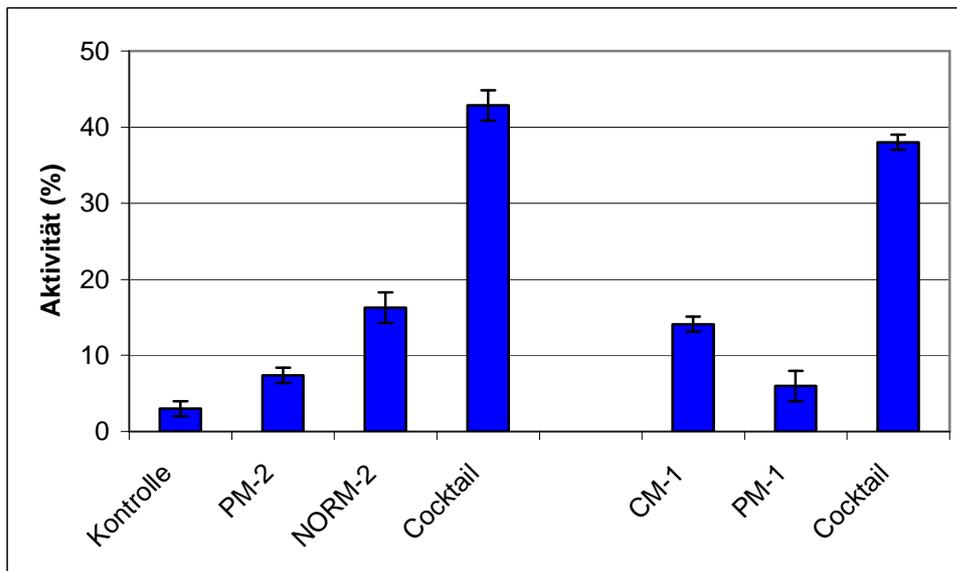


Abbildung 7: Beispiele für synergistische Kombinationen, Remnant Assay

4) In der letzten Gruppe sind Kombinationen vertreten, die weder zu einem relevanten Wirkungszuwachs noch -verlust führten. Als nicht relevant wurde eine Aktivitätsdifferenz zum stärksten Kombinationspartner von <5% angesehen. Von 32 Cocktails gehören fünf in diese Gruppe (16%). Cocktails die mit SAM-3 durchgeführt wurden zeigten am häufigsten inhibitorische oder nicht relevante Effekte (5/ 7 Kombinationen). Einen Überblick über alle durchgeführten Kombinationen gibt **Tabelle 5**.

Tabelle 5: Übersicht Cocktails mit humanen monoklonalen Antikörpern

+ = additiv, ++ = synergistisch, - = inhibitorisch, +/- = keinen Effekt, n.d. = nicht durchgeführt

	SAM6	SAM3	LM-1	PM1	PM2	NORM1	NORM2	SAM5	CM-1
SAM6		-	+	+	++	+/-	+/-	-	++
SAM3	-		++	-	n.d.	-	+	-	+/-
LM-1	+	++		++	-	++	++	+/-	+
PM1	+	-	++		+/-	+	+	+	++
PM2	++	n.d.	-	+/-		n.d.	++	++	n.d.
NORM1	+/-	-	++	+	n.d.		-	+	+
NORM2	+/-	+	++	+	++	-		+	+
SAM5	-	-	+/-	+	++	+	+		n.d.
CM-1	++	+/-	+	++	n.d.	+	+	n.d.	

3.7 5-Fluorouracil und humane Antikörper

Alle Antikörper, die sich bereits in der klinischen Anwendung zur Behandlung von Tumorerkrankungen befinden, werden zusammen mit Chemotherapie oder zumindest an Patienten verabreicht, die stark mit Chemotherapie vorbehandelten wurden. Das hat zwei Gründe: Zum einen sollen Patienten in Studien mit neuen Medikamenten keine Nachteile gegenüber der Standardtherapie (i.d.R. Chemotherapie) haben, zum anderen lässt sich die Wirkung der Antikörper durch Chemotherapie erhöhen, in einigen Beispielen sogar erst erzeugen (Gerber und Ferrara, 2005). Um das Potential humaner Antikörper in Kombination mit Zytostatika zu evaluieren, wurden drei Antikörper mit dem Pyrimidinanalogon 5-Fluorouracil (5-FU) kombiniert und hinsichtlich ihrer anti-proliferativen Wirkung untersucht. Bei 5-FU handelt es sich um einen Antimetaboliten, der an unterschiedlichen Stellen mit dem Nukleinstoffwechsel interferiert. 5-FU hemmt die Bildung von Thymidin-Phosphat und kann in RNA und DNA eingebaut werden. (Lüllmann et al., 2003)

Die Wahl fiel auf 5-FU, da für dieses Zytostatikum eine Wirksamkeit sowohl für das Kolon- als auch für das Pankreaskarzinom beschrieben ist und die getesteten Zelllinien HT29 und BxPC-3 diesen Tumorentitäten entsprechen (Eckel et al., 2006; Pallis und Mouzas, 2006). Als Testverfahren diente der MTT-Assay, da dieser das Arbeiten mit kleinen Volumina erlaubt und so die eingesetzte Menge des potentiell gesundheitsschädlichen Zytostatikums gering gehalten werden konnte. Es wurden die Antikörper CM-1, LM-1, SAM-6 und NORM-2 eingesetzt. Bei den verwendeten Antikörpern handelte es sich nicht um Hybridomüberstände, sondern um gereinigte Antikörper. Sie wurden jeweils in einer Konzentration von 200µg/ml in frischem Medium eingesetzt. Als Kontrolle diente Chrompure IgM - versetztes Medium in der gleichen Konzentration.

Tabelle 6: Übersicht 5- Fluorouracil und humane Antikörper
 ++ synergistisch, + additiv, +/- kein Effekt, n.d: nicht durchgeführt

Antikörper	BxPC-3		HT-29	
	24h	48h	24h	48h
SAM-6	+	+/-	+/-	+/-
NORM-2	++	+	+	+
LM-1	+	+	n.d.	n.d.
CM-1	+	-	n.d.	n.d.

Der Versuchsaufbau wurde so angelegt, dass die Situation eines durch Chemotherapie vorbehandelten Patienten *in vitro* simuliert wurde. Dazu wurden Tumorzellen 24 Stunden mit 5-FU vorinkubiert und anschließend mit Antikörpern für weitere 24 bzw. 48 Stunden behandelt (s. Material und Methoden). Dabei wurden 5-FU Konzentrationen angestrebt, die die Zellen sensibilisieren aber selbst nicht zu einer relevanten Wachstumsreduktion führen. Diese lag für Pankreaskarzinomzellen der Linie BxPC-3 zwischen 2-5 µg/ml, für die Kolonkarzinome der Linie HT-29 deutlich niedriger bei etwa 1µg/ml. Ein ähnlicher Versuchsaufbau wird beschrieben für Mammakarzinome in Guan et al., 2005.

Ähnlich wie bei den Cocktails aus verschiedenen Antikörpern fanden sich auch bei der Kombination aus Antikörper und 5-FU additive und synergistische Kombinationen. Grundsätzlich profitierte jeder Antikörper von der Hinzunahme des Zytostatikums. Den stärksten synergistischen Effekt zeigte interessanterweise die Kombination mit NORM-2, einem Antikörper, der ohne Chemotherapie keine starke Aktivität aufzeigt. Die behandelten Pankreaskarzinomzellen in diesem Experiment zeigten nach 24 Stunden fast keine Aktivität mitochondrialer Dehydrogenasen mehr, und zwar sowohl bei 5-FU Konzentrationen von 5µg/ml als auch bei 1µg/ml. Siehe **Abbildung 8**. Die anderen Antikörper zeigten vor allem additive Effekte mit einem Zuwachs der Wirksamkeit zwischen 10% und 30%. Einen Überblick gibt **Tabelle 6**.

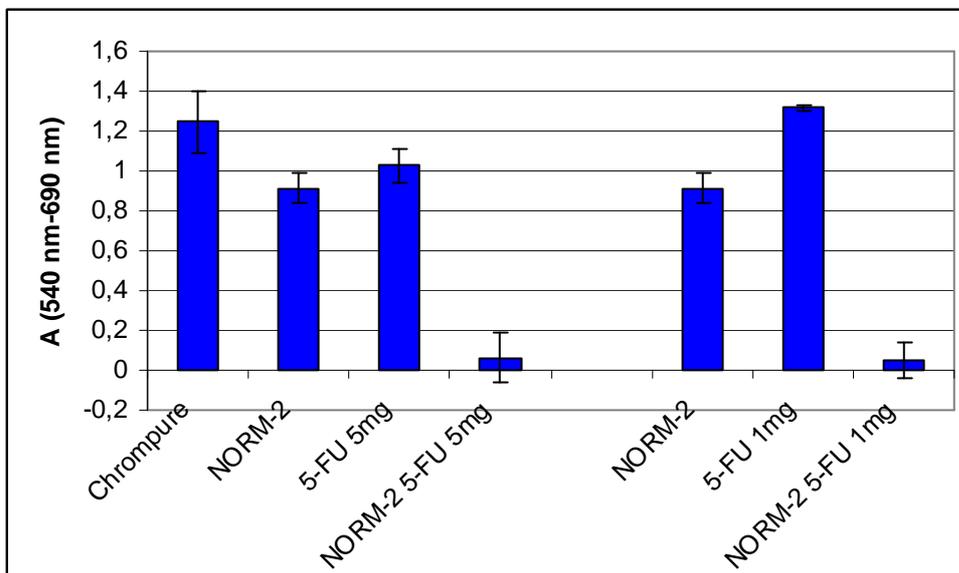


Abbildung 8: 5-FU sensibilisiert BxPC-3 Zellen für den humanen Antikörper NORM-2, MTT-Assay
 50 µl einer auf 2×10^5 eingestellten Zellsuspension wurden in die Näpfe einer sterilen 96 Well Platte gegeben und mit weiteren 50µl einer entsprechend vorbereiteten 5-FU/ RPMI Lösung aufgefüllt. Jeder Ansatz lag in vierfacher Ausführung vor. Nach 24 Stunden bei 37°C und 8% CO₂ im Brutschrank wurde der Überstand vorsichtig abgesaugt und der zu testende Antikörper/ Kontrolle (Chrompure IgM) auf die Zellen gegeben und für weitere 24 Stunden im Brutschrank inkubiert. Ausgewertet wurde durch die Durchführung des MTT-Assays wie bereits oben beschriebenen (s. Material und Methoden).

3.8 FACS Analysen mit 5-FU vorbehandelten Zellen und humanen Antikörpern

Um erste Hinweise auf den Wirkungsmechanismus der Sensibilisierung von Tumorzellen durch 5-FU zu erlangen, wurden FACS Analysen durchgeführt. Dabei wurde der Frage nachgegangen, ob die Vorinkubation zu einem verbesserten Bindungsverhalten führt. Die Untersuchungen wurden für die Antikörper SAM-6 und NORM-2 auf BxPC-3 und HT-29 Zellen durchgeführt. Dabei konnte erneut beobachtet werden, dass vor allem NORM-2 von der Vorbehandlung mit 5-FU profitiert und seine Bindung an BxPC-3 Zellen deutlich zunimmt. Das spricht dafür, dass das Epitop dieses Antikörpers durch die Exposition der Zellen zu 5-FU eine stärkere Expression erfährt. Für SAM-6 ergaben sich weder auf BxPC-3 noch auf HT-29 günstige Effekte. Die zu beobachtenden additiven Effekte lassen sich somit nicht durch eine stärkere Bindung erklären. Die **Abbildungen 9 und 10** verdeutlichen diesen Zusammenhang.

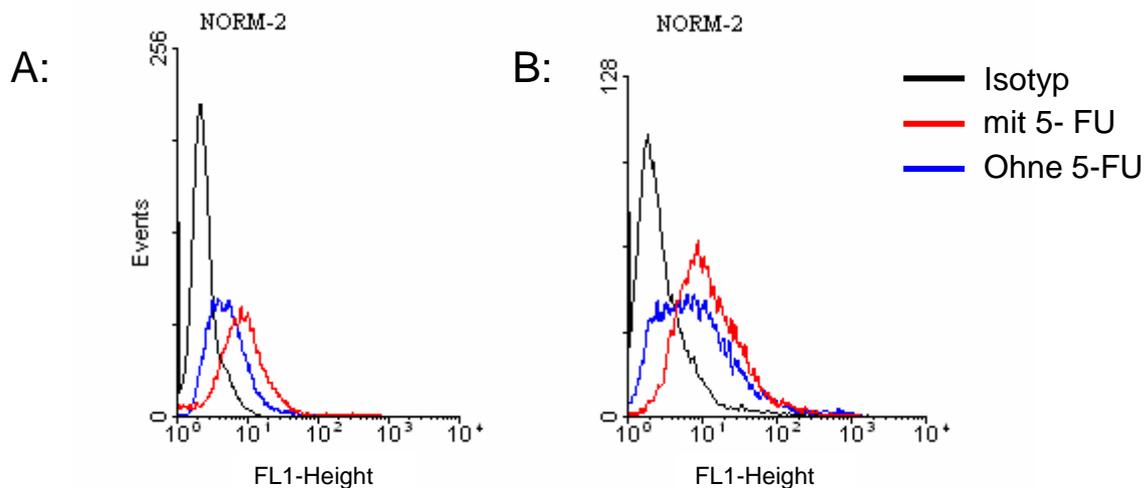


Abbildung 9: FACS Analysen mit 5-FU vorbehandelten Zellen und dem humanen Antikörper NORM-2

10^7 Zellen der Zelllinie BxPC-3 (A) bzw der Zelllinie HT-29 (B) wurden in einer Zellkulturflasche mit 5-FU in einer Konzentration von $5\mu\text{g/ml}$ über Nacht im Brutschrank vorinkubiert. Nach 12 Stunden wurden die Zellen trypsinisiert, pelletiert (5min, 1500 rpm) und in frischem Medium zur Rekonstitution der Zellmembranen für 30min auf Eis gestellt. 2×10^5 Zellen wurden jeweils in ein FACS Röhrchen überführt und entsprechend der im Material und Methodenteil dargestellten Vorgehensweise behandelt. Die Bindung der Antikörper wurde als Verschiebung zur Isotyp-Kontrolle auf Fluoreszenzkanal 1 gemessen.

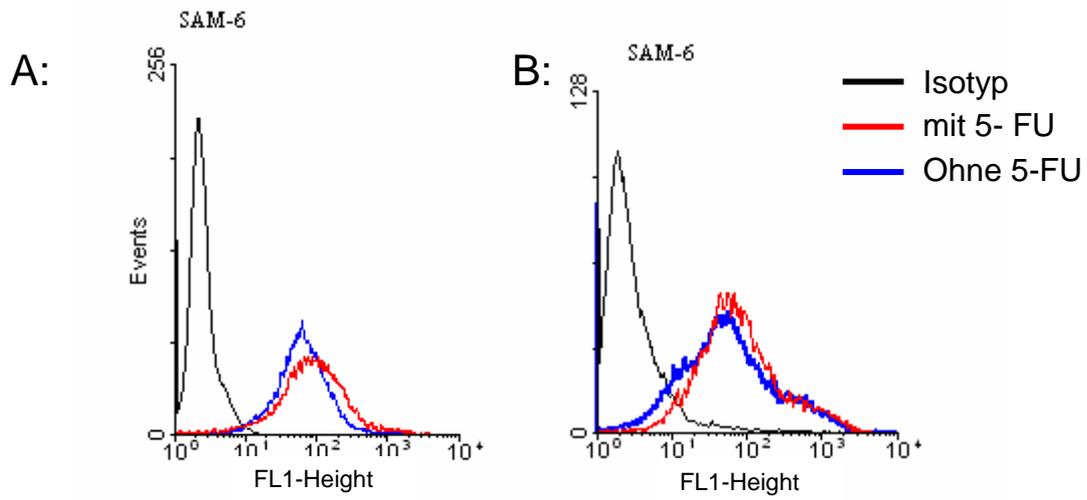


Abbildung 10: FACS Analysen mit 5-FU vorbehandelten Zellen und dem humanen Antikörper SAM-6 BxPC-3 (A), HT-29 (B)

4. Diskussion

Die in dieser Arbeit beschriebenen immunhistochemischen und zellbiologischen Experimente sollen Aufschluss über den potentiellen Nutzen einer Tumorummuntherapie mit Cocktails aus humanen Antikörpern geben und einen Beitrag zur Aufklärung weiterer Mechanismen der Apoptoseinduktion dieser Moleküle leisten.

Im Einzelnen konnte gezeigt werden, dass sich die Apoptosinduktion humaner Antikörper mit Hilfe der Zeitraffervideomikroskopie filmen lässt. Antikörper-behandelte Pankreaskarzinomzellen stellten ihre Proliferation ein und zerfielen in zahlreiche Fragmente, den sog. apoptotischen Körperchen. Diese Apoptoseinduktion konnte auch bei der Durchführung von Zellzyklusanalysen beobachtet werden. Die behandelten Tumorzellen akkumulierten in der S- und G₂ Phase des Zellzyklusses im Sinne eines Zellzyklusarrestes und apoptose-spezifische SubG1- Fragmente konnten detektiert werden.

Zum Themenkomplex „Cocktails aus humanen Antikörpern“ konnten folgende Beobachtungen gemacht werden: Antikörperkombinationen, die mit unterschiedlichen Fluorochromen konjugiert wurden, färbten die Membranen von Tumorzellen auch an unterschiedlichen Stellen. Die Antikörper in diesen Cocktails binden an unterschiedliche Epitope. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass einige Antikörper von den Zellen endozytiert werden, andere hingegen streng auf der Zellmembran bleiben.

Die Zytotoxizität kombinierter humaner Antikörper wurde in 32 unterschiedlichen Kombinationen getestet. In 11 von 32 Kombinationen verhielten sich die Antikörper in ihrer anti-proliferativen Aktivität additiv zu einander. Damit wurden additive Cocktails am häufigsten beobachtet. Synergistische Effekte zeigten neun von 32, inhibitorische sieben Kombinationen. Keine Zu- oder Abnahme der Aktivität ließ bei fünf der getesteten 32 Kombinationen beobachten.

Tumorzellen, die mit dem Pyrimidinanalogon 5-Fluorouracil (5-FU) vorbehandelt wurden, zeigten eine deutlich gesteigerte Vulnerabilität humanen Antikörpern gegenüber. Es ließen sich additive und synergistische Kombinationen beobachten. Den stärksten Effekt hatte der Antikörper NORM-2 bei vorbehandelten Pankreaskarzinomzellen. Über die verstärkte Zytotoxizität hinaus, führte eine Vorbehandlung der Tumorzellen mit 5-FU zu einer gesteigerten Bindung der Antikörper an die Membranen der Zellen, wie in durchflusszytometrischen Untersuchungen gezeigt werden konnte.

4.1 Apoptose durch humane Antikörper

Als Beispiel für die Apoptoseinduktion dieser Antikörper wurden Sphäroide einer Pankreaskarzinomzelllinie mit Überstand des Antikörpers SAM-6 behandelt und mit Hilfe der Zeitraffermikroskopie gefilmt. Bei Sphäroiden handelt es sich um 3 dimensionale Tumorkonstrukte, die gewissermaßen einen Kompromiss aus *in vitro* und *in vivo* Experimenten darstellen, da sie zwar aus sekundären Tumorzelllinien gebildet werden, aber wie im Körper ein 3 dimensionales Wachstum zeigen (Sipos et al., 2003). SAM-6, ein IgM Antikörper, der aus einem Magenkarzinompatienten gewonnen wurde, führte zu einer erheblichen Wachstumsregression und Apoptoseinduktion der Sphäroide. Bei Apoptose handelt es sich um einen gezielten Selbstzerstörungsprozess, in dem verschiedene intrazelluläre Enzyme (sog. Caspasen) zunächst den Zellkern abbauen und dann zu einer Fragmentierung der gesamten Zelle führen. Als Produkt dieser Zergliederung bleiben zahlreiche Vesikel zurück, die als apoptotic bodies oder blebs bezeichnet werden. Diese Körperchen können im Organismus von Makrophagen und anderen Immunzellen phagozytiert werden, ohne dass eine lokale Inflammation entsteht. Das ist der wesentliche Unterschied zum unkontrollierten Zelluntergang, der Nekrose, in der es zu einer erheblichen entzündlichen Begleitreaktion kommt (Doseff, 2004). Apoptose ist damit die sauberste Beseitigung von geschädigten Zellen und für eine Tumorthherapie ideal (Brändlein und Vollmers, 2004).

Im Experiment zeigten sich bereits nach vier Stunden Inkubation die ersten apoptotischen Zellen, zu erkennen an der Fragmentierung in apoptotische Körperchen. Darüber hinaus lösten sich zunehmend Zelle aus dem Epithelverband und bekamen eine abgerundete, ovale Morphologie. Diese Änderung der Gestalt ging der Apoptose voraus. Nach 48 Stunden Beobachtung waren keine vitalen Zellen mehr vorhanden, während die Kontrolle kontinuierlich weiter proliferierte. Das Experiment wurde mit dem gleichen Versuchsaufbau auch für plan wachsende Zellen auf dem Boden einer Zellkulturflasche durchgeführt (sog. Monolayer). Überraschenderweise konnte hier keine vergleichbare Apoptose beobachtet werden. Es kam zwar auch zu einem Proliferationsstopp und einer Veränderung der Zellmorphologie hin zu einer bereits beschriebenen spindelförmigen, fibroblastoiden Gestalt der Zellen (Pohle et al., 2004), aber nicht zur Fragmentierung mit apoptotischen Körperchen. Diese Beobachtungen führen vor Augen, wie schlecht vergleichbar Untersuchungen mit Zellkulturen zu der tatsächlichen *in vivo* Situation sind. Monolayer sind im Vergleich zur Situation *in vivo* optimal mit Sauerstoff und Nährstoffen versorgt. Sie wachsen nur mit zweidimensionalen Zell-Zell-Kontakten auf einer künstlichen Oberfläche und sind damit im gewissen Maße artifiziell. Dreidimensional wachsende Tumorzellen hingegen wachsen im

Zellverband und zeichnen sich durch biochemische und morphologische Eigenschaften aus, die einem Tumor *in vivo* viel ähnlicher sind (Kunz-Schughart et al., 2004). Auch ihre Wachstumskinetik ist mit der *in vivo* Situation vergleichbar (McLeod et al., 1997). Für die verwendete Zelllinie BxPC-3 konnte darüber hinaus gezeigt werden, dass sowohl die Strukturen der Zellmembran, die Anzahl von Muzin-Granula, als auch die Anzahl andere Zellorganellen sich zwischen Monolayer und Sphäroid unterscheiden (Sipos et al., 2003). Tumorzellen scheinen als Sphäroid wieder eine moderate Differenzierung zu unterlaufen. Die sich daraus ergebenden Eigenschaften führten in der Vergangenheit oft zu einem Fehlschlagen von *in vitro* erfolgreich getesteten pharmakologischen Substanzen (Jacks und Weinberg, 2002; Smalley et al., 2006). Im Gegensatz dazu scheinen dreidimensional wachsenden Zellen für die Behandlung mit SAM-6 noch vulnerabler zu sein, ein Umstand, der zusätzliche Hoffnung für einen therapeutischen Einsatz dieses Antikörpers hegt. Humane Antikörper sind als Ergebnis einer menschlichen Tumorummunität am besten an die tatsächliche Tumorbiologie *in vivo* angepasst.

Neben dem bereits beschriebenen apoptotischen Körperchen ist ein weiteres Kennzeichen der Apoptose die DNA Fragmentierung (Nagata et al., 2003). Für diesen Vorgang werden DNAsen verantwortlich gemacht, von denen einige bereits charakterisiert werden konnten (Huang et al., 2005). Diese schneiden die DNA in Abhängigkeit von verschiedenen Kationen (z.B. Ca^{2+}) an definierten Abschnitten, so dass abhängig von der Dauer der Apoptose immer kleinere DNA-Fragmente entstehen, die sich in der Gelelektrophorese als Leiter darstellen (Arends et al., 1990; Huang et al., 2005). Dieser DNA-Verlust apoptotischer Zellen lässt sich auch in der Durchfluss-Zytometrie darstellen, wenn man Zellzyklusanalysen durchführt. Hier macht man sich zu Nutze, dass bei der Degradierung der DNA Fragmente entstehen, die kleiner als die in der G_1 Phase sind. Diese sub- G_1 Fragmente, auch hypodiploide Fragmente genannt, formen in der Durchfluss-Zytometrie einen Peak, der spezifisch für die Apoptose ist. Zellzyklusanalysen, die mit dem Antikörper SAM-6 durchgeführt wurden, konnten in dieser Arbeit erstmals dieses Apoptosespezifikum für einen humanen Antikörper zeigen (siehe Abbildung 2). Nach drei Tagen Inkubation zeigten SAM-6 behandelte Pankreaskarzinomzellen eine deutliche Akkumulation von Zellen in der S und G_2 Phase. Dieses Phänomen spiegelt den Zellzyklusarrest wieder, der dem zu beobachtenden Proliferationsstopp entspricht. Nach vier Tagen Inkubation schließt sich ein solider Peak von sub- G_1 Zellen an, welcher die apoptotischen Zellen kennzeichnet und an Tag fünf noch an Größe zunimmt (Brändlein et al., 2007). Interessant ist die zeitliche Differenz der

Apoptoseinduktion in der Zellzyklusanalyse und den oben beschriebenen Experimenten mit Tumorsphäroiden. Zwei Erklärungsansätze kommen in Betracht: Zum einen wurden die Zyklusanalysen mit Zellen durchgeführt, die als Monolayer wachsen. Die sich daraus ergebenden Probleme der Vergleichbarkeit wurden bereits diskutiert. Zum anderen ist die Entstehung von sub-G₁ Fragmenten vom Zeitpunkt der Apoptoseinduktion innerhalb des Zellzyklus abhängig. Fragmente, die in G₂ durch Apoptose entstehen, fallen als Peak zunächst in die S-Phase und sind erst nach weiterer Fragmentierung als hypodiploide Zellen zu detektieren. Das braucht Zeit (Huang et al., 2005; Pozarowski et al., 2003). Die beobachtete Akkumulation in S und G₂ ist durchaus in dieser Hinsicht zu interpretieren. Das wirft die Frage auf, inwiefern der Antikörper SAM-6 Zellzyklus-abhängig Apoptose induziert. Andere Experimente mit diesem Antikörper scheinen diese These zu unterstützen. So konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass Tumorzellen, die eine SAM-6 Behandlung überlebt haben, nach einer zweiten Stimulation doch noch die Apoptose unterliefen. SAM-6 könnte damit seine Wirkung vor allem in einer späten Phase des Zellzyklus entfalten. Bei nicht synchronisierten Zellen müssen auf diese Weise immer Zellen vorhanden sein, die initial nicht auf den Antikörper ansprechen. Eine therapeutische Konsequenz wäre, den Antikörper analog zur Therapie mit Zytostatika in Zyklen zu verabreichen, um statistisch möglichst viele Zellen in ihrer vulnerablen Phase des Zellzyklus zu erreichen.

Die exakte Aufklärung der an der Apoptoseinduktion humaner Antikörper beteiligten Mechanismen, ist von hohem Stellenwert für die biomedizinische Forschung. Sie ermöglicht zum einen die molekularen Unterschiede zwischen gesunden und transformierten Zellen näher zu definieren, zum anderen bietet sich die Möglichkeit, das menschliche Immunsystem in der Abwehr von Tumorzellen besser zu verstehen und therapeutisch nutzbarer zu machen. Für einen Teil der am Würzburger Institut für Pathologie entwickelten Antikörper konnten bereits die Zielstrukturen identifiziert werden und auch Hypothesen zur Wirkungsweise aufgestellt werden (Brändlein et al., 2003b; Brändlein et al., 2004c; Hensel et al., 2001; Hensel et al., 1999). Für den Antikörper SAM-6 konnte gezeigt werden, dass er Tumorzellen durch eine intrazelluläre Akkumulation von oxidiertem LDL (low density lipoprotein) tötet. Die maßlose Ansammlung von Cholesterolestern und Neutralfetten in der Zelle führt zur Apoptose, die auch als Lipoptose bezeichnet wird (Pohle et al., 2004). In dieser Arbeit konnte in Zusammenarbeit mit N. Rauschert gezeigt werden, dass SAM-6 von Tumorzellen endozytiert wird (Brändlein et al., 2007). Dabei bindet er zum einen an oxidiertes LDL (oxLDL), zum anderen an einen tumorspezifischen Rezeptor der Zelloberfläche, der die

Endozytose einleitet. In Experimenten mit Fluoreszenz markierten Antikörpern konnte nach 30 Minuten eine Konzentration der Antikörper an den Polen der untersuchten Karzinomzellen beobachtet werden. Diese Konzentration wird auch als *capping* bezeichnet, einem Vorgang, indem sich Antikörper-Rezeptor-Komplexe an definierten Stellen der Zellmembran sammeln. Darauf folgt die Abschnürung der Membran zu Vesikeln und die eigentliche Endozytose findet statt. Im Experiment ließ sich diese Aufnahme von SAM-6 nach 60 Minuten beinahe bei allen Zellen beobachten.

Inzwischen ist auch der Rezeptor bekannt. Es handelt sich dabei um eine Isoform des Heatshockproteins GRP 78 (Rauschert et al, 2008). Die Endozytose ist dabei kein Phänomen, welches für alle humanen Antikörper zutreffen würde: Experimente, die für drei weitere Antikörper durchgeführt wurden, zeigten, dass NORM-2 und CM-1 streng auf der Zelloberfläche bleiben und nicht endozytiert werden. Das lässt sich gut mit der Beobachtung in Einklang bringen, dass jeder humane Antikörper seinen eigenen Mechanismus zur Beseitigung von transformierten Zellen besitzt, und es ermöglicht Einblicke in die „apoptotic phantasy“ des menschlichen Immunsystems (Brändlein und Vollmers, 2004).

Darüber hinaus bieten Antikörper, die spezifisch von Tumorzellen aufgenommen werden, die Möglichkeit Zellgifte ins Tumorgewebe zu bringen, wenn diese an den Antikörper konjugiert werden. Diese Verabreichung hat den Vorteil, dass es potentiell zu einer Akkumulation von hochpotenten Wirkstoffen im Tumor kommt, ohne schwere Nebenwirkungen zu verursachen (Schrama et al., 2006). Humane Antikörper sind auch für diese Situation die idealen Moleküle, da sie im Vergleich zu chimären oder humanisierten Antikörpern die höchste Bioverfügbarkeit besitzen und am besten verträglich sind. Interessanterweise scheint der humane Antikörper SAM-6 bereits durch solch einen Mechanismus seine Zytotoxizität zu verursachen: Er bindet sowohl an oxLDL als auch einen tumorspezifische Rezeptor und führt nach seiner Internalisierung zur intrazellulären Akkumulation von toxischem oxLDL und Cholesterolestern, die zur Apoptose der Krebszelle führen (Brändlein et al., 2007). Dieser Weg des Immunsystems zeigt erneut auf, wie viele der angeblich neuen und artifiziellen Therapiestrategien bereits auf natürlichem Wege im Menschen existieren.

4.2 Cocktails mit humanen Antikörpern

Das Kernstück der vorliegenden Arbeit stellte die präklinische Evaluation kombinierter humaner Antikörper dar. Dabei wurden Antikörper sowohl mit einer herkömmlichen Substanz, dem Chemotherapeutikum 5-Fluorouracil (5-FU) kombiniert, als auch untereinander,

also Kombinationen aus zwei zielgerichteten Substanzen. Für beide Strategien konnten eindeutige Vorteile der Kombination gegenüber einer Monotherapie gezeigt werden.

Es gibt heute viele Beispiele sowohl für erfolgreiche als auch für unerfolgreiche Studien, in denen Antikörper in Kombination mit Chemotherapien verabreicht worden sind. Teilweise erhebliche Überlebensvorteile ließen sich unter anderem für den Antikörper Trastuzumab in der Behandlung des Mammakarzinoms (Slamon et al., 2001) beobachten, so wie für Bevacizumab in der Behandlung von kolorektalen Karzinomen (Hurwitz et al., 2004) und dem nicht-kleinzelligen Lungenkarzinom (Sandler et al., 2006). Es gibt aber auch Studien, in denen ein Antikörper keinen Benefit zusätzlich zur Chemotherapie brachte, wie das Beispiel Cetuximab in der Behandlung von HNO-Tumoren zeigt (Burtneß et al., 2005).

Die in dieser Arbeit durchgeführten präklinischen Versuche mit humanen Antikörpern und Chemotherapie, lassen aber durchaus einen gewissen Optimismus für spätere, klinische Studien zu:

Behandelt man Pankreaskarzinomzellen der Linie BxPC-3 mit 5-FU, so bindet der humane Antikörper NORM-2 besser an die Zellen und führt zu einem massiven zytotoxischen Effekt. Als ein Grund für diesen starken Wirkungszuwachs des Antikörpers kann die durch 5-FU verursachte Überexpression der NORM-2 Rezeptoren vermutet werden. Hier binden mehr Antikörper pro Krebszelle, und die anti-tumor Wirkung nimmt zu. Da der Rezeptor bisher nicht bekannt ist, kann über seine Funktion nur spekuliert werden. Sicher scheint, dass eine tumorspezifische Modifikation in der Glykosylierung der Tumorzelle eine Rolle spielt, da eine Behandlung mit N/O-Glykosidase zu einem Bindungsverlust von NORM-2 führt. Dass Tumorzellen häufig ein verändertes, oft verstärktes Glykosylierungsprofil besitzen, ist seit den frühen 70er Jahren bekannt (Dube und Bertozzi, 2005; Kobata und Amano, 2005; Meezan et al., 1969). Dass diese modifizierten Zuckerstrukturen Ziel einer Immuntherapie sein können, konnte ebenso gezeigt werden (Monzavi-Karbassi et al., 2005; Slovin et al., 2005). In Ergebnissen der letzten Jahre wird nun zunehmend auch die Rolle der Glykokalyx in der Entstehung von Resistenzen gegenüber bestimmter Chemotherapeutika deutlicher (Aouali et al., 2005; Gouaze et al., 2004; Kudo et al., 2007). Ob es sich dabei tatsächlich um eine generelle Überexpression von Glykokalyxbestandteilen handelt, oder vielmehr um ein Mehr an glykosylierten Membranproteinen, wurde bisher nicht abschließend geklärt. Da die untersuchte Zelllinie mit einer Überexpression auf die Konfrontation mit 5-FU reagiert, könnte es sich beim NORM-2 Rezeptor auch um ein glykosyliertes Schutzmolekül handeln, welches die Zellen vor den toxischen Effekten der Chemotherapie schützen soll. Solche Schutzmoleküle als Targets sind für humane Antikörper schon in der Vergangenheit

beschrieben worden. Der humane IgM Antikörper SC-1 bindet beispielsweise an CD55, ein Molekül, das vor autologer Komplementaktivierung schützt (Hensel et al., 1999), oder der Wachstumsrezeptor CFR-1, der vom humanen Antikörper PAM-1 erkannt wird (Brändlein et al., 2004b). Auch bereits etablierte Targets wie der Her2neu Rezeptor reagieren ähnlich auf eine Chemotherapie. Nur sind diese nicht tumorspezifisch und führen durch ihre Chemotherapie assoziierte Überexpression zu teilweise schweren Nebenwirkungen wie der Entwicklung einer Herzinsuffizienz (Feldman et al., 2000).

Diese Kombination aus einem humanen Antikörper und einem Chemotherapeutikum stellt ein klassisches Beispiel für einen Synergismus dar. 5-FU führt zum Einbau falscher Nukleotide in die DNA der Tumorzelle und verursacht dadurch genomischen Stress, der die Proliferation stört und bestenfalls zum Zelltod führt. Gleichzeitig versucht sich die Zelle vor dem toxischen Agens zu schützen und exprimiert verstärkt verschiedene Schutzmoleküle inklusive des NORM-2 Rezeptors. Das führt zur gesteigerten Aktivität des Antikörpers und hat den beobachteten zytotoxischen Effekt zur Folge. Hier greifen zwei unterschiedliche Mechanismen ineinander, die gemeinsam eine viel stärkere Wirkung erzielen können, als sie allein in der Lage gewesen wären. Für das Pankreaskarzinom konnte bis heute noch kein einziges zielgerichtetes Molekül seine Wirksamkeit beweisen, obwohl gerade diese Tumorentität mit seiner erheblichen Einschränkung der Lebensqualität und einem 5-Jahresüberleben von unter 5% dringend neue Therapieoptionen benötigt (Saif, 2007). Sollten sich die beobachteten Effekte der Kombination aus 5-FU und NORM-2 auch in vivo zeigen, so wäre dies ein Durchbruch in der Behandlung dieser bisher weitgehend therapieresistenten Tumorentität.

In der vorliegenden Arbeit konnten auch für LM-1, CM-1 und SAM-6 deutlich additive Effekte in der Kombination mit 5-FU beobachtet werden. Inwiefern humane Antikörper von einer Kombination mit anderen zytostatischen Medikamenten profitieren, bedarf weiterer Forschung und wird gerade in Hinblick auf zukünftige Studien mit Patienten sehr interessant bleiben.

Versuche, die mit Cocktails aus humanen Antikörpern auf der Pankreaskarzinomzelllinie BxPC-3 durchgeführt wurde, zeigten ein heterogenes Bild: Es ließen sich Kombinationen ermitteln, deren Wirkung sich addierte oder sogar synergistisch war, das heißt, deren Effekt größer war als die erwartete Summe der Einzelaktivitäten. Es fanden sich aber auch Kombinationen, in denen die Antikörper nicht voneinander profitierten, sich teilweise sogar hemmten. In der Mehrzahl scheint eine Kombination aber günstig zu sein. Dabei stellt sich die Frage, ob für zukünftige Therapiestrategien eher Cocktails aus der additiven oder aus der

synergistischen Gruppe bevorzugt verwendet werden sollten. Der aktivste Cocktail war aus der additiven Gruppe und bestand aus der Kombination von SAM-6 und LM-1. Die behandelten Karzinomzellen zeigten eine Proliferationshemmung von 67,2%. Allerdings zeigt SAM-6 auch als Monosubstanz eine Aktivität von etwa 60%, sodass der durch Kombination gewonnene Effekt klein ist. Dennoch kann eine Kombination in Hinsicht auf eventuelle Resistenzentwicklung und weitere Aspekte doch sinnvoll sein, wie weiter unten noch besprochen wird. Synergistische Cocktails, wie die Kombination aus NORM-2 und PM-2 zeigen den besten Wirkungszuwachs, bergen aber auch ein gewisses Risiko. Denn sollte es im Rahmen von Anpassungsvorgängen im Tumor zum Verlust eines Antigens kommen, so würde das potentiell zu einer dramatischen Abnahme der Antikörper-Wirkung führen (de Kruif et al., 2006). Deshalb bieten sich vor allem synergistische Cocktails an, deren Einzelaktivitäten relativ hoch sind. Das wäre beispielsweise der Fall für die Kombination aus LM-1 und PM-1 mit einer Gesamtaktivität von 50%.

Kombinationen mit LM-1 können darüber hinaus als besonders günstig gesehen werden, da diese am häufigsten synergistische Effekte zeigten (4/8 Kombinationen). Nur ein Cocktail war inhibitorisch. Interessanterweise handelte es sich dabei um die Kombination aus LM-1 und PM-2, einem Antikörper, der seinerseits in anderen Kombinationen auch vor allem synergistisch war (3/6). Diese zwei Antikörper scheinen einen ähnlichen Mechanismus zu besitzen, der sich von den anderen Antikörpern unterscheidet, und deshalb in der Kombination mit diesen so wirksam ist. Gemeinsam scheinen sie sich vielmehr zu hemmen.

Für diese inhibitorischen Kombinationen sind verschiedene Ursachen denkbar: Zum einen können sich Antikörper funktionell antagonisieren. Das wäre beispielsweise der Fall, wenn ein Antikörper zum Zellzyklusarrest in G_1 führen würde, ein anderer Antikörper aber erst in einer späteren Phase wirken würde. Genau das fand in präklinischen Versuchsreihen bei der Kombination von Antiöstrogenen und Chemotherapeutika in der Behandlung von Mammakarzinomen statt. Tamoxifen führte hier zum Arrest in G_1 , während die simultan verabreichte Chemotherapie ihre Wirkung in der M-Phase nicht mehr entfalten konnte (Osborne et al., 1989). Es ist auch denkbar, dass Antikörper um ein Target konkurrieren und sich auf diese Art in ihrer Bindung am Rezeptor behindern. Das kann auch auf molekularer Ebene stattfinden, indem am selben Rezeptor gebundene Antikörper ein für die Apoptoseinduktion erforderliches Crosslinking verhindern. Grundsätzlich muss auch in Betracht gezogen werden, dass *in vitro* Antikörper untereinander binden und präzipitieren können und damit zur Apoptoseinduktion nicht mehr zur Verfügung stehen. Inwiefern dieser Mechanismus auch *in vivo* relevant ist, muss in weiteren Untersuchungen geklärt werden,

damit eventuell untereinander präzipitierende Antikörper nacheinander und nicht als Cocktail appliziert werden.

Interessant war, dass sich keine günstigen Effekte (additiv/ synergistisch) einstellten, wenn Antikörper miteinander kombiniert wurden, die aus ein und demselben Patienten isoliert wurden. Diese Beobachtungen können dafür sprechen, dass die humorale Tumormunität in diesen Patienten nicht optimal zusammengesetzt war. Das würde Cocktails aus humanen Antikörpern noch attraktiver machen, da sich hier die Möglichkeit bietet, die besten menschlichen Antikörper neu zu arrangieren, damit auch Patienten mit insuffizienter Tumormunität geholfen werden kann.

Schon heute profitieren Tumorkranke von den Neuerungen der Targeted Therapy. Gerade die Therapie mit monoklonalen Antikörpern brachte entscheidende Vorteile sowohl in der Reduktion von Nebenwirkungen als auch für das Gesamtüberleben der Patienten. Doch ließe sich die Effektivität dieser neuen Substanzen entscheidend verbessern, wenn man beginnen würde, sinnvollen Kombinationen zielgerichteter Medikamenten einzusetzen. Gerade in Cocktails aus verschiedenen Antikörpern sehen einige Autoren den entscheidenden nächsten Schritt hin zu einer individualisierten und wirksameren onkologischen Therapie (Dancey und Chen, 2006; Glassy und McKnight, 2005; Vitetta und Ghetie, 2006).

Die Gründe für solch eine Einschätzung sind vielfältig: Zum einen ist die Therapie mit Cocktails eine Antwort auf die ausgeprägte Heterogenität eines Tumors. Diese Heterogenität gehört zu den Kerneigenschaften jeden Tumors (Hanahan und Weinberg, 2000) und stellt eine wichtige Limitation der Targeted Therapy dar. Denn wird eine Zielstruktur nicht gleichmäßig innerhalb eines Tumors exprimiert, so wird eine Monotherapie immer zur Selektion der rezeptor-negativen Subpopulation führen und bestenfalls die Ausbreitung des Tumors verzögern. Das Ziel einer Kombinationstherapie muss daher sein, möglichst alle Zellen einer Population zu erreichen. Dabei ist es nicht zwingend notwendig, Cocktails zu finden, deren Rezeptoren von allen Zellen koexprimiert werden, auch wenn dies wohl das effektivste wäre. (Glassy und McKnight, 2005; Mukerjee et al., 1999) Es ist vielmehr möglich, mit einer Therapie gegen mehrere Tumorantigene die Anzahl der erreichten Zellen auszudehnen und damit soviel Tumorerheterogenität wie möglich zu eliminieren.

Ein weiterer Vorteil einer Therapie mit Cocktails aus Antikörpern stellt die gesteigerte Zytotoxizität dieser Kombinationen dar. Wie die vorliegende Arbeit zeigen konnte, kann die Aktivität eines Cocktails sowohl additiv als auch synergistisch gesteigert sein. Grundsätzlich kommen folgende Mechanismen in Frage. Cocktails können mehrere Zielstrukturen

gleichzeitig binden, zelluläre Kompensationsvorgänge hemmen und Resistenzen gegen Monosubstanzen verhindern. Solch eine Kombination kann zur Apoptose der Zelle führen, auch wenn die Monosubstanzen allein nur antiproliferativ gewirkt haben (Dancey und Chen, 2006). Diese Resistenzverhinderung ist von entscheidender Bedeutung. Tumorzellen sind nämlich alles andere als passive Zielstrukturen, die nur darauf warten, von einem Antikörper zerstört zu werden (Stevens und Glatstein, 1996). Antigen-Antikörper Komplexe könne von der Zelle abgeschieden werden (sog. shedding) oder auch internalisiert werden und damit als Target verschwinden. Dass letzteres nicht immer von Nachteil sein muss, zeigt das Beispiel SAM-6, in dem gerade die Internalisierung die Toxizität erst vermittelt. Eine Kombinations-Therapie erhöht in jedem Fall den Druck auf die Zelle und kann die unerwünschten Anpassungsvorgänge im besten Fall verhindern.

Darüber hinaus handelt es sich bei Antikörpern um Moleküle, die in der Lage sind weitere Immunmechanismen zur Beseitigung eines Tumors zu aktivieren. Dazu gehören klassischerweise die antibody-dependent cellular cytotoxicity (ADCC) und die complement-dependent cellular cytotoxicity (CDCC). Für letzt genannte konnte bereits in den frühen 80er Jahren synergistische Steigerungen erzielt werden, wenn man Kombinationen einsetzte (Hellstrom et al., 1981). Nach Glassy et al. besteht die ideale Situation darin, Kombinationen zu verwenden, in denen die Antikörper unterschiedliche Aspekte der Immunantwort aktivieren, wie die Komplementkaskade einerseits und Apoptoseinduktion andererseits (Glassy und Koda, 2002; Glassy und McKnight, 2005).

Der wichtigste Vorteil einer Therapie mit mehreren Antikörpern gleichzeitig liegt jedoch in dem Konzept der Immuntherapie selbst. Das Immunsystem kennt keine monoklonalen Strategien, die physiologisch wären. Monoklonale Gammopathien sind immer ein Hinweis auf pathologische Prozesse wie Autoimmunität oder dysfunktionale B-Zellen. Die effektivste humorale Antwort ist stets polyklonal. Was sich in Millionen von Jahren Evolution als erfolgreich erwiesen hat, muss auch für eine „künstliche“ Immuntherapie gelten. Das trifft insbesondere für eine Therapie mit humanen Antikörpern zu. Die natürliche Antikörperantwort auf Tumorzellen ist nicht monoklonal sondern mindestens oligoklonal. Das zeigen alle bisher unternommen Untersuchungen. (Brändlein et al., 2003b; Kirman et al., 2002; Koda et al., 1990; Stockert et al., 1998) Die nächste Generation der Antikörper - Immuntherapie wird deshalb die natürliche Situation besser nachempfinden, indem Cocktails monoklonaler Antikörper verabreicht werden (Glassy und McKnight, 2005).

In der Literatur finden sich bisher nur wenige, vor allem präklinische Daten zur Antikörper-Kombinationstherapie. Die hier kombinierten Antikörper richten sich in erster Linie gegen bekannte, tumorassoziierte Antigene. Nahta et al. konnten beispielsweise zeigen, dass Panituzumab, ein neuartiger anti-Her2neu Antikörper in Kombination mit dem herkömmlichen Trastuzumab bei Brustkrebszellen synergistisch Apoptose induziert (Nahta et al., 2004). Analog zu diesen Ergebnissen konnten auch zwei Antikörper gegen den EGF Rezeptor günstige Effekte bei Gliomzellen aufweisen (Perera et al., 2005). Für Pankreaskarzinomzellen konnte im Mausmodell synergistische Effekte erzielt werden, wenn Antikörper gegen Her2neu und den EGF Rezeptor kombiniert wurden (Larbouret et al., 2007). Für dieselbe Tumorentität konnten ähnliche Ergebnisse mit einem Cocktail aus Cetuximab und dem anti-VEGF2 Antikörper DC101 beobachtet werden (Tonra et al., 2006). Ein Cocktail gegen das embryonale Antigen Tenascin konnte zur einer additiven Anreicherung von Antikörpern im Tumorbett von Kolonkarzinom-Mausmodellen führen (Petronzelli et al., 2005). Aber auch für diagnostische Zwecke können Cocktails erfolgreich genutzt werden, wie es exemplarisch für das Melanom gezeigt werden konnte (Pacifico et al., 2006).

Klinische Daten zur Antikörper-Kombinationstherapie sind fast nicht vorhanden. Zwei randomisierte Studien laufen derzeit zum kolorektalen Karzinom, in denen eine Kombination von Bevacizumab und Cetuximab mit und ohne Chemotherapie getestet wird (BOND-2 trail; Cancer and Leukemia Group B/SWOG 80405 trail). Für die erstgenante Studie liegen bereits erste, vorläufige Ergebnisse vor. Dabei erhöhte sich das klinische Ansprechen bei Hinzunahme von Bevacizumab zu Cetuximab von 11% auf 23% (RR), mit Chemotherapie sogar auf 38%. Die Zeit bis zur Tumorprogression konnte ebenfalls von vier Monate auf 8,5 Monate verlängert werden (Chung und Saltz, 2005; Saltz L et al., 2005b). Daten zum Gesamtüberleben liegen noch nicht vor. Es ist dabei zu beachten, dass es sich hier nur um eine kleine Studie mit insgesamt 74 Patienten handelt. Interessanterweise waren 90% der Patienten bereits intensiv mit Chemotherapie vorbehandelt, sodass die Kombination zusätzlich als Alternativtherapie für Chemotherapie-refraktäre Patienten gesehen werden kann. Unerwartete, schwere Nebenwirkungen traten nicht auf (Chung und Saltz, 2005). Es ist darüber hinaus bemerkenswert, dass die Kombination der beiden Antikörper etwa das gleiche Ansprechen besitzt, wie Cetuximab und das Chemotherapeutikum Irenotecan (beide ~23%), nur mit dem Unterschied, dass es in der Antikörpergruppe keine Chemotherapie- assoziierten Nebenwirkungen gab wie Diarrhoe, Neutropenie, Fatigue oder Übelkeit, lediglich ein Akne ähnlicher Hautausschlag konnte bei 20 % der Patienten beobachtet werden (Saltz L et al.,

2005a). Das lässt die Hoffnung zu, dass zukünftige Tumortherapien tatsächlich nebenwirkungsärmer zu gestalten sind.

Auch für Patientinnen mit metastasiertem Mammakarzinom wird derzeit eine Antikörper-Kombination in einer kleinen Phase I/II Studie getestet. Dabei handelt es sich um den anti-Her2neu Antikörper Trastuzumab, sowie den oben bereits erwähnten Bevacizumab. Beide konnten in verschiedenen Studien mit teilweise großen Patientenzahlen ihre Wirksamkeit als Monosubstanz in Kombination mit Chemotherapie beweisen (Miller et al., 2005; Slamon et al., 2001). In vorläufigen Analysen konnte nun eine Kombination der beiden Antikörper Ansprechraten von über 50% erreichen, sodass verschiedene Anschlussstudien sowohl für das metastasierte Mammakarzinom als auch für adjuvante Stadien geplant sind (Lin und Rugo, 2007; Miller et al., 2007). Allerdings scheint die Trastuzumab induzierte Kardiomyopathie in dieser Kombination mit Bevacizumab häufiger aufzutreten (Widakowich et al., 2007), sodass zunächst Zurückhaltung in der Bewertung dieser frühen Ergebnisse geboten ist.

Für weitere klinische Studien bleiben allerdings auch noch andere Herausforderungen. So sind viele neue Substanzen von unterschiedlichen pharmazeutischen Herstellern entwickelt worden, deren Zusammenarbeit nicht immer geradlinig ist. Das erschwert die Planung neuer Kombinationsstudien zusätzlich (Dancy und Chen, 2006). Dazu kommen Schwierigkeiten in der Zulassung kombinierter Arzneimittel. Diese müssen in der Regel zunächst als Monosubstanz erfolgreich getestet worden sein. Gerade für Cocktails, die ihre Wirkung erst in der Kombination voll entfalten, könnte das schwierig werden. Glassy et al. schlägt daher vor, für die Zulassung primärer Kombinationstherapien nur Studien zur Toxizität (Phase I) mit den Monosubstanzen durchzuführen, um möglichst rasch Cocktails zum klinischen Einsatz zu bringen (Glassy und McKnight, 2005). Die größte Herausforderung wird allerdings sicher in der Finanzierung dieser neuen Therapien bestehen. Bereits die Monotherapien belasten das Gesundheitssystem schwer. Daher ist es unbedingt notwendig, geeignete Biomarker zu finden, die bereits vor einer möglichen Therapie das Ansprechen des Patienten voraussagen. Das wäre ein entscheidender Schritt hin zu einer personalisierten Krebstherapie, die nicht nur der interindividuellen Tumorerogenität gerecht wird, sondern auch Kosten sparen kann, indem sie unnötige Behandlungen vermeidet.

5. Zusammenfassung

Humane oder humanisierte monoklonale Antikörper haben sich in den letzten zehn Jahren als Arzneimittel etabliert. Sie sind hochspezifisch und zeigen in ihrer Anwendung im Vergleich zu konventionellen Therapeutika viel weniger Nebenwirkungen.

In den 80er Jahren gelang es am Pathologischen Institut der Universität Würzburg eine Reihe von humanen Antikörpern aus Patienten zu isolieren, die hochspezifisch mit malignen Zellen reagieren und diese sowohl *in vitro* als auch im experimentellen Tiermodell selektiv durch Induktion von Apoptose töten.

Um die Wirkungsweise von monoklonalen Antikörpern in der Krebstherapie zu erhöhen, werden die meisten in Kombination mit herkömmlichen Methoden, wie Chemotherapie, eingesetzt. Die ideale Therapieform sind hinsichtlich der Nebenwirkungen sog. Cocktails aus verschiedenen monoklonalen Antikörpern. Allerdings sind die Studien hierzu noch relativ wenig fortgeschritten.

Das Ziel dieser Arbeit war es, in präklinischen Versuchsreihen den Einsatz verschiedener tumorspezifischer humaner monoklonaler Antikörper als Cocktail und in Kombination mit Chemotherapie zu evaluieren. Hierzu wurden neun Antikörper in 32 verschiedenen Antikörperkombinationen hinsichtlich ihrer Auswirkungen auf die *in vitro* Proliferation einer Pankreaskarzinom-Zelllinie untersucht. In Immunfluoreszenz-Aufnahmen ließ sich zeigen, dass kombinierte Antikörper an unterschiedlichen Stellen an der Zelle binden, was eindeutig auf verschiedene Zielstrukturen hinweist. Einige werden dabei endozytiert, während andere auf der Zellmembran bleiben. Interessanterweise ließen sich Kombinationen identifizieren, deren antiproliferative Wirkung sowohl additiv als auch synergistisch ist, das heißt größer als die Summe ihrer Einzelaktivitäten. Wurden Antikörper mit Zytostatika (5-Fluorouracil) kombiniert, so ließen sich ebenfalls synergistische Effekte beobachten. In FACS-Analysen zeigt sich ein gesteigertes Bindungsverhalten der Antikörper, wenn die Zellen mit 5-FU vorinkubiert wurden. Zusammenfassend bestätigen die Ergebnisse dieser Arbeit die Beobachtung, dass die Wirkung humaner monoklonaler Antikörper in Kombination mit Chemotherapie erhöht werden kann. Für die Zukunft humaner Antikörper als Therapiemittel gegen maligne Erkrankungen mag allerdings noch wichtiger sein, dass Antikörper in Cocktails tatsächlich synergistische Wirkung zeigen können.

6. Literaturverzeichnis:

Aouali, N., Eddabra, L., Macadre, J., und Morjani, H. (2005). Immunosuppressors and reversion of multidrug-resistance. *Crit Rev Oncol Hematol* 56, 61-70.

Arends, M. J., Morris, R. G., und Wyllie, A. H. (1990). Apoptosis. The role of the endonuclease. *Am J Pathol* 136, 593-608.

Bertho, A. L., Santiago, M. A., und Coutinho, S. G. (2000). Flow cytometry in the study of cell death. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 95, 429-433.

Boel, E., Verlaan, S., Poppelier, M. J., Westerdaal, N. A., Van Strijp, J. A., und Logtenberg, T. (2000). Functional human monoclonal antibodies of all isotypes constructed from phage display library-derived single-chain Fv antibody fragments. *J Immunol Methods* 239, 153-166.

Branca, M. A. (2005). Multi-kinase inhibitors create buzz at ASCO. *Nat Biotechnol* 23, 639.

Brändlein, S. (2003) Tumormunität: Spezifität, Genetik und Funktion natürlicher IgM-Antikörper, Würzburg. (Dissertation)

Brändlein, S., Beyer, I., Eck, M., Bernhardt, W., Hensel, F., Müller-Hermelink, H. K., und Vollmers, H. P. (2003a). Cysteine-rich fibroblast growth factor receptor 1, a new marker for precancerous epithelial lesions defined by the human monoclonal antibody PAM-1. *Cancer Research* 63, 2052-2061.

Brändlein, S., Eck, M., Strobel, P., Wozniak, E., Müller-Hermelink, H. K., Hensel, F., und Vollmers, H. P. (2004a). PAM-1, a natural human IgM antibody as new tool for detection of breast and prostate precursors. *Human Antibodies* 13, 97-104.

Brändlein, S., Lorenz, J., Ruoff, N., Hensel, F., Beyer, I., Müller, J., Neukam, K., Illert, B., Eck, M., Müller-Hermelink, H. K., und Vollmers, H. P. (2002). Human monoclonal IgM antibodies with apoptotic activity isolated from cancer patients. *Human Antibodies* 11, 107-119.

Brändlein, S., Pohle, T., Ruoff, N., Wozniak, E., Müller-Hermelink, H. K., und Vollmers, H. P. (2003b). Natural IgM antibodies and immunosurveillance mechanisms against epithelial cancer cells in humans. *Cancer Research* 63, 7995-8005.

Brändlein, S., Pohle, T., Vollmers, C., Wozniak, E., Ruoff, N., Müller-Hermelink, H. K., und Vollmers, H. P. (2004b). CFR-1 receptor as target for tumor-specific apoptosis induced by the natural human monoclonal antibody PAM-1. *Oncol Rep* 11, 777-784.

Brändlein, S., Rauschert, N., Rasche, L., Dreykluft, A., Hensel, F., Conzelmann, E., Müller-Hermelink, H. K., und Vollmers, H. P. (2007). The human IgM antibody SAM-6 induces tumor-specific apoptosis with oxidized low-density lipoprotein. *Mol Cancer Ther* 6, 326-333.

Brändlein, S., und Vollmers, H. P. (2004). Natural IgM antibodies, the ignored weapons in tumour immunity. *Histology & Histopathology* 19, 897-905.

Broxterman, H. J., und Georgopapadakou, N. H. (2005). Anticancer therapeutics: "Addictive" targets, multi-targeted drugs, new drug combinations. *Drug Resist Updat* 8, 183-197.

Bundesamt, S. (2005). Todesursachen in Deutschland (Wiesbaden).

Burnet, F. M. (1970). The concept of immunological surveillance. *Prog Exp Tumor Res* 13, 1-27.

Burnet, F. M. (1971). Immunological surveillance in neoplasia. *Transplant Rev* 7, 3-25.

Burtneß, B., Goldwasser, M. A., Flood, W., Mattar, B., und Forastiere, A. A. (2005). Phase III randomized trial of cisplatin plus placebo compared with cisplatin plus cetuximab in metastatic/recurrent head and neck cancer: an Eastern Cooperative Oncology Group study. *J Clin Oncol* 23, 8646-8654.

Carmichael, J., DeGraff, W. G., Gazdar, A. F., Minna, J. D., und Mitchell, J. B. (1987). Evaluation of a tetrazolium-based semiautomated colorimetric assay: assessment of radiosensitivity. *Cancer Res* 47, 943-946.

Carter, P. J. (2006). Potent antibody therapeutics by design. *Nat Rev Immunol* 6, 343-357.

Chung, K. Y., und Saltz, L. B. (2005). Antibody-based therapies for colorectal cancer. *Oncologist* 10, 701-709.

Dancey, J. E., und Chen, H. X. (2006). Strategies for optimizing combinations of molecularly targeted anticancer agents. *Nat Rev Drug Discov* 5, 649-659.

Darzynkiewicz, Z., Bruno, S., Del Bino, G., Gorczyca, W., Hotz, M. A., Lassota, P., and Traganos, F. (1992). Features of apoptotic cells measured by flow cytometry. *Cytometry* *13*, 795-808.

Darzynkiewicz, Z., Smolewski, P., and Bedner, E. (2001). Use of flow and laser scanning cytometry to study mechanisms regulating cell cycle and controlling cell death. *Clin Lab Med* *21*, 857-873.

de Castro Junior, G., Puglisi, F., de Azambuja, E., El Saghir, N. S., and Awada, A. (2006). Angiogenesis and cancer: A cross-talk between basic science and clinical trials (the "do ut des" paradigm). *Crit Rev Oncol Hematol*.

de Kruif, J., Bakker, A. B., Marissen, W. E., Kramer, R. A., Throsby, M., Rupprecht, C. E., and Goudsmit, J. (2006). A Human Monoclonal Antibody Cocktail as a Novel Component of Rabies Postexposure Prophylaxis. *Annu Rev Med*.

Del Duca, D., Werbowetski, T., and Del Maestro, R. F. (2004). Spheroid preparation from hanging drops: characterization of a model of brain tumor invasion. *J Neurooncol* *67*, 295-303.

Doseff, A. I. (2004). Apoptosis: the sculptor of development. *Stem Cells Dev* *13*, 473-483.

Dube, D. H., and Bertozzi, C. R. (2005). Glycans in cancer and inflammation--potential for therapeutics and diagnostics. *Nat Rev Drug Discov* *4*, 477-488.

Eckel, F., Schneider, G., and Schmid, R. M. (2006). Pancreatic cancer: a review of recent advances. *Expert Opin Investig Drugs* *15*, 1395-1410.

Feldman, A. M., Lorell, B. H., and Reis, S. E. (2000). Trastuzumab in the treatment of metastatic breast cancer : anticancer therapy versus cardiotoxicity. *Circulation* *102*, 272-274.

Gerber, H. P., and Ferrara, N. (2005). Pharmacology and pharmacodynamics of bevacizumab as monotherapy or in combination with cytotoxic therapy in preclinical studies. *Cancer Res* *65*, 671-680.

Giles, F. J., Cortes, J. E., and Kantarjian, H. M. (2005). Targeting the kinase activity of the BCR-ABL fusion protein in patients with chronic myeloid leukemia. *Curr Mol Med* *5*, 615-623.

Glassy, M. C., and Koda, K. (2002). The nature of an ideal therapeutic human antibody. *Expert Opin Biol Ther* 2, 1-2.

Glassy, M. C., and McKnight, M. E. (2005). Requirements for human antibody cocktails for oncology. *Expert Opin Biol Ther* 5, 1333-1338.

Gouaze, V., Yu, J. Y., Bleicher, R. J., Han, T. Y., Liu, Y. Y., Wang, H., Gottesman, M. M., Bitterman, A., Giuliano, A. E., and Cabot, M. C. (2004). Overexpression of glucosylceramide synthase and P-glycoprotein in cancer cells selected for resistance to natural product chemotherapy. *Mol Cancer Ther* 3, 633-639.

Guan, H., Jia, S. F., Zhou, Z., Stewart, J., and Kleinerman, E. S. (2005). Herceptin down-regulates HER-2/neu and vascular endothelial growth factor expression and enhances taxol-induced cytotoxicity of human Ewing's sarcoma cells in vitro and in vivo. *Clin Cancer Res* 11, 2008-2017.

Hanahan, D., and Weinberg, R. A. (2000). The hallmarks of cancer. *Cell* 100, 57-70.

Hellstrom, I., Brown, J. P., and Hellstrom, K. E. (1981). Monoclonal antibodies to two determinants of melanoma-antigen p97 act synergistically in complement-dependent cytotoxicity. *J Immunol* 127, 157-160.

Hensel, F., Hermann, R., Brändlein, S., Krenn, V., Schmausser, B., Geis, S., Müller-Hermelink, H. K., and Vollmers, H. P. (2001). Regulation of the new coexpressed CD55 (decay-accelerating factor) receptor on stomach carcinoma cells involved in antibody SC-1-induced apoptosis. *Lab Invest* 81, 1553-1563.

Hensel, F., Hermann, R., Schubert, C., Abe, N., Schmidt, K., Franke, A., Shevchenko, A., Mann, M., Müller-Hermelink, H. K., and Vollmers, H. P. (1999). Characterization of glycosylphosphatidylinositol-linked molecule CD55/decay-accelerating factor as the receptor for antibody SC-1-induced apoptosis. *Cancer Res* 59, 5299-5306.

Huang, X., Halicka, H. D., Traganos, F., Tanaka, T., Kurose, A., and Darzynkiewicz, Z. (2005). Cytometric assessment of DNA damage in relation to cell cycle phase and apoptosis. *Cell Prolif* 38, 223-243.

Huls, G. A., Heijnen, I. A., Cuomo, M. E., Koningsberger, J. C., Wiegman, L., Boel, E., van der Vuurst de Vries, A. R., Loyson, S. A., Helfrich, W., van Berge Henegouwen, G.

P., et al. (1999). A recombinant, fully human monoclonal antibody with antitumor activity constructed from phage-displayed antibody fragments. *Nat Biotechnol* 17, 276-281.

Hurwitz, H., Fehrenbacher, L., Novotny, W., Cartwright, T., Hainsworth, J., Heim, W., Berlin, J., Baron, A., Griffing, S., Holmgren, E., et al. (2004). Bevacizumab plus irinotecan, fluorouracil, and leucovorin for metastatic colorectal cancer. *N Engl J Med* 350, 2335-2342.

Illert, B., Otto, C., Vollmers, H. P., Hensel, F., Thiede, A., und Timmermann, W. (2005a). Human antibody SC-1 reduces disseminated tumor cells in nude mice with human gastric cancer. *Oncology Reports* 13, 765-770.

Illert, B., Timmermann, W., und Thiede, A. (2005b). New concepts in treatment of gastric carcinoma. *Rozhl Chir* 84, 432-435.

Jacks, T., und Weinberg, R. A. (2002). Taking the study of cancer cell survival to a new dimension. *Cell* 111, 923-925.

Kammerer, S. (2006). Primärtherapie mit Imatinib auch nach 54 Monaten hochwirksam. *Der Onkologe* 12 Report.

Kelm, J. M., Diaz Sanchez-Bustamante, C., Ehler, E., Hoerstrup, S. P., Djonov, V., Ittner, L., und Fussenegger, M. (2005). VEGF profiling and angiogenesis in human microtissues. *J Biotechnol* 118, 213-229.

Kelm, J. M., Timmins, N. E., Brown, C. J., Fussenegger, M., und Nielsen, L. K. (2003). Method for generation of homogeneous multicellular tumor spheroids applicable to a wide variety of cell types. *Biotechnol Bioeng* 83, 173-180.

Khazaeli, M. B., Conry, R. M., und LoBuglio, A. F. (1994). Human immune response to monoclonal antibodies. *J Immunother* 15, 42-52.

Kirman, I., Kalantarov, G. F., Lobel, L. I., Hibshoosh, H., Estabrook, A., Canfield, R., und Trakht, I. (2002). Isolation of native human monoclonal autoantibodies to breast cancer. *Hybrid Hybridomics* 21, 405-414.

Kobata, A., und Amano, J. (2005). Altered glycosylation of proteins produced by malignant cells, and application for the diagnosis and immunotherapy of tumours. *Immunol Cell Biol* 83, 429-439.

Koda, K., Glassy, M. C., und Chang, H. R. (1990). Generation of human monoclonal antibodies against colon cancer. *Arch Surg* 125, 1591-1597.

Kohler, G., und Milstein, C. (1975). Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature* 256, 495-497.

Kudo, T., Nakagawa, H., Takahashi, M., Hamaguchi, J., Kamiyama, N., Yokoo, H., Nakanishi, K., Nakagawa, T., Kamiyama, T., Deguchi, K., et al. (2007). N-glycan alterations are associated with drug resistance in human hepatocellular carcinoma. *Mol Cancer* 6, 32.

Kunz-Schughart, L. A., Freyer, J. P., Hofstaedter, F., und Ebner, R. (2004). The use of 3-D cultures for high-throughput screening: the multicellular spheroid model. *J Biomol Screen* 9, 273-285.

Larbouret, C., Robert, B., Navarro-Teulon, I., Thezenas, S., Ladjemi, M. Z., Morisseau, S., Campigna, E., Bibeau, F., Mach, J. P., Pelegrin, A., und Azria, D. (2007). In vivo therapeutic synergism of anti-epidermal growth factor receptor and anti-HER2 monoclonal antibodies against pancreatic carcinomas. *Clin Cancer Res* 13, 3356-3362.

Lin, A., und Rugo, H. S. (2007). The Role of Trastuzumab in Early Stage Breast Cancer: Current Data and Treatment Recommendations. *Curr Treat Options Oncol*.

Lonberg, N. (2005). Human antibodies from transgenic animals. *Nat Biotechnol* 23, 1117-1125.

Lüllmann, H., Mohr, K., und Wehling, M. (2003). *Pharmakologie und Toxikologie* (Stuttgart: Thieme).

Luttmann, W., Bratke, K., Küpper, M. Myrtek, D. (Mai, 2004). *Der Experimentator Immunologie*, 1. Auflage edn (München: Elsevier).

McLeod, E. J., Beischer, A. D., Hill, J. S., und Kaye, A. H. (1997). Multicellular tumor spheroids grown from pancreatic carcinoma cell lines: use as an orthotopic xenograft in athymic nude mice. *Pancreas* 14, 237-248.

Meezan, E., Wu, H. C., Black, P. H., und Robbins, P. W. (1969). Comparative studies on the carbohydrate-containing membrane components of normal and virus-transformed mouse

fibroblasts. II. Separation of glycoproteins and glycopeptides by sephadex chromatography. *Biochemistry* 8, 2518-2524.

Miller, K. D., Chap, L. I., Holmes, F. A., Cobleigh, M. A., Marcom, P. K., Fehrenbacher, L., Dickler, M., Overmoyer, B. A., Reimann, J. D., Sing, A. P., et al. (2005). Randomized phase III trial of capecitabine compared with bevacizumab plus capecitabine in patients with previously treated metastatic breast cancer. *J Clin Oncol* 23, 792-799.

Miller, K. D., Sledge, G. W., und Burstein, H. J. (2007). Angiogenesis inhibition in the treatment of breast cancer: a review of studies presented at the 2006 san antonio breast cancer symposium. *Clin Adv Hematol Oncol* 5, 1-12.

Mirick, G. R., Bratt, B. M., Denardo, S. J., und Denardo, G. L. (2004). A review of human anti-globulin antibody (HAGA, HAMA, HACA, HAHA) responses to monoclonal antibodies. Not four letter words. *Q J Nucl Med Mol Imaging* 48, 251-257.

Monzavi-Karbassi, B., Artaud, C., Jousheghany, F., Hennings, L., Carcel-Trullols, J., Shaaf, S., Korourian, S., und Kieber-Emmons, T. (2005). Reduction of spontaneous metastases through induction of carbohydrate cross-reactive apoptotic antibodies. *J Immunol* 174, 7057-7065.

Mukerjee, S., McKnight, M. E., Nasoff, M., und Glassy, M. C. (1999). Co-expression of tumor antigens and their modulation by pleiotrophic modifiers enhance targeting of human monoclonal antibodies to pancreatic carcinoma. *Hum Antibodies* 9, 9-22.

Nagata, S., Nagase, H., Kawane, K., Mukae, N., und Fukuyama, H. (2003). Degradation of chromosomal DNA during apoptosis. *Cell Death Differ* 10, 108-116.

Nahta, R., Hung, M. C., und Esteva, F. J. (2004). The HER-2-targeting antibodies trastuzumab and pertuzumab synergistically inhibit the survival of breast cancer cells. *Cancer Res* 64, 2343-2346.

Osborne, C. K., Kitten, L., und Arteaga, C. L. (1989). Antagonism of chemotherapy-induced cytotoxicity for human breast cancer cells by antiestrogens. *J Clin Oncol* 7, 710-717.

Pacifico, M. D., Pearl, R. A., and Kupsch, J. M. (2006). The use of a cocktail of single chain Fv antibody fragments to improve the in vitro and in vivo targeting of melanoma. *J Exp Clin Cancer Res* 25, 45-53.

Pallis, A. G., und Mouzas, I. A. (2006). Adjuvant chemotherapy for colon cancer. *Anticancer Res* 26, 4809-4815.

Perera, R. M., Narita, Y., Furnari, F. B., Gan, H. K., Murone, C., Ahlkvist, M., Luwor, R. B., Burgess, A. W., Stockert, E., Jungbluth, A. A., et al. (2005). Treatment of human tumor xenografts with monoclonal antibody 806 in combination with a prototypical epidermal growth factor receptor-specific antibody generates enhanced antitumor activity. *Clin Cancer Res* 11, 6390-6399.

Petronzelli, F., Pelliccia, A., Anastasi, A. M., D'Alessio, V., Albertoni, C., Rosi, A., Leoni, B., De Angelis, C., Paganelli, G., Palombo, G., et al. (2005). Improved tumor targeting by combined use of two antitenascin antibodies. *Clinical Cancer Research* 11, 7137s-7145s.

Phillips, H. J., und Terryberry, J. E. (1957). Counting actively metabolizing tissue cultured cells. *Exp Cell Res* 13, 341-347.

Pohle, T., Brändlein, S., Ruoff, N., Müller-Hermelink, H. K., und Vollmers, H. P. (2004). Lipoptosis: tumor-specific cell death by antibody-induced intracellular lipid accumulation. *Cancer Research* 64, 3900-3906.

Pozarowski, P., Halicka, D. H., und Darzynkiewicz, Z. (2003). Cell cycle effects and caspase-dependent and independent death of HL-60 and Jurkat cells treated with the inhibitor of NF-kappaB parthenolide. *Cell Cycle* 2, 377-383.

Prendergast, G. C., ed. (2004). *Molecular Cancer Therapeutics* (New Jersey: John Wiley & Sons, Inc.).

Rauschert N, Brändlein S, Holzinger E, Hensel F, Müller-Hermelink HK, Vollmers HP (2008). A new tumor-specific variant of GRP78 as target for antibody-based therapy. *Lab Invest.* (4):375-86.

Rini, B. I. (2006). Sorafenib. *Expert Opin Pharmacother* 7, 453-461.

RKI, (2006). *Krebs in Deutschland*, (Vol 5. überarbeitete Ausgabe).

Saif, M. W. (2007). Pancreatic cancer: is this bleak landscape finally changing? Highlights from the '43rd ASCO Annual Meeting'. Chicago, IL, USA. June 1-5, 2007. *Jop* 8, 365-373.

Saltz L, et al. (2005a). Randomized phase II trial of cetuximab/bevacizumab/irinotecan (CBI) versus cetuximab/bevacizumab (CB) in irinotecan refractory colorectal cancer. *J Clin Oncol* 2005;23(16S):Abstract 3508 Virtuelle Präsentation : wwwasco.org.

Saltz L, Lenz H, und al., K. H. e. (2005b). Interim report of randomized phase II trail of cetuximab/bevacizumab/irinotecan (CBI) versus cetuximab/irinotecan (CB) in irinotecan-refractory colorectal cancer. Presented at the American Society of Clinical Oncology Gastrointestinal Symposium, Hollywood, Florida, Jan 27-29, 2005.

Sandler, A., Gray, R., Perry, M. C., Brahmer, J., Schiller, J. H., Dowlati, A., Lilenbaum, R., und Johnson, D. H. (2006). Paclitaxel-carboplatin alone or with bevacizumab for non-small-cell lung cancer. *N Engl J Med* 355, 2542-2550.

Schrama, D., Reisfeld, R. A., und Becker, J. C. (2006). Antibody targeted drugs as cancer therapeutics. *Nat Rev Drug Discov* 5, 147-159.

Sipos, B., Moser, S., Kalthoff, H., Torok, V., Lohr, M., und Kloppel, G. (2003). A comprehensive characterization of pancreatic ductal carcinoma cell lines: towards the establishment of an in vitro research platform. *Virchows Arch* 442, 444-452.

Slamon, D. J., Leyland-Jones, B., Shak, S., Fuchs, H., Paton, V., Bajamonde, A., Fleming, T., Eiermann, W., Wolter, J., Pegram, M., et al. (2001). Use of chemotherapy plus a monoclonal antibody against HER2 for metastatic breast cancer that overexpresses HER2. *N Engl J Med* 344, 783-792.

Slovin, S. F., Keding, S. J., und Ragupathi, G. (2005). Carbohydrate vaccines as immunotherapy for cancer. *Immunol Cell Biol* 83, 418-428.

Smalley, K. S., Lioni, M., und Herlyn, M. (2006). Life isn't flat: taking cancer biology to the next dimension. *In Vitro Cell Dev Biol Anim* 42, 242-247.

Stevens, C. W., und Glatstein, E. (1996). Beware the Medical-Industrial Complex. *Oncologist* 1, IV-V.

Stockert, E., Jager, E., Chen, Y. T., Scanlan, M. J., Gout, I., Karbach, J., Arand, M., Knuth, A., und Old, L. J. (1998). A survey of the humoral immune response of cancer patients to a panel of human tumor antigens. *J Exp Med* 187, 1349-1354.

Tang, X. Q., Bi, H., Feng, J. Q., und Cao, J. G. (2005a). Effect of curcumin on multidrug resistance in resistant human gastric carcinoma cell line SGC7901/VCR. *Acta Pharmacol Sin* 26, 1009-1016.

Tang, X. Q., Feng, J. Q., Chen, J., Chen, P. X., Zhi, J. L., Cui, Y., Guo, R. X., und Yu, H. M. (2005b). Protection of oxidative preconditioning against apoptosis induced by H₂O₂ in PC12 cells: mechanisms via MMP, ROS, and Bcl-2. *Brain Res* 1057, 57-64.

Thomas, L. (1982). On immunosurveillance in human cancer. *Yale J Biol Med* 55, 329-333.

Thuro-Schöffel (2006). Rituximab-Erhaltungstherapie beim follikulären Lymphom - Aussicht auf Heilung. *Der Onkologe* 12.

Timmermann, W., Illert, B., Vollmers, H. P., Krenn, V., Ruckle-Lanz, H., Wilhelm, M., und Thiede, A. (2002). Apoptoseinduktion durch präoperative passive Immuntherapie beim resektablen Magenkarzinom. *Kongressband/Deutsche Gesellschaft für Chirurgie* 119, 396-397.

Tonra, J. R., Deevi, D. S., Corcoran, E., Li, H., Wang, S., Carrick, F. E., und Hicklin, D. J. (2006). Synergistic antitumor effects of combined epidermal growth factor receptor and vascular endothelial growth factor receptor-2 targeted therapy. *Clin Cancer Res* 12, 2197-2207.

Tsao, M. S., Sakurada, A., Cutz, J. C., Zhu, C. Q., Kamel-Reid, S., Squire, J., Lorimer, I., Zhang, T., Liu, N., Daneshmand, M., et al. (2005). Erlotinib in lung cancer - molecular and clinical predictors of outcome. *N Engl J Med* 353, 133-144.

Vitetta, E. S., und Ghetie, V. F. (2006). Immunology. Considering therapeutic antibodies. *Science* 313, 308-309.

Vollmers, H. P., und Brändlein, S. (2005a). Death by stress: natural IgM-induced apoptosis. *Methods & Findings in Experimental & Clinical Pharmacology* 27, 185-191.

Vollmers, H. P., und Brändlein, S. (2005b). The "early birds": natural IgM antibodies and immune surveillance. *Histology & Histopathology* 20, 927-937.

Vollmers, H. P., und Brändlein, S. (2006a). Natural IgM antibodies: from parias to parvenus. *Histol Histopathol* 21, 1355-1366.

Vollmers, H. P., und Brändlein, S. (2006b). Natural IgM antibodies: the orphaned molecules in immune surveillance. *Adv Drug Deliv Rev* 58, 755-765.

Vollmers, H. P., und Brändlein, S. (2005). Monoklonale Antikörper. *Der Onkologe* 11, 494-501.

Vollmers, H. P., O'Connor, R., Muller, J., Kirchner, T., und Müller-Hermelink, H. K. (1989). SC-1, a functional human monoclonal antibody against autologous stomach carcinoma cells. *Cancer Res* 49, 2471-2476.

Vollmers, H. P., Timmermann, W., Hensel, F., Illert, B., Thiede, A., und Müller-Hermelink, H. K. (2000). Adjuvant immunotherapy of stomach carcinoma with antibody-induced apoptosis. *Zentralbl Chir* 125 *Suppl* 1, 37-40.

Widakowich, C., de Azambuja, E., Gil, T., Cardoso, F., Dinh, P., Awada, A., und Piccart-Gebhart, M. (2007). Molecular targeted therapies in breast cancer: Where are we now? *Int J Biochem Cell Biol* 39, 1375-1387.

7. Abkürzungsverzeichnis:

5-FU	5-Fluorouracil
A	Absorption
A. bidest.	Aqua bidestillata
BSA	Bovines Serumalbumin
DAB	3,3'-Diaminobenzidin
DMSO	Dimethylsufoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
ELISA	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
FCS	Fetal Calf Serum
FITC	Fluoreszeinisothiocyanat
HAMAs	human anti-mouse antibodies
IgM	Immunglobulin M
MTT	Assay zur Untersuchung der Zellproliferation (3-(4,5- Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid)
PBS	Phosphate buffered saline
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	rounds per minute
RR	relative response
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
λ	Wellenlänge
μg	Mikrogramm
mg	Milligramm
g	Gramm
μl	Mikroliter
ml	Milliliter
l	Liter
n. b.	nicht bekannt
nm	Nanometer
μm	Mikrometer
min	Minute
$^{\circ}\text{C}$	Grad Celsius

Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von Mai 2005 bis Oktober 2007 im Pathologischen Institut der Universität Würzburg in der Arbeitsgruppe um Herrn Prof. Dr. H.P. Vollmers angefertigt. Bei allen beteiligten Personen möchte ich mich herzlich bedanken:

An erster Stelle gilt mein Dank meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. H.P. Vollmers für die Überlassung dieses interessanten Themas, der hervorragenden Unterstützung während der Arbeit und dass er meine Freude am wissenschaftlichen Arbeiten geweckt hat.

Frau Prof. K. Ullrichs aus der Chirurgischen Klinik I des Universitätsklinikums Würzburg danke ich für die Übernahme des Koreferats.

Ganz besonders herzlich danke ich Frau Dr. rer. nat. Stephanie Brändlein für ihren jederzeit kompetenten Rat, ihre gute Ideen, sowie für die Korrektur des Manuskripts.

Frau Dr. rer. nat. Nicole Rauschert danke ich für die große Hilfe, die Sie mir während der gemeinsamen Zeit in der Pathologie war.

Miriam Eckstein und Kerstin Müller danke ich für die geduldige Einarbeitung in die Methoden, sowie für ihre Hilfe im Laboralltag.

Ich möchte mich weiterhin bei allen Mitarbeitern des Pathologischen Instituts bedanken, die mich bei meiner Arbeit unterstützt haben. Insbesondere danke ich Herrn Dr. B. Schmausser für die guten Gespräche und die gemeinsamen Projekte.

Bei Herrn Prof. Ilya Trakht möchte ich mich herzlich für die Möglichkeit bedanken, in seinem Labor an der Columbia Universität in New York eine lehrreiche und gute Zeit verbracht zu haben.

Schließlich möchte ich mich bei meinen Eltern dafür bedanken, dass sie mir Studium und Promotion ermöglichten und mich in jeder Hinsicht unterstützen.

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name Leo Rasche
Geburtsdatum 25.02.1980
Geburtsort Berlin
Anschrift Konradstr. 5
97072 Würzburg
Tel.: 0931/4605336
Staatsangehörigkeit deutsch
Familienstand ledig

Schulbildung

1992 bis 1999 Erich Hoepner Oberschule, Berlin
Abschluß: Allgemeine Hochschulreife

Hochschulausbildung

SS 2002 bis WS 2003/04 Vorklinisches Studium an der Julius-Maximilians-Universität Würzburg

1. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung am 05.04.2004 mit der Note „gut“ bestanden

SS 2004 bis SS 2007 Klinisches Studium an der Universität Würzburg
August 2007 bis Juli 2008 Praktisches Jahr an der Universitätsklinik Würzburg
(Wahlfach Klinische Mikrobiologie und Infektiologie)

2. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung am 13.11.2008 mit der Note „sehr gut“ bestanden

Seit 01/2009 Assistenzarzt in der Hämatologie und Onkologie der Medizinischen Klinik II des Universitätsklinikums Würzburg

Würzburg, 03.05.2009

