

Aus dem Pathologischen Institut

der Universität Würzburg

Vorstand: Professor Dr. med. A. Rosenwald

**Funktionelle Analyse des  
tumorspezifischen IgG Antikörpers BARB-4**

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde der

Medizinischen Fakultät

der

Julius-Maximilians-Universität Würzburg

vorgelegt von

Kilian Rückl

aus Eibelstadt

Würzburg, April 2012

Referent: Univ.-Prof. Dr. Andreas Rosenwald, Allg. Pathologie und path. Anatomie

Korreferent: Univ.-Prof. Dr. Frank Weidemann, Innere Medizin

Dekan: Univ.-Prof. Dr. Matthias Frosch

Tag der mündlichen Prüfung: 20. November 2012

Der Promovend ist Arzt.

1. Einleitung .....	2
1.1. Die maligne Neoplasie .....	2
1.1.1. Epidemiologie in Deutschland .....	2
1.1.2. Aktuelle therapeutische Optionen .....	4
1.1.3. Metastasierung.....	4
1.2. Krebs und Immunsystem .....	5
1.2.1. Erworbene Immunität .....	6
1.2.2. Innate Immunität.....	7
1.2.2.a Immunglobuline der innaten Immunität.....	7
1.2.2.b Immunglobuline der Klasse IgG.....	8
1.3. Hybridomatechnologie .....	8
1.3.1. Murine Immunglobuline.....	9
1.3.2. Chimäre Immunglobuline .....	9
1.3.3. Humanisierte Immunglobuline.....	10
1.3.4. Humane Immunglobuline.....	10
1.3.4.a Der humane Antikörper SC-1.....	13
1.3.4.b Der humane Antikörper PAM-1.....	13
1.3.4.c Der humane Antikörper SAM-6 .....	14
1.3.4.d Der humane Antikörper BARB-4.....	15
1.4. Ziel der Arbeit .....	15
2. Material und Methoden .....	17
2.1. Material .....	17
2.1.1. Geräte .....	17
2.1.2. Verbrauchsmaterial .....	19
2.1.3. Medien und Pufferlösungen.....	22

2.1.4. Zelllinien .....	25
2.1.5. Hard- und Software .....	25
2.2. Methoden .....	26
2.2.1. Zellkulturen.....	26
2.2.1.a Kultivierung der Karzinomzellen.....	26
2.2.1.b Zellsplitting .....	26
2.2.1.c Zellzählung .....	27
2.2.2. Immunperoxidasefärbung von Paraffinschnitten .....	27
2.2.2.a Technik der Immunperoxidasefärbung .....	27
2.2.2.b Biotinylierung von BARB-4 und ChromPure IgG .....	28
2.2.2.c Immunperoxidasefärbung von Paraffinschnitten.....	29
2.2.3. Durchflußzytometrie .....	30
2.2.3.a FACS-Analyse mit BXPC-3 und BARB-4 .....	32
2.2.4. Endozytose-Assay .....	33
2.2.4.a Prinzip der Fluoreszenzmikroskopie.....	33
2.2.4.b Konfokales Mikroskop .....	33
2.2.4.c Proteinbestimmung mit der BCA-Methode.....	34
2.2.4.d FPLC (Fast Protein Liquid Chromatography) .....	34
2.2.4.e Markierung des BARB-4 mit Orange 548-Farbstoff.....	35
2.2.4.f Endozytose .....	37
2.2.5. Adhäsions-Assay .....	37
2.2.6. Motilitäts-Assay .....	38
3. Ergebnisse.....	40
3.1. Bindungsverhalten.....	40
3.1.1. Immunperoxidasefärbung von Paraffinschnitten .....	40

3.1.2. Durchflußzytometrie .....	44
3.1.3. Endozytose-Assay .....	45
3.2. Funktions-Assays .....	46
3.2.1. Adhäsions-Assay .....	46
3.2.2. Motilitäts-Assay .....	48
4. Diskussion .....	51
4.1. Ergebnisse.....	51
4.2. Biologie einer Neoplasie .....	51
4.3. Die Rolle des Immunsystems.....	52
4.4. Immunglobuline der natürlichen Immunität.....	54
4.5. Der humane Antikörper BARB-4.....	54
4.5.1. Bindungsspezifität .....	55
4.5.2. Das Antigen TAF15.....	56
4.5.3. BARB-4 als Immunglobulin der Klasse IgG.....	56
4.6. Invasion und Metastasierung .....	58
4.7. Zelladhäsion und Zellmotilität.....	62
4.8. Die Rolle des TAF15 bei Zelladhäsion und Zellmotilität .....	63
4.9. Endozytose.....	64
4.10. Notwendigkeit neuer Behandlungsstrategien .....	65
5. Zusammenfassung .....	69
6. Literaturverzeichnis .....	72
6.1. Verwendete Literatur .....	72
6.2. Publikationen, Poster .....	78
7. Abkürzungsverzeichnis .....	79

# 1. Einleitung

---

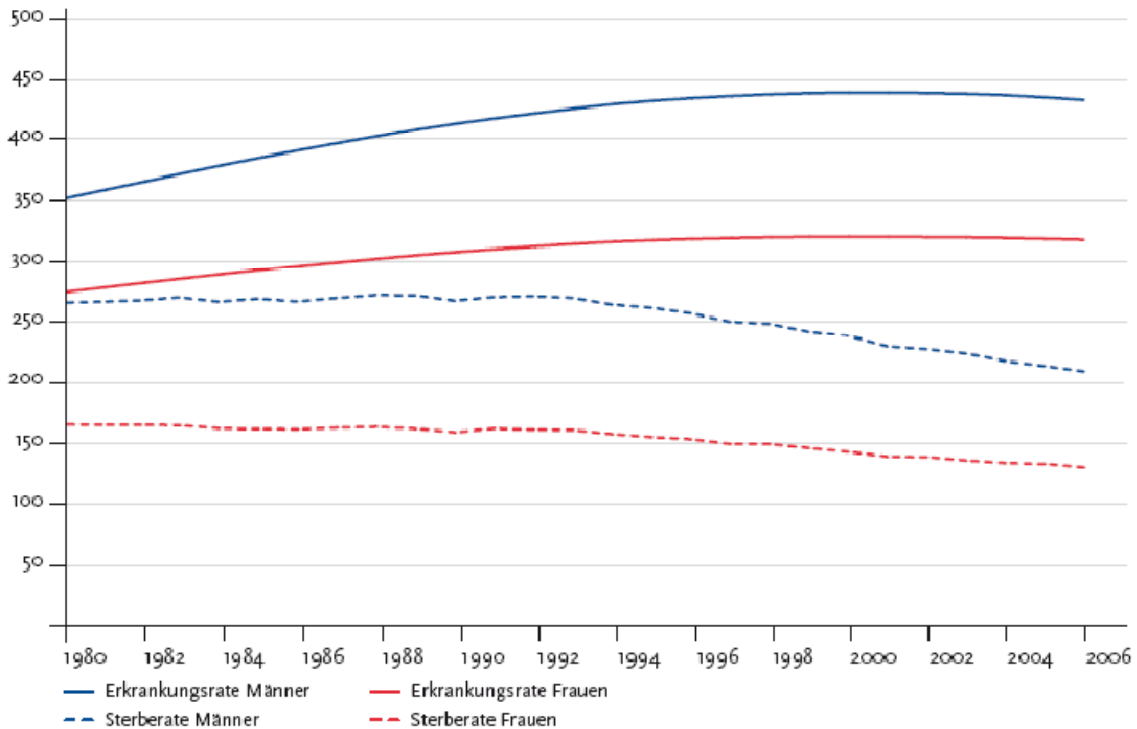
# 1. Einleitung

## 1.1. Die maligne Neoplasie

Der menschliche Organismus besteht aus einem unvorstellbar komplexen Zusammenspiel von über  $10^{14}$  Zellen mit unterschiedlichsten Aufgaben und Charakteristiken. Wachstum und Regeneration dieser Zellen unterliegen vielfältigen Steuermechanismen, die Proliferation und Apoptose überwachen. Strukturelle Schäden besonders auf Ebene der DNA können Störungen in den metabolischen Steuermechanismen verursachen, die in wenigen Fällen zu unkontrolliertem Wachstum einzelner Zellen führen. Diese Zellen erreichen über weitere Mutationen als so genannte maligne Neoplasien die Fähigkeit zum gewebsinvasiven Wachstum und können zum Untergang des ganzen Organismus führen.

### 1.1.1. Epidemiologie in Deutschland

Im Laufe des letzten Jahrhunderts ist in Deutschland, nach Erkrankungen des Herz-Kreislauf-Systems mit 356.462 Todesfällen im Jahr 2009, das Tumorleiden zur häufigsten Todesursache avanciert. So hat nach aktuellen Schätzungen des Robert-Koch-Instituts die Neuerkrankungsrate in Deutschland zwischen 1980 und 2006 bei Frauen um 35% und bei Männern um mehr als 80% zugenommen (RKI 2010 (a); RKI 2010 (b)). Den Zahlen des Statistischen Bundesamts zufolge starben im Jahr 2009 216.128 Menschen an bösartigen Neubildungen oder ihren Folgen, davon 99.417 Frauen und 116.711 Männer (Bundesamt 2010 (a); Bundesamt 2010 (b)). Die demographische Alterung der Bevölkerung sowie sensitivere Methoden in der Diagnostik sind Gründe für die Zunahme der festgestellten Krebserkrankungen. Dies zeigt sich auch an der Lebenszeitprävalenz für Krebserkrankungen, die derzeit bei ca. 38% für Frauen und 47% bei Männern liegt. Abbildung 1 zeigt die Entwicklung der Erkrankungs- und Sterberaten durch Krebserkrankungen von 1980 bis 2006.



**Abbildung 1: Altersstandardisierte Neuerkrankungs- und Sterberaten in Deutschland 1980 – 2006, ICD-10 (International Statistical Classification of Diseases and Related Health Problems) 000 – 97 ohne C44, Fälle pro 100.000.** Zunahme der Erkrankungsraten bei gleichzeitiger Abnahme der Sterbehäufigkeit (RKI 2010 (a)).

Diese Zahlen verdeutlichen die enorme Bedeutung, die der Bekämpfung von malignen Erkrankungen zuteil wird. Einen Teilerfolg bisheriger Anstrengungen in Forschung und Klinik erkennt man an dem zum Teil erheblichen Anstieg der Lebenserwartung bei bestimmten Krebserkrankungen in den letzten 25 Jahren (Sporn 1997). Dem Bericht des Robert-Koch-Instituts vom Februar 2010 zufolge lag die relative 5-Jahres-Überlebenswahrscheinlichkeit zu Beginn der 1980er Jahre bei 50% für Frauen bzw. 35% für Männer. Bei Diagnosestellung zwischen 2000 und 2004 konnte dagegen schon mit einer Überlebensrate von 60% bzw. 53% gerechnet werden (RKI 2010 (a)). Hierbei handelt es sich um gemittelte Werte einzelner Tumorentitäten, bei zum Teil großer Variabilität.



### **1.1.2. Aktuelle therapeutische Optionen**

Für die kurative wie palliative Krebstherapie steht eine Vielzahl unterschiedlicher Therapiemöglichkeiten zur Verfügung. Neben dem chirurgischen Eingriff mit dem Ziel der mikroskopisch vollständigen Entfernung des Tumors (R0), kann auch die Strahlentherapie, die zumeist Elektronen- oder Alphastrahler verwendet, eingesetzt werden. Beide Verfahren eignen sich vornehmlich zur lokalen Therapie. Als bisher einziges Werkzeug zur systemischen Bekämpfung von Tumorerkrankungen wird die systemische Chemotherapie eingesetzt. Dabei besteht die besondere Anforderung an die Chemotherapeutika, effektiv die veränderten Zellen abzutöten und dabei möglichst wenig toxische Wirkung auf die gesunden Zellen des Körpers zu entfalten. Die Schwierigkeit entsteht durch die annähernd gleiche biologische Struktur der gesunden wie der veränderten Zellen, was eine gezielte Bekämpfung, wie etwa bei der antibiotischen oder der antimykotischen Therapie, deutlich erschwert. Nutzt man wenig spezifische Eigenschaften wie beispielweise die erhöhte Zellteilungsrate als Angriffspunkt, müssen entsprechend starke Nebenwirkungen besonders an Organen mit physiologisch schnellen Teilungsraten, wie etwa Zellen der Haut oder des Blutbildungssystems, in Kauf genommen werden. Die Entwicklung suffizienter Chemotherapeutika zielt demnach besonders auf eine verbesserte Selektivität ab.

In der heutigen Krebstherapie werden die genannten Möglichkeiten meist im Rahmen eines erprobten Behandlungskonzepts in definierten Kombinationen eingesetzt. Eine häufige Anwendung erfährt beispielsweise das Prinzip der neoadjuvanten oder adjuvanten Chemo- oder Radiochemotherapie (Deutsche Krebsgesellschaft e.V. 2008; Renz-Polster and Krautzig 2008).

### **1.1.3. Metastasierung**

Neben den Komplikationen des lokalen Wachstums mit Kompression des umliegenden Gewebes sowie der Entstehung von Thromben mit den Folgen einer Thrombembolie ist besonders die Metastasierung Grund für den letalen Ausgang einer Krebserkrankung (Sporn 1996). Diese in der Tumorentwicklung meist spät auftretende Eigenschaft erfordert vielfältige Mutationen der Krebszellen, die ihnen eine

Einwanderung in Blutgefäße, das Überleben im Blutstrom und zuletzt die Bildung einer neuen Zellkolonie in fremdem Gewebe ermöglichen. Wenn die Tumorzellen diese Hürden überwunden haben, entzieht sich der Tumor meist einer suffizienten, lokalen Therapie mit chirurgischen oder strahlentherapeutischen Maßnahmen und es muss häufig zu einem palliativen Behandlungsschema übergewechselt werden. Trotz aller Fortschritte in Diagnostik, chirurgischen, strahlen-, sowie lokalen und systemischen chemotherapeutischen Methoden ist die häufigste Todesursache bei Krebserkrankungen die Entstehung gegen konventionelle Chemotherapeutika resistenter Metastasen. Diese Resistenz resultiert unter Anderem aus der biologischen Heterogenität der metastasierten Krebszellkolonien zu den ursprünglichen Krebszellen, die mitunter aus der Auseinandersetzung mit dem neuen Umgebungsmilieu der Metastase resultiert. Nachdem bisherige Verbesserungen in der Therapie nur stückweise zur Prognose-Verbesserung führten, liegen besonders Möglichkeiten zur Inhibierung der Metastasierung im Fokus des Interesses der kurativen Krebstherapie (Fidler 2003). Bedeutende Erkenntnisse für das Erreichen dieses Ziels könnten durch eine genaue Beobachtung des menschlichen Körpers und seiner Abwehrmechanismen gewonnen werden.

### **1.2. Krebs und Immunsystem**

Die Zellen des Körpers sind im Laufe eines Lebens ständig exogenen und endogenen Schädigungen unterworfen, die zu Strangbrüchen und Radikalbildungen, und in der Folge zu Mutationen der DNA führen. Viele dieser Mutationen bleiben ohne Wirkung, da sie sich auf nicht-translozierten Bereichen der DNA befinden. Zudem stehen der Zelle vielfache Möglichkeiten zur Reparatur schadhafter Stellen zur Verfügung. Sollten alle Versuche einer Wiederherstellung scheitern, bleibt der Zelle als letzte Instanz noch die Einleitung einer kontrollierten Apoptose, die ohne Ausschwemmung von Zellbestandteilen in den Interzellularraum, und damit ohne inflammatorischer Reaktion, erfolgt.

Bei rund  $10^{14}$  Zellen des Körpers ist es nicht verwunderlich, dass ein wenn auch äußerst seltenes Versagen der oben genannten Reparaturvorgänge immer noch eine

beträchtliche Zahl an Mutationen hervorruft. Viele dieser Neoplasien erreichen nur eine mikroskopische Ausbreitung, da eine für das weitere Wachstum notwendige Mutation ausbleibt. Dennoch würde man eine weit höhere Zahl an malignen Neoplasien erwarten. Dass dies nicht so ist, verdanken wir unserem Immunsystem (Greaves 2007).

### **1.2.1. Erworbene Immunität**

Das Immunsystem des Menschen unterteilt sich in die angeborene und die erworbene Immunantwort. Beide Systeme greifen auf eine Kombination aus humoralen und zellulären Komponenten zurück.

Die tragende Säule der evolutionsgeschichtlich jüngeren, erworbenen Immunantwort ist die Interaktion zwischen T-Helfer-Zellen und B-Zellen. Die B-Lymphozyten zeigen sich verantwortlich für die Produktion der Antikörper, sowie der Bildung eines immunologischen Gedächtnisses im Falle eines Antigenkontaktes des Organismus. Die Genese der B-Lymphozyten beginnt mit der Reifung im Knochenmark. Die Kombination verschiedener Introns (Rearrangement), sowie Deletionen und Insertionen bei der Reifung von Lymphozyten im Knochenmark und Thymus fördern eine breite Variabilität der Antigenbindungsstellen (Kim, Park et al. 2000; Schroeder and Cavacini 2010). Im Thymus und in der Milz unterlaufen die B-Lymphozyten anschließend eine Selektion nach „self“ und „non-self“, in der Lymphozyten, die gegen körpereigene Strukturen gerichtet sind, über eine sofortige Apoptose-Einleitung beseitigt werden (Brigl and Brenner 2004). Die übrigen Lymphozyten wandern durch die Blutbahn und in die verschiedenen Gewebe und warten auf den Kontakt mit Ihrem spezifischen Antigen. Nach erfolgtem Kontakt der CD (Cluster of Differentiation) 4+-T-Zellen mit einem Antigen werden im Beisein von MHC (Major Histocompatibility Complex) 1 oder MHC2 Bindungsproteinen die entsprechenden B-Lymphozyten aktiviert. Dabei werden zunächst vor allem Immunglobuline der Klasse IgM produziert. Bei einem weiteren Kontakt mit dem auslösenden Antigen oder im Verlauf einer längeren Exposition findet neben der Affinitätsreifung durch weitere Mutation und Selektion auch ein so genannter Klassensprung zu IgG statt. Die bedeutenden Unterschiede zur innat

Immunität bestehen also in einer fortschreitenden Affinitätsreifung bezüglich spezifischer Antigenstrukturen, sowie in der Ausbildung eines Immungedächtnisses, in Form von meist lebenslang in der Blutbahn zirkulierenden B-Gedächtnis-Zellen.

### **1.2.2. Innate Immunität**

Die in der Evolution schon früh auftauchende angeborene oder innate Immunität stellt eine Sofort-Reaktion auf unspezifische körperfremde Strukturen dar. Wichtige Akteure dieser Immunität sind Zellen mit der Fähigkeit zur Endozytose und Lyse der Fremdsbstanzen mittels Lysosomen. Besonders Makrophagen oder dendritische Zellen binden über so genannte *Toll like receptors* (TLR`s) an sich häufig wiederholende, körperfremde Kohlenhydrat- und Glykolipid-Verbindungen, so genannte „pattern“. Diese Strukturen sind im Verlauf der Evolution, anders als zum Beispiel Proteinverbindungen, weitgehend konstant geblieben und versprechen so ein gutes Ansprechverhalten des Immunsystems, auch ohne vorherigen Kontakt mit dem Antigen (Heine and Lien 2003). Zusätzlich folgt einem Kontakt mit den Fremdstrukturen die Freisetzung von Zytokinen, Interleukinen und anderen Mediatoren.

#### **1.2.2.a Immunglobuline der innaten Immunität**

Wie bei der erworbenen spielen auch bei der innaten Immunität Antikörper eine wichtige Rolle. Die natürlichen Immunglobuline erhalten ihre genetische Variabilität ebenfalls aus Rearrangement und Mutationen, erfahren allerdings keine weitere Affinitätsreifung wie sie bei Antikörpern der adaptiven Immunität vorkommt. Sie werden daher auch als Keimbahn-kodiert (engl.: germ-line) bezeichnet (Murphy, Travers et al. 2008). Immunglobuline der innaten Immunität haben nur eine gering ausgeprägte Affinität, binden dafür aber an relativ viele unterschiedliche Strukturen gleichzeitig. Dies qualifiziert sie besonders für eine rasche Abwehr körperfremder Strukturen oder körpereigener Abfallprodukte wie etwa Zellreste. Die Immunglobuline der innaten Immunität werden vorwiegend durch CD5+-B-Lymphozyten gebildet. Eine vorherige Aktivierung durch CD4+-T-Zellen ist nicht nötig (Brandlein and Vollmers 2004). Die Isolierung und Analyse von tumorspezifischen Antikörper ergab, dass

natürliche Antikörper vornehmlich der Klasse der IgM zuzuordnen sind und sowohl bei Erkrankten als auch bei Gesunden vorkommen (Brandlein, Pohle et al. 2003; Brandlein and Vollmers 2004).

Für die natürliche und erworbene Immunität spielen Antikörper eine entscheidende Rolle bei der Opsonierung von Fremdstrukturen, der Aktivierung des Komplementsystems und der Initiation der Migration weiterer, antiinfektiöser Partikel wie Granulozyten und Makrophagen. Die Aufgaben der natürlichen Antikörper schließen zudem auch die Erkennung von mutierten Zellen ein (Casali and Schettino 1996; Vollmers and Brandlein 2007). Zusätzlich haben einige dieser Antikörper, wie etwa der humane Antikörper SC-1, die Fähigkeit, durch direkte Bindung an Zelloberflächenrezeptoren deren Eintritt in die Apoptose zu induzieren (Vollmers, Hensel et al. 1998; Hensel, Hermann et al. 2001). Aus diesen Beobachtungen heraus erkannte man, welche große Bedeutung die innate Immunität in der Abwehr von Tumorzellen inne hat. Diese Erkenntnis revolutionierte das Verständnis der innaten Immunität in den 1990er Jahren grundlegend (Vollmers and Brandlein 2005).

### **1.2.2.b Immunglobuline der Klasse IgG**

Bisher wurden vor allem Immunglobuline der Klasse IgM für die Abwehr maligner Zellen verantwortlich gemacht (Brandlein, Pohle et al. 2003). Besonders interessant ist daher die Isolierung eines tumorspezifischen IgG, des BARB-4 Antikörpers. Er ist der erste Antikörper vom Typ IgG, dessen Zielprotein und dessen Auswirkungen auf Tumorzellen innerhalb unserer Arbeitsgruppe genauer untersucht wurden (Schatz, Brandlein et al. 2010).

### **1.3. Hybridomatechnologie**

Die gewonnenen Erkenntnisse über die Arbeitsweise des innaten Immunsystems führten zu neuen therapeutischen Ansätzen. Durch die immense Verbesserung der Selektivität gegenüber klassischen Chemotherapeutika ist eine verbesserte Wirkung gegen die Krebszellen bei gleichzeitig verminderter Toxizität und deren Folgen auf den

Organismus möglich. Dies qualifiziert den Einsatz von Antikörpern als einen der erfolgversprechendsten Therapieansätze der modernen Krebstherapie.

Dennoch mussten zunächst einige Rückschläge hingenommen werden, ehe die ersten erfolgreichen Präparate die Marktreife erlangten. Entscheidende Weiterentwicklungen gelangen hier insbesondere in der Einführung neuer Herstellungsverfahren.

### **1.3.1. Murine Immunglobuline**

Die ersten erfolgreich isolierten Antikörper stammten von Mäusen, die mit menschlichen Krebszellen immunisiert wurden. Da das murine Immunsystem nahezu alle Oberflächenstrukturen dieser Zellen als „fremd“ erkannte, konnte man mit dieser Methode keine selektiv gegen veränderte Oberflächenstrukturen gerichtete Antikörper erwarten. Es zeigte sich zudem bald, dass die so gewonnenen Antikörper nur begrenzt einsetzbar sind, da das menschliche Immunsystem eigene Antikörper gegen die therapeutisch eingesetzten so genannten „murinen“ Antikörper, auch als „human anti-mouse antibodies“ (HAMA) bezeichnet, entwickelte (Tjandra, Ramadi et al. 1990). Ein Arzneimittel in klinischer Anwendung ist Yttrium-90-markiertes Ibritumomab-Tiuxetan (Handelsname Zevalin®) das zur Behandlung von Patienten mit rezidivierenden oder refraktären, Rituximab insensiblen, CD20-positiven follikulären Non-Hodgkin-Lymphom (NHL) vom B-Zell-Typ zugelassen wurde.

### **1.3.2. Chimäre Immunglobuline**

Die Inaktivierung der eingesetzten murinen Antikörper durch HAMA's schränkte den Erfolg der Immuntherapie zunächst deutlich ein. Eine Lösungsmöglichkeit stellte die Verwendung humanisierter Immunglobuline dar, bei der mit Hilfe von gentechnischen Methoden Teile der murinen Antikörperstruktur durch humane Aminosäuren ersetzt werden. Hierdurch konnte die Host-versus-Graft-Reaktion zum Teil abgemildert werden (Glennie and van de Winkel 2003). Cetuximab (Handelsname Erbitux®) ist ein Vertreter dieser Gruppe. Der gegen EGFR (epidermal growth factor receptor) bindende Antikörper wird in der Klinik bei kolorektalen Karzinomen eingesetzt. Durch die Bindung an EGFR, der bei diesen Tumorzellen häufig überexprimiert ist, kann die

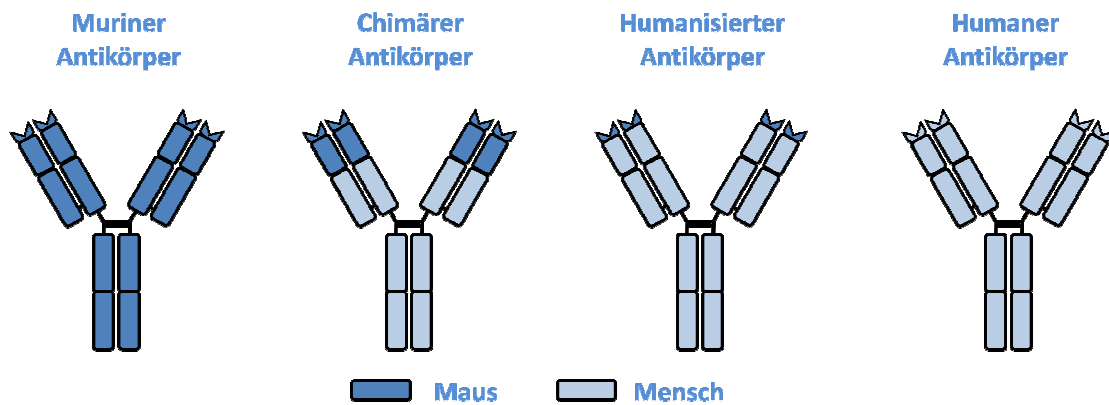
Ausbreitung des Tumors vermindert werden (Holmer 2004; Humblet 2004). Ein weiterer wichtiger Vertreter der chimären Immunglobuline ist der TNF (Tumor Nekrose Faktor) spezifische Antikörper Infliximab (Handelsname Remicade®), der ein wichtiges Arzneimittel bei fortgeschrittener rheumatoider Arthritis darstellt (Singh, Christensen et al. 2009).

### **1.3.3. Humanisierte Immunglobuline**

Die Weiterentwicklung dieser Idee führte zur Produktion der humanisierten Immunglobuline, bei denen nur noch die antigenbindenden CDR (Complementarity Determining Region)-Regionen von der Maus abstammen. Hierdurch konnte der Anteil der immunfremden Aminosäuresequenzen auf unter 10% reduziert werden, was eine nochmals verbesserte Toleranz des Organismus gegenüber den therapeutischen Antikörpern mit sich brachte (Glennie and van de Winkel 2003). Ein Vertreter dieser Gruppe ist der Trastuzumab (Handelsname Herceptin®). Dieser, gegen HER2/neu (Human Epidermal Growth Factor Receptor 2, ErbB2) bindende Antikörper kann zur Behandlung von Brustkrebs eingesetzt werden, wenn das Zielprotein überexprimiert ist. Dies kann in einem Labortest anhand einer Biopsie festgestellt werden und ist bei etwa einem Viertel aller Frauen mit Brustkrebs zutreffend (Viani, Afonso et al. 2007). Mit Einführung von Trastuzumab konnten deutliche Fortschritte in der Bekämpfung des Brustkrebs erzielt werden (Nanda 2007).

### **1.3.4. Humane Immunglobuline**

Die endgültige Lösung der Problematik der Immunreaktion gegen die therapeutisch verabreichten Antikörper stellte die Herstellung rein humaner Immunglobuline dar. Abbildung 2 zeigt schematisch den jeweiligen Anteil muriner bzw. humaner Proteinsequenzen der synthetisierten Immunglobuline.



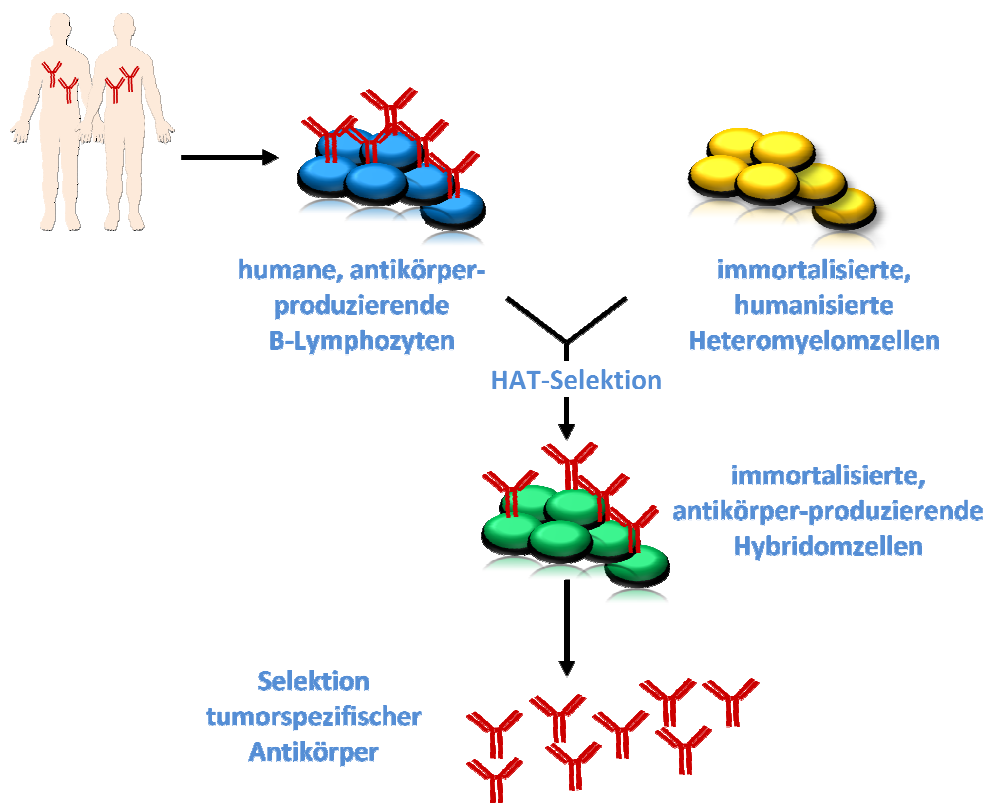
**Abbildung 2: Schematische Übersicht über die nach unterschiedlichen Methoden generierten Antikörper.** Auf dem Weg vom murinen zum humanen Antikörper nimmt der Anteil der von der Maus stammenden Proteinsequenzen (blau) zu Gunsten humaner Proteinsequenzen (hellblau) ab. Grafik nach (Glennie and van de Winkel 2003).

Die Gewinnung rein humaner Antikörper gestaltet sich zunächst schwierig und es war lediglich möglich, Antikörper gegen schon bekannte Antigenstrukturen bzw. tumorspezifische Antigene zu synthetisieren. Ein gängiges Verfahren stellt das Phage-Display dar, mit dem allerdings auch TNF-Faktor-spezifische, nicht explizit tumorspezifische Antikörper produziert werden. Der humane IgG Antikörper Adalimumab (Handelsname Humira®) ist ein potentes TNF-spezifisches Immunsuppressivum, das nach dieser Methode entstand (Hoogenboom 2005; Singh, Christensen et al. 2009). Eine Weiterentwicklung ist die auf cDNA-Bibliotheken des Phage-Display basierende, 1995 von Sahin vorgestellte SEREX-Methode (Serological Analysis of Autologous Tumor Antigens by Recombinant cDNA Expression Cloning, dt: Serologische Identifikation von Antigenen durch rekombinantes Expressionsklonieren), bei der mit Hilfe einer Impfung von Escherichia coli-Bakterien mittels Phagen und anschließender Selektion antikörperproduzierender Klone tumorspezifische Antikörper isoliert werden. Der Nachteil dieses Verfahrens liegt unter Anderem in dem relativ hohen technischen Aufwand (Sahin, Tureci et al. 1995; Jager 2007).

Ein Durchbruch gelang durch die Nutzung der Hybridomatechnologie zur Herstellung humaner Antikörpern. Mit dieser Technik ist es möglich, immortale Zellen, so genannte „Triome“, zu generieren, die rein humane Antikörper produzieren. Dazu werden



zunächst, durch klassische Hybridisierung nach Köhler und Milstein, B-Lymphozyten mit murinen Myelomzellen fusioniert und aus den entstandenen Heteromyelomzellen HAT (Hypoxanthin-Aminopterin-Tymin)-sensitive Zellen isoliert (Köhler and Milstein 1975). Durch erneute Fusion der Heteromyelomzellen mit antikörperproduzierenden B-Lymphozyten, die entweder von Patienten mit Tumorerkrankungen oder von gesunden Probanden gewonnen wurden, und erneute Selektion der HAT-sensitiven Zellreihen gelingt die Herstellung immortaler, Antikörper-produzierender Hybridomzellen (Vollmers, O'Connor et al. 1989; Faller, Vollmers et al. 1990). Abbildung 3 zeigt schematisch die wichtigsten Schritte der Antikörpersynthese mittels Hybridomatechnologie.



**Abbildung 3: Schematische Darstellung der Hybridomatechnologie zur Gewinnung natürlicher, humaner Antikörper.** Von Patienten gewonnene, Antikörper-produzierende B-Lymphozyten werden mit immortalisierten Heteromyelomzellen fusioniert. Durch die sogenannte HAT (Hypoxanthin-Aminopterin-Tymin)-Selektion werden immortalisierte Hybridomzellen selektioniert. Ein ELSIA (Enzyme-linked immunosorbant assay) erlaubt das Auslesen Antikörper-produzierender Hybridomzellen, welche nachfolgend auf ihre Tumorspezifität untersucht werden können. Grafik nach (Brandlein, Pohle et al. 2003).

Dieses Verfahren ermöglicht nicht nur die Isolierung von rein humanen Antikörpern, sondern letztendlich auch die Identifizierung bisher unbekannter tumorspezifischer Oberflächenantigene. Einige dieser Immunglobuline sollen im Folgenden vorgestellt werden.

### **1.3.4.a Der humane Antikörper SC-1**

Der humane IgM-Antikörper SC-1 stammt von einem Patienten mit Siegelringkarzinom des Magens und bindet an eine Isoform des CD55/DAF-Rezeptors (decay-accelerating factor). CD55/DAF stellt einen Schutz vor dem Verdau durch autologes Komplement dar. Die SC-1 spezifische Isoform kommt exklusiv bei Magenkarzinomen vor (Hensel, Hermann et al. 1999; Vollmers and Brandlein 2002). Die Bindung des Antikörpers SC-1 an den modifizierten Rezeptor führt zur Einleitung der Apoptose. Nachfolgende Untersuchungen zeigten einen starken Anstieg von intrazellulärem  $Ca^{2+}$  sowie eine vermehrte Aktivität von Caspase 6, einem Enzym, dass am Verdau des Zytoskeletts beteiligt ist. Das Fehlen sonst typischer Apoptose-Mechanismen wie der Annexin Flip-Flop und die Spaltung von PARP (Poly-Adenosindiphosphat-Ribosepolymerase) weist auf einen bisher unbekanntem Apoptoseweg hin (Hensel, Hermann et al. 2001). In einem klinischen Heilversuch an der Universitätsklinik Würzburg konnten bei Patienten mit Magenkarzinom bereits Hinweise auf eine mögliche Überlegenheit der SC-1-Antikörper-Therapie gegenüber dem Standardschema festgestellt werden. Bei einmaliger Applikation, 24 oder 48 Stunden präoperativ, wurde nicht nur eine deutliche Zunahme der Apoptoserate im Resektat, sondern auch eine deutlich erhöhte 3-Jahresüberlebensrate im Vergleich zu Kontrollgruppe erzielt. (Vollmers, Zimmermann et al. 1998; Illert, Otto et al. 2005; Illert, Timmermann et al. 2005).

### **1.3.4.b Der humane Antikörper PAM-1**

Der monoklonale Antikörper PAM-1 könnte vor allem für diagnostische Zwecke eine Bedeutung haben. Seinem korrespondierenden Antigen, dem CFR (cysteine-rich receptor for fibroblast growth factors)-1-Rezeptor, werden normalerweise regulierende Aufgaben in der Zellproliferation zugesprochen (Burrus, Zuber et al. 1992). Die PAM-1 spezifische Isoform findet sich unter anderem auf der Zelloberfläche

von dysplastischen und malignen Adenomzellen des Magens. Eine deutliche Akkumulation dieses Rezeptors konnte insbesondere bei *Helicobacter pylori*-assoziierter Gastritis und bei der Barrett-Dysplasie des unteren Ösophagus nachgewiesen werden (Hensel, Brandlein et al. 2001). Weitere Analysen ergaben, dass diese Isoform nahezu bei allen Präkanzerosen und manifesten Tumoren epithelialen Ursprungs zu finden ist, so unter anderem auch bei entarteten Zellen aus Brust und Prostata, nicht jedoch auf gesunden Zellen (Brandlein, Eck et al. 2004). Nach Fragmentierung des PAM-1 durch Pepsinspaltung und Herstellung eines rekombinanten IgG ist zudem eine apoptotische Wirkung zu beobachten, die zusätzlich therapeutische Einsatzmöglichkeiten verspricht (Brandlein, Beyer et al. 2003; Brandlein, Pohle et al. 2004).

### **1.3.4.c Der humane Antikörper SAM-6**

SAM-6 ist ebenfalls ein humaner IgM Antikörper, welcher aus einem Patienten mit Magenkarzinom isoliert werden konnte. Der monoklonale Antikörper bindet an eine tumorspezifische Variante des Hitzeschockprotein GRP78 (Glucose-Regulated-Protein). Obwohl GRP78 im Körper omnipräsent ist, führen die ständigen Stressbedingungen durch oxidative Minderversorgung oder veränderte pH-Werte, denen Tumorzellen stets ausgesetzt sind, zu einer Überexprimierung und zudem zu strukturellen Aberrationen des Proteins. Diese beiden Veränderungen qualifizieren das Oberflächenantigen als ideales Ziel einer Immuntherapie. (Brandlein, Rauschert et al. 2007; Rauschert, Brandlein et al. 2008). Darüber hinaus führt die Bindung von SAM-6 an die tumorspezifische Variante GRP78 zur Auslösung der so genannten Lipoptose (Pohle, Brandlein et al. 2004), einer für diesen Antikörper spezifischen Apoptoseform (Vollmers, Hensel et al. 1998). Der Antikörper bindet neben GRP78 auch an die Lipoproteine LDL (Low Density Lipoprotein) und VLDL (Very Low Density Lipoprotein). Durch die Endozytose der entstandenen Komplexe, steigt die intrazelluläre Lipidkonzentration auf zytotoxische Werte an und induziert eine Caspasenkette, die im apoptotischen Zelltod mündet (Rauschert, Brandlein et al. 2008).

#### **1.3.4.d Der humane Antikörper BARB-4**

Der humane monoklonale IgG Antikörper BARB-4 stammte, ebenso wie der humane Antikörper SC-1, von einem Patienten mit einem Siegelringkarzinom des Magens. Das Zielprotein ist eine tumorspezifische Variante des TAF15 (TATA box binding-protein-associated factor 15), ein Transkriptions-Regulations-Protein aus der FET (FUS, EWS, TAF15)-Familie, der auch FUS (Fused in Sarcoma Protein) und EWS (Ewing Sarcoma Protein) angehören. Diese Proteine kommen normalerweise im Cytoplasma vor und sind unter anderem an der Transkription, dem Splicen und Transport von mRNA (Messenger Ribonukleinsäure) beteiligt. Außerdem lassen neuere Untersuchungen eine mögliche Rolle bei Adhäsions- und Zellmigrationsvorgängen vermuten (Andersson, Stahlberg et al. 2008). In malignen Zellen scheint eine veränderte Variante des TAF15 auf der Zelloberfläche zu existieren. So konnte diese Variante auf Magenkarzinom-, Melanom-, und Pankreaskarzinomzellen nachgewiesen werden, nicht jedoch auf gesundem Gewebe. Zudem scheint diese Isoform des TAF-15 eine veränderte biologische Funktion zu haben. Die biochemischen Folgen der Bindung des Antikörpers BARB-4 an TAF-15 auf maligne Zellen könnten BARB-4 als potentiellen Kandidaten einer tumoriziden Therapie qualifizieren.

#### **1.4. Ziel der Arbeit**

Als bisher einziger Vertreter der Immunglobuline G unter den bereits beschriebenen, Keimbahn-kodierten Antikörpern ist die Wirkungsweise und Struktur von BARB-4 von besonderem Interesse. Im Rahmen dieser Arbeit wird neben dem Nachweis der Bindung des Antikörpers an die Oberflächen mutierter Zellen und der Darstellung des zeitlichen Verlaufs, die biologische Wirkung in vitro im Mittelpunkt des Interesses stehen, da sie nicht zuletzt die Möglichkeiten eines eventuellen therapeutischen Einsatzes bestimmt. Als wichtige Schritte auf dem Weg zur Metastasierung wird hier im Speziellen der Einfluss von BARB-4 auf Adhäsion und Migration maligner Zellen untersucht.

## **2. Material und Methoden**

---

## 2. Material und Methoden

### 2.1. Material

#### 2.1.1. Geräte

Tabelle 1: Geräte

Geräte	Hersteller
Aqua-bidest.-Anlage Milli-Q Plus PF	Millipore, Eschborn
Photometer Gene Quant Pro	Amersham Bioscience, Freiburg
Brutschrank	Heraeus Thermotech, Hanau
FACScan	Becton Dickinson Bioscience, Franklin Lakes, USA
Fotoapparat	Sony, Köln
FPLC Fraction Collector FRAC-100	GE Healthcare, München
FPLC Liquid Chromatography Controller LCC-500	GE Healthcare, München
FPLC Motor Valve MV-7	GE Healthcare, München
FPLC Pump P-50	GE Healthcare, München
FPLC Pump P-500	GE Healthcare, München
FPLC Recorder REC-112	GE Healthcare, München
FPLC Schreiber LKB REC102	Pharmacia Biosystems, Freiburg
FPLC Single Path Monitor UV-1, Control Unit and Optical Unit	GE Healthcare, München
FPLC Superloop 30ml	GE Healthcare, München
FPLC UV-Meßstelle LKB Optical Unit UV1	Pharmacia Biosystems, Freiburg
FPLC-Anlage	Pharmacia Biosystems, Freiburg
FPLC Fraktionierer LKB FRAC 100	Pharmacia Biosystems, Freiburg

Konfokales System: Mikroskop Leica DMRE/ UV	Leica Microsystems AG, Wetzlar
Konfokales System: Innova Ion Laser System	Innova Coherent Inc., Santa Clara, USA
Mikroliter Pipette #710	Hamilton Company, Reno, Nevada
Mikroskop Labovert Leica	Leica Microsystems AG, Wetzlar
Mikroskop Leica DMIL	Leica Microsystems AG, Wetzlar
Mikroskop Olympus BX50	Olympus Deutschland GmbH, Hamburg
Multipipette	Eppendorf, Hamburg
Neubauer-Zählkammer	Hartenstein, Würzburg
Objektträger	Langenbrinck, Emmendingen
pH-Meter inolab pH Level 1	WTW, Weilheim i.OB
Pipetten (10, 100, 200, 1000 µl)	Gilson, Middleton, USA
Pipettierhelfer accu-jet	Brand, Wertheim am Main
Rüttelplatte/Mischgerät Unimax 1010	Heidolph Instruments, Schwabach
Sterilbank Lamin Air HLB 2448	Heraeus, Hanau
Vortex Mixer NeoLab 7-2020	Bender/Hobein, Zürich
Waage MC 1	Sartorius, Göttingen
Wasserbad WB10	Memmert, Schwabach
Zentrifuge Biofuge fresco	Kendro, Langenselbold
Zentrifuge Minifuge	Heraeus, Hanau

### 2.1.2. Verbrauchsmaterial

Tabelle 2: Verbrauchsmittel

Verbrauchsmittel	Firma
24 well-plate	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
Aceton	Roth, Karlsruhe
Agarose	Roth, Karlsruhe
Aqua dest.	Eigene Herstellung
Aqua bidest.	Eigene Herstellung
Aquatex Eindeckmedium	Merck, Darmstadt
BCA-Lösung A	Perbio Sience Deutschland GmbH, Bonn
Blotting-Papier (0,37mm, 190g/m <sup>2</sup> )	Schleicher & Schuell, Dassel
BSA (Albumine bovine, fraction V)	Roth, Karlsruhe
DAB (3,3'-Diaminobenzidin)-Tablette SigmaFAST™ DAB Tablets	Sigma, München
DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole) Eindeckmedium	Sigma, München
Ethanol	Sigma, München
EZ-Link Maleimide-PEO Solid Phase Biotinylation Kit	Pierce, Rockford, USA
FACS-Flow-Puffer	Becton Dickinson Bioscience, Franklin Lakes, USA
Fetales Rinderserum (FCS)	PAA, Wien, Österreich
FITC-Farbstoff Fluoresceinisothiocyanat	Sigma, München
Fluoro Taq FITC Conjugation Kit	Sigma, München
Fluoreszenz Mounting Medium	Dako, Carpinteria, USA
Fluoreszenz Orange 548 reaktive	Fluka Production GmbH, Buchs, Schweiz
Glutaraldehyd-Lösung	Sigma, München



Hämalaun	Merck, Darmstadt
Isopropanol	Merck, Darmstadt
L-Glutamin	PAA, Wien
Magermilchpulver	Drogeriemarkt
NAP <sup>TM</sup> 10 Sephadex <sup>TM</sup> G25 HiPrep <sup>TM</sup> 26/10 Desalting	GE Healthcare, München
Penicillin/Streptomycin	GIBCO, Karlsruhe
FACS-Probenröhrchen	Becton Dickinson Bioscience, Franklin Lakes, USA
RPMI-1640 Medium	PAA Laboratories, Linz, Österreich
Trypanblau	Sigma, Steinheim
Trypsin/EDTA	PAA Laboratories, Linz, Österreich
Wasserstoffperoxidtablette H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Sigma, München
Xylol	Roth, Karlsruhe
Zellkulturflaschen	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen

Tabelle 3: Hersteller der verwendeten Antikörper

	Antikörper	Hersteller
<b>Unkonjugiert</b>	Anti Cytokeratin CAM 5.2	Becton Dickinson Bioscience, Franklin Lakes, USA
	BARB-4	Eigene Herstellung
<b>Isotypen</b>	ChromPure-IgG human	Dianova, Hamburg
<b>Konjugiert</b>	Rabbit anti-human IgG (FITC-gekoppelt)	Dako, Carpinteria, USA
	Rabbit anti-mouse (HRP-gekoppelt) in Humanserum	Dako, Carpinteria, USA
	Neutravidin 1:100 (HRP-gekoppelt) in PBS-Puffer	Pierce, Rockford, USA

### 2.1.3. Medien und Pufferlösungen

#### RPMI Vollmedium

Kulturmedium für die Zelllinien BXPC-3 und A549, im Folgenden als RPMI Vollmedium bezeichnet.

RPMI 1640

1% (v/v) Glutamin

1% (v/v) Penicillin/Streptomycin

10% (v/v) FCS (Fötales Kälberserum, Fetal Calf Serum)

#### Phosphate Buffered Saline (PBS)

0,137M Natriumchlorid (NaCl)

0,027M Kaliumchlorid (KCl)

0,065M Natriumhydrogenphosphat-dihydrat ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ )

0,015M Kaliumdihydrogenphosphat ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ )

#### BCA (Bicinchoninsäure) Protein Assay

Lösung zur Proteingehaltquantifizierung

Reagenz A                       $\text{BCA}^{\text{TM}}$  Protein Assay Reagent A

Reagenz B                      4% (m/v) Kupfersulfat-pentahydrat ( $\text{Cu}_2\text{SO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ )

Reaktionslösung:            98% (v/v) Reagenz A

   2% (v/v) Reagenz B

### **Lösung für die FPLC (Fast Protein Liquid Chromatography)-Anlage**

#### 0,1M Bicarbonatpuffer

Puffer A: 0,2M Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>

Puffer B: 0,2M NaHCO<sub>3</sub>

40ml Puffer A + 460ml Puffer B

Einstellen der Lösung mittels Salzsäure (HCl) auf pH 9,2 und Zugabe von 2l Aqua bidest.

### **Lösung für die FACS (Fluorescence Activated Cell Scanning)-Analyse**

#### FACS-Puffer

PBS-Puffer (pH 7,4)

0,05% (m/v) Natriumsäure (NaN<sub>3</sub>)

Die Lösung wurde anschließend durch eine Nitrozellulosemembran der Porengröße 0,22µm filtriert.

### **Lösungen der Immunhistochemie**

#### Tris/NaCl

5mM Tris (hydroxymethyl)-aminomethan

140mM NaCl

Aqua bidest.

Der pH Wert der Lösung wurde anschließend mit Salzsäure (HCl) auf pH 7,4 eingestellt.

### Blockade-Lösung

Eingesetzt zur Blockade aktiver Bindungsstellen bei der Immunperoxidase-Färbung der Zytospin-Präparate.

PBS-Puffer (pH 7,4)

3% (m/v) Magermilchpulver

### DAB-Substratlösung

1 Tablette DAB (SigmaFAST™ DAB Tablets)

5ml Leitungswasser

Das Ansetzen der Lösung erfolgte unmittelbar vor Gebrauch.

### Wasserstoffperoxidlösung

1 Tablette H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Wasserstoffperoxid)

5ml Leistungswasser

Das Ansetzen der Lösung erfolgte unmittelbar vor Gebrauch.

### BSA/PBS-Puffer

5mg BSA (Albumine bovine, fraction V)

1ml PBS-Puffer (pH 7,4)

### 2.1.4. Zelllinien

Tabelle 4 zeigt eine Übersicht über die für die jeweiligen Versuche verwendeten Zelllinien und deren Verdopplungszeiten. Nach dem Auftauen aus der Kryokonservierung wurden die Zellkulturen, wie in Abschnitt 2.2.1.a. beschrieben, für circa 30 Zyklen kultiviert, bevor sie durch neue Zelllinien ersetzt wurden.

**Tabelle 4: Übersicht der verwendeten Zelllinien**

Zelllinie	Organ	Histologie	Wachstum	Zellzyklus	Zellsplitting
<b>BXPC-3</b>	Pankreas	Adenokarzinom	Adhärent	24-48h	1:10 alle 3 Tage
<b>A549</b>	Lunge	Karzinom	Adhärent	24-48h	1:10 alle 3-4 Tage

### 2.1.5. Hard- und Software

Die Verarbeitung der Photographien erfolgte mit Adobe Photoshop CS (Adobe Systems Incorporated, San Jose, Kalifornien, USA). Für die Auswertung der FACS-Analysen diente die CellQuest Pro Software mit dem FACScan (Becton Dickinson Bioscience, Franklin Lakes, USA). Die Visualisierung der Dot-Plots erfolgte mit Hilfe von Windows WinMDI 2.8 (Windows Multiple Document Interface for Flow Cytometry, J. Trotter, The Scripps Institute, Flow Cytometry Core Facility, La Jolla, USA).

## **2.2. Methoden**

### **2.2.1. Zellkulturen**

#### **2.2.1.a Kultivierung der Karzinomzellen**

Die für die Versuche verwendeten BXPC-3 Pankreas-Karzinomzellen sowie die A549 Lungen-Karzinomzellen wurden bei 37°C Lufttemperatur und in 7%iger CO<sub>2</sub>-Atmosphäre in Kulturflaschen gezüchtet. Als Medium diente RPMI 1640, welches mit je 1%ig Penicillin und Streptomycin, 20mM L-Glutamin sowie 10%ig fetalem Kälberserum (FCS) versetzt wurde (im Folgenden als RPMI Vollmedium bezeichnet).

#### **2.2.1.b Zellsplitting**

Die verwendeten BXPC-3-Zellen teilen sich im Mittel alle 24 bis 48 Stunden. Um die Anzahl der Zellen pro Kulturflasche nicht über 70% Konfluenz steigen zu lassen und die Zellen damit in einem möglichst optimalen Milieu zu halten, wurde die Zellzahl alle 3-4 Tage um den Faktor 1:10 reduziert. Dieses so genannte Zellsplitting erfolgte stets in steriler Atmosphäre unter einer Sterilbank.

Zunächst wurde der RPMI Vollmedium-Überstand abgesaugt. Die adhärenenten Zellen wurden mit 5ml Trypsin/EDTA versetzt, 3min inkubiert und anschließend vorsichtig durch Schütteln vom Flaschenboden gelöst. Trypsin ist eine Endopeptidase, die die extrazellulären Proteine und damit die Adhäsionsmoleküle hydrolysiert, darüber hinaus aber bei entsprechend kurzer Einwirkzeit die Zellen nicht tötet (Larsson 1993). Durch Zugabe von 10ml RPMI Vollmedium wurden die reaktiven Bindungsstellen des Trypsins blockiert und die Reaktion so gestoppt. Die Suspension wurde zuletzt in ein 50ml Probenröhrchen überführt und bei 1500rpm für 5min zentrifugiert.

Nach dem abermaligen Absaugen des Überstands wurde das Zellpellet mit 10ml Medium resuspendiert und 1ml der Lösung in 30ml RPMI Vollmedium in eine Kulturflasche gegeben.

### 2.2.1.c Zellzählung

Die jeweilige Zellzahl der verwendeten Suspensionen wurde mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer bestimmt. Dazu wurden 20µl der Probe in 180µl 0,5%iger Trypanblau-Lösung als Färbemittel gegeben. Nach gründlichem Vermischen wurde die Zählkammer befüllt und die Zellzahl unter dem Lichtmikroskop ausgezählt.

Trypanblau ist ein anionischer Diazofarbstoff, der Proteine über seine vier Sulfonatgruppen bindet und zur invitro Diagnostik herangezogen wird. Mit Ausnahme von Makrophagen und Fibrozyten wird dieser Vitalfarbstoff von lebenden Zellen nicht aufgenommen, avitale Zellen hingegen werden blau angefärbt. Unter dem Mikroskop bei 400-facher Vergrößerung wurden jeweils die vitalen Zellen aus den 4 abgezeichneten Quadranten ausgezählt und die mittlere Anzahl  $x$  bestimmt. Aus dem Volumenverhältnis der Volumina pro Quadrant von 0,1µl und der Zellsuspension von 1ml, sowie dem Verdünnungsfaktor durch die Färbung mit Trypanblau, errechnet sich für die Zelldichte der Zellsuspension:

$$c = x \text{ Zellen} \times \frac{1 \times 10^{-3}}{1 \times 10^{-7}} \times 10 \text{ ml}^{-1} = x \times 10^5 \text{ Zellen/ml}$$

#### Formel 1: Zellzahlbestimmung in der Neubauer-Zählkammer

Für die weitere Verwendung der Zellen wurden diese für 30 Minuten auf Eis gestellt, damit sich die durch die Trypsinbehandlung geschädigten Oberflächenproteine regenerieren konnten.

## 2.2.2. Immunperoxidasefärbung von Paraffinschnitten

### 2.2.2.a Technik der Immunperoxidasefärbung

Die Immunperoxidase-Färbung stellt ein histochemisches Verfahren zur Darstellung spezifischer Antigen-Antikörper-Bindungen dar, und eignet sich deshalb ausgezeichnet für einen qualitativen Nachweis einer stattgefundenen Bindung des zu untersuchenden Primärantikörpers mit einem Gewebe oder einzelnen Zellen. Dabei nutzt man die enzymatische Umsetzung von 3,3'-Diaminobenzidin (DAB) durch Peroxidasegekoppelte Sekundärantikörper, welche an den  $F_c$ -Teil des zu untersuchenden



Primärantikörper binden. Die Peroxidase setzt Wasserstoffperoxid zu Wasser um und die bei der Reaktion freigesetzten Protonen führen zum Farbumschlag des Chromogens DAB. Eine Braunfärbung des Gewebes beweist damit indirekt gebundene Primärantikörper. Zur Gegenfärbung wurden die Zellen mit Hämalaun, einem blauen Färbemittel, gefärbt (Lang 2006).

### **2.2.2.b Biotinylierung von BARB-4 und ChromPure IgG**

Zur Vorbereitung der Immunperoxidasefärbung von Paraffinschnitten wurde der BARB-4-Antikörper zunächst biotinyliert. Dieses Verfahren, bei dem ein Biotin-markierter Stoff beispielsweise mittels eines Avidin-gekoppelten Farbstoffes sichtbar gemacht wird, ist ein häufig verwendetes Werkzeug der Immunhistochemie (Willey, Sherwood et al. 2008). Für die im Folgenden beschriebenen Schritte wurde das EZ-Link Maleimide-PEO Solid Phase Biotinylation Kit verwendet. Aus diesem stammen auch die verwendeten Lösungen und Materialien.

Der zu biotinylierende Antikörper wurde mit Aqua bidest. auf eine Konzentration von  $c = 1 \text{ mg/ml}$  verdünnt. Je eine SwellGel-Disc aus dem Bestand des oben erwähnten Kits wurde mit  $500\mu\text{l}$  dieser Antikörperlösung versetzt und für 10min auf einem Rüttler vermischt. Nach 30-sekündigem zentrifugieren bei  $500g$  wurde der Überstand abgesaugt und das entstandene Pellet mit  $1\text{ml}$  TBS (Tris-Borat-Natriumchlorid)-Puffer resuspendiert. Dieser Vorgang wurde zwei Mal wiederholt und das Pellet anschließend in  $300\mu\text{l}$  TBS in eine Spin-Column überführt. Nach abermaligem Zentrifugieren bei  $500g$  wurde der Überstand abgesaugt und durch eine TCEP (Tris(2-chlorethyl)phosphat)-TBS-Lösung bestehend aus  $120\mu\text{l}$  TCEP und  $80\mu\text{l}$  TBS-Puffer ersetzt. Der 30-minütigen Inkubation folgten das erneute Zentrifugieren und das fünfmalige Waschen mit TBS-Puffer. Der Inhalt eines Biotin-Microtube wurde in  $200\mu\text{l}$  TBS-Puffer gelöst und  $100\mu\text{l}$  dieser Lösung, zusammen mit  $100\mu\text{l}$  reinem TBS, zur Resuspension des Pellets eingesetzt. Die Lösung wurde anschließend wiederum 30min inkubiert und fünfmalig mit TBS gewaschen. Zur Elution des Antikörpers wurde das Pellet mit  $200\mu\text{l}$  Elutionspuffer, einer Lösung aus 9,5%igem Stock Solution aus dem Kit in TBS, resuspendiert. Während der darauffolgenden Zentrifugierung wurde der Durchfluß mit

dem darin enthaltenden, nun biotinylierten Antikörper abgefangen. Zur dauerhaften Lagerung war das Einfrieren bei  $-20^{\circ}\text{C}$  notwendig. Eine Lagerung im Kühlschrank erlaubt eine Verwendung für circa 4 Wochen nach Herstellung.

### **2.2.2.c Immunperoxidasefärbung von Paraffinschnitten**

Zur Vorbereitung der Paraffinschnitte für die Immunperoxidasefärbung mussten die Präparate vom Paraffin befreit werden. Hierzu wurden die Schnitte zweimal für fünf Minuten mit Xylol 100% versetzt. Nachfolgend wurde die Schnitte in folgender Reihenfolge weiterbehandelt:

2 x 5min Ethanol 100%

5min 70ml Methanol versetzt mit 500 $\mu\text{l}$  Wasserstoffperoxid

2 x 3min Ethanol 90%

2 x 3min Ethanol 80%

2 x 3min Ethanol 70%

Die Schnitte wurden daraufhin für 20min mit Zitronensäure bei  $99^{\circ}\text{C}$  im Wasserbad gekocht und 5min in Tris-NaCl gekühlt. Der 60-minütigen Inkubation mit 0,5% BSA in PBS-Puffer folgte die Waschung mit Tris-NaCl. Der nach Abschnitt 2.2.2.b. biotinylierte BARB-4 bzw. ChromPure IgG, sowie die Anti-Keratin-Positivkontrolle wurden mit einer Konzentration von 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$  zu 100 $\mu\text{l}$  je Schnitt pipettiert und für 30min in einer feuchten Kammer bei  $37^{\circ}\text{C}$  inkubiert. Anschließend erfolgten das dreimalige Waschen mit Tris-NaCl und die 30-minütige Inkubation bei Raumtemperatur mit dem jeweiligen Sekundärantikörper nach Tabelle 5.

**Tabelle 5: Antikörper der Immunperoxidasefärbung von Paraffinschnitten**

Probe	Primärantikörper	Sekundärantikörper
1	ChromPure-IgG human (biotinyliert) (Isotypkontrolle)	Neutravidin (HRP-gekoppelt) 1:100 in PBS-Puffer
2	Anti-Keratin CAM 5.2 (Lunge/Pankreas) (Positiv-Kontrolle)	Rabbit anti-mouse in Humanserum (HRP-gekoppelt)
3	BARB-4 (biotinyliert)	Neutravidin (HRP-gekoppelt) 1:100 in PBS-Puffer

Die Schnitte wurden wiederum dreimal mit Tris-NaCl gewaschen und für 10min in PBS-Puffer gestellt. Das Substrat für die enzymatische Farbreaktion DAB wurde zu je 100µl pro Schnitt für 8min in Dunkelheit inkubiert und nach Überführung in PBS-Puffer mit Aqua dest. gespült. Die Gegenfärbung erfolgte mit 5-minütiger Inkubation in Hämalaun und anschließendem 10-minütigem Spülen unter fließendem Wasser. Die Schnitte wurden anschließend in Aquatex eingedeckt.

### 2.2.3. Durchflußzytometrie

Die Fluorescence Activated Cell Scanning (FACS)-Methode erlaubt nicht nur die Auftrennung von Zellgemischen nach morphologischen Eigenschaften. Bei Zuhilfenahme oberflächenspezifischer, immunologischer Färbungen ermöglicht das Verfahren zudem eine Differenzierung unterschiedlich ausgeprägter Expressionen von Oberflächenproteinen sowie den Nachweis erfolgreicher Antikörper-Antigen-Verbindungen. Bei der FACS-Analyse werden Zelloberflächenantigene durch spezifische Primärantikörper gebunden und durch Fluoreszenzfarbstoff-gekoppelte Sekundärantikörper markiert. Beim Durchlauf durch eine Glaskapillare unter erhöhtem Druck entsteht aus der Zellsuspension ein so genannter Tropfenstrahl, bei dem jeder Tropfen maximal eine Zelle enthält. Die Detektion der Streuung eines auf den Tropfenstrahl fokussierten LASER erlaubt die Rückrechnung auf Zellgröße,

Zellinnenstruktur und Farbstoffgehalt. Dabei beeinflusst die Zellgröße die Vorwärtsstreuung und die Binnenstruktur die Seitwärts-Streuung. Über eine Frequenzverschiebung der Emissionsphotonen des angeregten Fluoreszenzfarbstoffes lässt sich dessen Konzentration berechnen. Die Intensität der Emissionsstrahlung verschobener Wellenlänge ist direkt proportional zur Konzentration des Farbstoffes und damit zur Konzentration des nachzuweisenden Oberflächenantigens (Ormerod 1999). Die Ergebnisse werden in einem so genannten Histogramm, einem statistischen Diagramm, dessen x-Wert den Variablenwert und dessen y-Wert deren Häufigkeit wiedergibt, aufgetragen.

Das verwendete FACScan arbeitet mit einem Argon-Ionen-Laser der Wellenlänge  $\lambda = 488\text{nm}$ . Die Streustrahlung wird über zwei Detektoren erfasst. Drei weitere Detektoren mit unterschiedlichen Filtern erfassen die für den jeweiligen Fluoreszenzfarbstoff spezifische Emissionsstrahlung. Im vorliegenden Versuch wurde mit einem Fluoresceinisothiocyanat (FITC)-Farbstoff gearbeitet (Detektor FL-1). Dieses Fluorochrom bindet im alkalischen Milieu bei pH9-pH10 kovalent an Lysin-Gruppen von Proteinen. Bei einer Anregung durch Licht im Bereich von  $\lambda = 490\text{nm}$  emittiert FITC grünes Licht der Wellenlänge  $\lambda = 530\text{-}550\text{nm}$  (Lang 2006). Die nachfolgende

Tabelle 6 gibt einen Überblick über die installierten Detektoren:

**Tabelle 6: Übersicht über den verwendeten FACScan-Detektor**

Detektor	Filter	Fluoreszenzfarbstoff
SSC	488nm	-
FSC	488nm	-
FL-1	530nm	FITC
FL-2	575nm	Propidiumiodid
FL-3	670nm	Propidiumiodid

### 2.2.3.a FACS-Analyse mit BXPC-3 und BARB-4

Die BXPC-3 Zellen wurden vorsichtig mit Trypsin/EDTA abgelöst, die Zellzahl der Zellsuspension wurde bestimmt, durch entsprechende Verdünnung mit RPMI Vollmedium auf  $c = 2 \times 10^5$  Zellen/ml eingestellt und für 30min auf Eis gestellt.

Je 1ml Zellsuspension wurde daraufhin in ein FACS-Röhrchen gegeben, zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das entstandene Zellpellet wurde in 500µl FACS-Puffer gewaschen, erneut zentrifugiert und der Überstand wiederum verworfen. Die mittels FACS-Flow auf ein Gesamtvolumen von 200µl verdünnte Zellsuspension wurde mit je 60µg der folgenden Primärantikörper versetzt:

**Tabelle 7: Für die FACS-Analyse verwendete Antikörper**

Probe	Antikörper	Sekundärantikörper
1	BARB-4	Rabbit anti-human IgG (FITC-gekoppelt)
2	ChromPure IgG (Isotypkontrolle)	Rabbit anti-human IgG (FITC-gekoppelt)

Die Zellen wurden 20min auf Eis gestellt und dann abermals zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, und das Zellpellet wie oben beschrieben, mit FACS-Puffer gewaschen. Das Zellpellet wurde wieder in 200µl FACS-Flow resuspendiert und mit den FITC-gekoppelten Sekundärantikörpern versetzt.

Die Suspension wurde für 20min im Dunkeln auf Eis gestellt, zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Zellpellet wurde wiederum mit FACS-Puffer gewaschen und im FACS-Puffer auf Eis gestellt.

Die Auswertung der Proben erfolgte wie in Abschnitt 2.2.3. beschrieben und wurde mit Hilfe von WinMDI-Software visualisiert.

### **2.2.4. Endozytose-Assay**

Um das Bindungsverhalten und eine mögliche Endozytose des Antikörpers BARB-4 zu untersuchen, wurde ein Endozytose-Assay aufgebaut.

#### **2.2.4.a Prinzip der Fluoreszenzmikroskopie**

Die Fluoreszenzmikroskopie erlaubt, ähnlich der Peroxidase-Färbung, den Nachweis spezifischer Antigen-Antikörper-Bindungen. Dabei ist dieses Verfahren aber deutlich sensitiver, ermöglicht eine genauere Lokalisation des Antikörpers und lässt Verlaufsbeobachtungen zu. Grundlage der Fluoreszenzmikroskopie ist die Darstellung bestimmter Emissionsspektren nach Anregung eines fluoreszierenden Stoffes durch einen LASER. Der Farbstoff kann direkt an den zu untersuchenden Antikörper gekoppelt werden. Entsprechende Sperrfilter bei der Detektion lassen die gleichzeitige Verwendung mehrerer Fluoreszenzstoffe und damit die gleichzeitige Färbung unterschiedlicher Strukturen zu.

#### **2.2.4.b Konfokales Mikroskop**

Zur Analyse wurde ein konfokales Mikroskop verwendet, bestehend aus einem Fluoreszenzmikroskop und einem LASER. Der LASER verfügt über einen Argon-Ionen-LASER mit der Wellenlänge 488nm und einem Violett-LASER der Wellenlänge 405nm. Zur Darstellung des Antikörpers dienen der Farbstoff Orange 548, zur Darstellung der Zellstrukturen wurde DNA-färbende DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole) verwendet (Lakowicz 2010). Alternativ kann auch FITC zur Färbung des Antikörpers eingesetzt werden. Eine Übersicht über die jeweilige Kombination aus anregender Wellenlänge und verwendetem Detektions-Bandpassfilter gibt die folgende Tabelle:

Tabelle 8: Fluoreszenzfarbstoffe des konfokalen Mikroskops

Fluoreszenzfarbstoff	Anregung	Detektion
<b>FITC</b>	Argon-Ionen-LASER (488nm)	Bandpassfilter 510-530nm
<b>Orange 548</b>	Argon-Ionen-LASER (548nm)	Bandpassfilter 565nm
<b>DAPI</b>	UV-LASER (405nm)	Bandpassfilter 440nm

Nach Aufnahme der jeweiligen Emissionsgrafiken des Antikörpers und der DNA-Strukturen wurden diese mit Hilfe einer nachträglichen Bildbearbeitung mit Adobe Photoshop CS in einer Darstellung vereint.

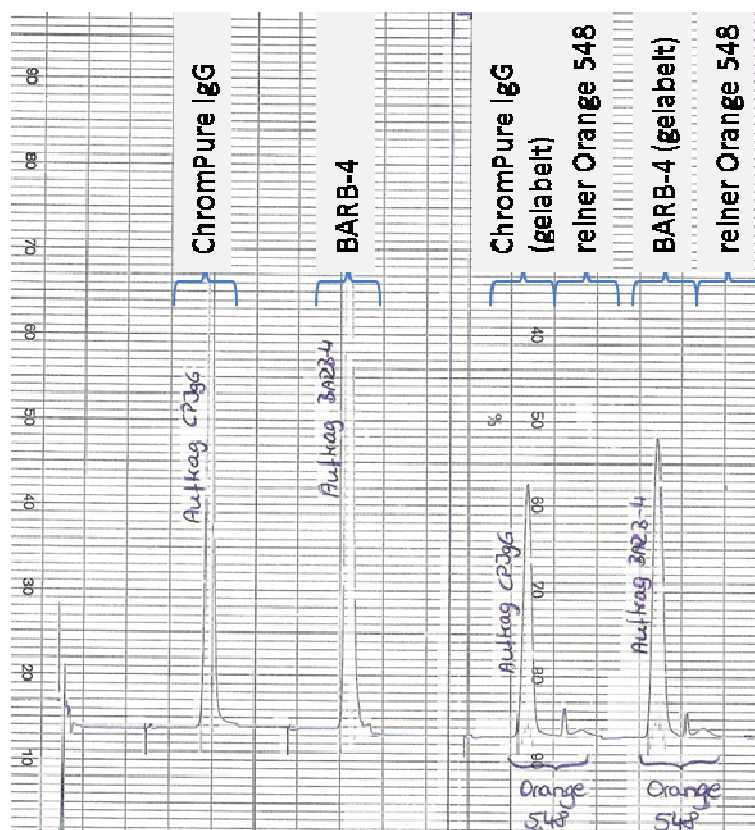
#### 2.2.4.c Proteinbestimmung mit der BCA-Methode

Zur Festlegung der Antikörperkonzentration im Testansatz des Endozytoseversuches wurde die BCA (Bicinchoninsäure, 2,2'-Bichinolin-4,4'-dicarbonsäure)-Methode verwendet. Diese Protein-Nachweismethode nutzt die Bildung eines violetten Farbstoffes aus 2 Molekülen Bicinchoninsäure und einem Molekül zwei-wertigem Kupfers. Die dazu notwendige Reduktion des Kupfers erfolgt im alkalischen Milieu in Gegenwart von Peptiden. Der entstandene Chelatkomplex hat ein Absorptionsmaximum bei  $\lambda = 562\text{nm}$ . Vor der jeweiligen Messung steht dabei immer eine Kalibrierung des Gerätes. Durch Messung einer negative Kontrolle sowie einer ansteigenden Konzentrationsreihe von Rinderserumalbumin (BSA), die als Proteinstandart diente, errechnet sich eine Kalibriergerade. Diese ermöglicht eine Zuordnung des gemessenen Absorbtionswertes der Probe zu einem bestimmten Proteingehalt.

#### 2.2.4.d FPLC (Fast Protein Liquid Chromatography)

Nach der Konjugation wurde der Antikörpers mit einer FPLC-Anlage in Kombination mit einer Sephadex G25 Säule (HiPrep™ 26/10 Desalting) isoliert. Die Säule enthält ein Gel aus Dextran und Epichlorhydrin mit einer definierten Porengröße zur Auftrennung von

Proteinen kleiner 5kD. Große Moleküle passieren die Gelkiesel und nutzen als Verteilungsraum nur die verbleibenden Zwischenräume, während kleine Moleküle die Poren passieren können und damit einen deutlich größeren Raum der Säule nutzen können. Dies führt zu einer deutlich längeren Passagezeit kleiner Moleküle und einer zeitlichen Aufteilung des Stoffgemisches nach Molekülgröße. Die Detektion der jeweiligen Proteinfractionen erfolgte über eine UV-Meßzelle mit einer Absorptionswellenlänge von  $\lambda = 280\text{nm}$ . Das Signal wurde mit Hilfe eines Schreibers auf ein fortlaufendes Papier geschrieben.



**Abbildung 4: Papierauftrag der UV-Meßzelle.** Die Peaks entsprechen den antikörpertragenden Anteilen des Säulendurchflusses (ChromPure IgG, bzw. BARB-4) bzw. dem überschüssigen Farbstoff Orange 548. Mit Hilfe dieser simultanen Aufzeichnung ist die Identifizierung antikörpertragender Proben des Fraktionierers möglich.

#### 2.2.4.e Markierung des BARB-4 mit Orange 548-Farbstoff

Um die Antikörper im Konfokal-Mikroskop darstellen zu können, mussten diese mit dem entsprechenden Fluoreszenzfarbstoff konjugiert werden. Die Konjugation erfolgte



über eine Aktivierung einer Carbonsäuregruppe des Antikörpers mit nachfolgender Bindung an die Aminosäuregruppe des jeweiligen Farbstoffs. Zur Aktivierung der Carbonsäuregruppe des BARB-4, wurde dieser zunächst mittels FPLC-Anlage durch Gelfiltration über eine Sephadex G25 Säule (HiPrep™ 26/10 Desalting) in 0,1M Bicarbonatpuffer (pH 9,2) umgepuffert. Dazu wurde die Säule mit Bicarbonatpuffer bei einer Flussrate von 5ml/min mit dem 5-fachen Säulenvolumen, entsprechende 265ml, äquilibriert. Nach Zugabe des BARB-4 unter einem Fluss von 1ml/min wurde mit Bicarbonatpuffer bei 5ml/min eluiert. Der mittels des Schreibers festgehaltene erste Peak zeigt den enthaltenen Antikörper an. Durch die Umpufferung in ein alkalisches Milieu wurde die Carbonsäuregruppe des BARB-4 deprotoniert und somit aktiviert. Die so vorbereitete Antikörperlösung wurde nun mit dem Orange 548-Farbstoff versetzt. 1mg des Farbstoffs Orange 548 wurde in 400µl Bicarbonatpuffer gelöst und 50µl der entstandenen Suspension pro 1ml Antikörperlösung zugegeben. Die Inkubation erfolgte für eine Stunde unter leichtem Durchmischen auf einer Rüttelplatte bei Raumtemperatur und Dunkelheit. Anschließend wurde der BARB-4-Antikörper von überschüssigem Farbstoff mit der FPLC Maschine und der oben beschriebenen Säule getrennt. Dazu wurde die Säule mit 265ml und mit 5ml/min PBS-Puffer äquilibriert und nach Zugabe der Farbstoff-markierten BARB-4-Lösung mit 5ml/min PBS-Puffer eluiert. Der 1. Peak zeigte den nun konjugierten BARB-4 an, der mittels Fraktionierer in 500µl-Fraktionen aufgefangen wurde. Der 2. Peak entstand durch den überflüssigen Farbstoff, der verworfen wird. Mittels BCA-Methode wurde der Proteingehalt der aufgenommenen Fraktionen bestimmt, die höchstkonzentrierten Fraktionen zu einem Gesamtvolumen von 2ml gemischt und mit RPMI Vollmedium auf ein Volumen von 4ml verdünnt. Die resultierende Gesamtkonzentration errechnet sich aus:

$$c_{ges} = \frac{c_1 \times m_1 + c_2 \times m_2 + c_3 \times m_3}{m_{ges} + 2ml}$$

**Formel 2: Formel zur Berechnung der Gesamteinkonzentration der Probe**

Dabei entspricht  $c_{1,2,3}$  der jeweiligen Proteinkonzentration der Proben und  $m_{1,2,3}$  der jeweiligen Menge. Die Gesamtmenge entspricht:  $m_{ges} = m_1 + m_2 + m_3 = 2ml$ .

In gleicher Weise wurde die Isotypkontrolle ChromPure IgG mit dem Fluoreszenzfarbstoff Orange 548 verknüpft.

### 2.2.4.f Endozytose

Die Zellen wurden nach Ablösen durch Trypsin/EDTA in beschriebener Weise abzentrifugiert, in RPMI Vollmedium resuspendiert, und auf eine Konzentration von  $c = 1 \times 10^5$  Zellen/ml eingestellt. Die durch Abflammen sterilisierten Objektträger wurden in sterile Petrischalen gelegt und mit je 400 $\mu$ l RPMI Vollmedium beimpft. Anschließend wurden pro Objektträger 100 $\mu$ l Zellsuspension dazugegeben. Nach eintägiger Inkubationszeit wurde das RPMI Vollmedium vorsichtig abgesaugt. Auf die angewachsenen Zellen wurden je 500 $\mu$ l der Antikörper-Lösung bzw. der Isotypkontrolle pipettiert und die Objektträger steril im Brutschrank für 30min, 60min, 90min, 2h und 4h inkubiert. Anschließend wurden der Überstand abgekippt, die Zellen einmal mit PBS-Puffer gewaschen und bei Raumtemperatur unter Lichtausschluss getrocknet. Nach dem Eindeckeln mit DAPI (4',6-Diamidino-2-phenylindol) in einer Verdünnung von 1:10.000 mit Fluoreszenz Mounting Medium wurden die Zellen unter dem Fluoreszenzmikroskop fotografiert.

### 2.2.5. Adhäsions-Assay

Ziel des Experiments war die Untersuchung des Einflusses des BARB-4 Antikörpers auf die Adhäsionsfähigkeit der BXPC-3- und A549-Zellen.

Hierzu wurde zunächst, wie oben beschrieben, die Zellzahl der Zellsuspension bestimmt, durch entsprechende Verdünnung mit RPMI Vollmedium auf  $c = 1 \times 10^5$  Zellen/ml eingestellt und für 30min auf Eis gestellt. Die BARB-4-Antikörper-Lösung wurde ebenfalls mit RPMI Vollmedium auf eine Konzentration von 200 $\mu$ g/ml eingestellt. In drei Zellschalen wurden je zwei 50 $\mu$ l Tropfen RPMI Vollmedium und RPMI Vollmedium-Antikörper-Lösung aufgetragen. In diese Tropfen wurden dann mit Hilfe einer Mikroliter-Pipette je 2 $\mu$ l Zellsuspension gegeben, entsprechend

$$z = 1 \times 10^5 \text{ Zellen/ml} \times 2 \times 10^{-3} \text{ ml} = 200 \text{ Zellen.}$$

**Formel 3: Zellzahl je 2 $\mu$ l Zellsuspension**

Die Zellschalen wurden für 30min, 45min, und 60min im Brutschrank inkubiert. Anschließend wurde der Tropfen vorsichtig abgesaugt und die adhärenen Zellen für 6min mit 60%igem Isopropanol fixiert. Die Gegenfärbung erfolgte durch Hämalaun mit 6 minütiger Einwirkzeit und 15 minütigem Waschen mit Leitungswasser. Nach dem Waschen mit Aqua bidest. und PBS-Lösung erfolgte die Zellzahlbestimmung im Lichtmikroskop.

### **2.2.6. Motilitäts-Assay**

Zur Vorbereitung wurde, wie oben beschrieben, eine Zellsuspension mit  $c = 1,5 \times 10^5$  Zellen/ml hergestellt und für 30min auf Eis gestellt.

Je  $1,5 \times 10^5$  Zellen BXPC-3 in RPMI Vollmedium wurden in insgesamt 6 Zellen einer *24-well-plate* gegeben und für 5 Stunden im Brutschrank inkubiert. Anschließend wurde ein Kreuz mit einer Strichstärke von 1mm in jede Platte geritzt, die bis dahin circa 70% konfluent bewachsen war. Nun wurde der Medium-Überstand abgesaugt, und nicht-festhaftende Zellen mit weiterem RPMI Vollmedium abgewaschen. Anschließend wurden BARB-4-Antikörper in ansteigender Dosierung von je 10 $\mu$ g, 50 $\mu$ g, 100 $\mu$ g sowie 400 $\mu$ g den Kulturplatten beigelegt. Reines RPMI Vollmedium und 400 $\mu$ g ChromPure IgG dienten als Negativkontrollen. Die Proben wurden für 12 Stunden im Brutschrank inkubiert.

Nach vorsichtigem Abpipettieren des Zellüberstandes, wurden die Zellen mit 5-prozentiger Glutaraldehyd-Lösung fixiert. Die Färbung erfolgte, wie bereits beschrieben, mit Hämalaun. Nach Waschung mit Leitungswasser wurden die Proben mit PBS-Puffer versetzt und unter dem Lichtmikroskop fotografiert.

## **3. Ergebnisse**

---

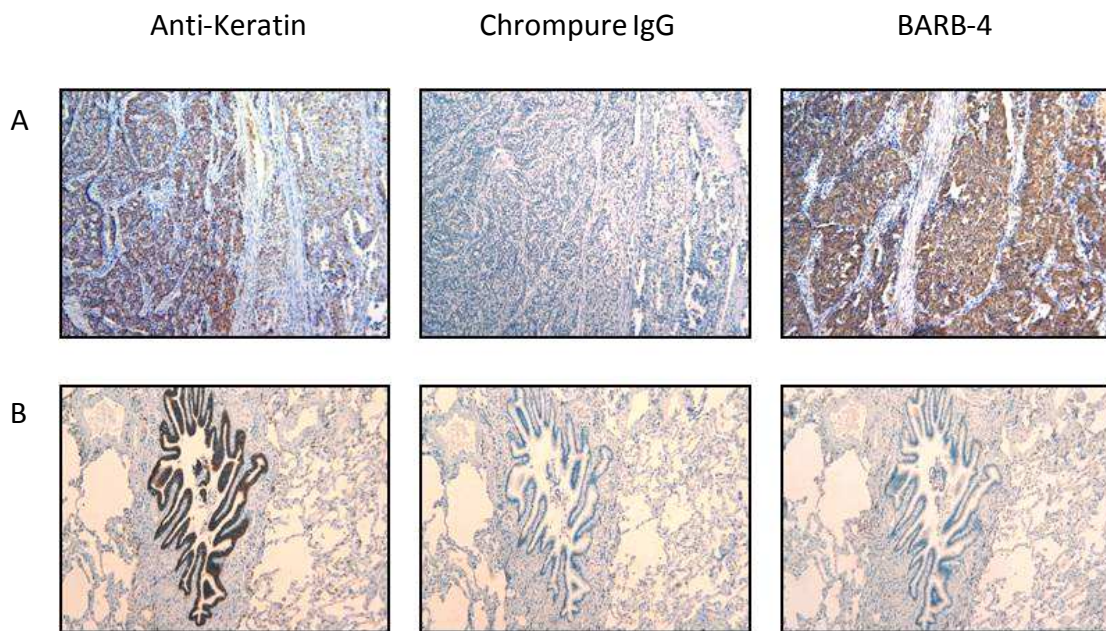
## 3. Ergebnisse

### 3.1. Bindungsverhalten

Zunächst stand besonders das Bindungsverhalten des Antikörpers BARB-4 im Fokus des Interesses. So sollte der Nachweis geführt werden, dass dieser Antikörper tatsächlich und ausschließlich an Oberflächenstrukturen von Tumorzellen, in dieser Arbeit exemplarisch der malignen BXP-3 bzw. A549 Zellen, bindet, nicht jedoch an Normalgewebe. Für diesen Nachweis wurden mit einer Immunperoxidasefärbung von Paraffinschnitten sowie der FACS-Analyse zwei unterschiedliche Methoden herangezogen. Die Ergebnisse dieser Versuchsansätze werden im Folgenden dargestellt.

#### 3.1.1. Immunperoxidasefärbung von Paraffinschnitten

Die Färbung von Gewebeschnitten stellte den ersten Versuch dar, das Bindungsverhalten und die Lokalisationen des BARB-4 zu untersuchen. Der Einsatz Peroxidase-gekoppelter Sekundärantikörper, die gegen den F<sub>c</sub>-Teil der zu untersuchenden Antikörper binden, ermöglicht den indirekten Nachweis oberflächengebundener Primärantikörper. Das Enzym Peroxidase führt durch Hydrolysierung von Wasserstoffperoxid zur Freisetzung von Protonen. Diese binden an den Farbstoff DAB (Diaminobenzidin) und bewirken einen Farbumschlag nach braun. Stellvertretend für andere Gewebe zeigt Abbildung 5 die unterschiedliche Farbreaktion von Tumor- (A) bzw. Normalgewebe (B) der Lunge unter Anwesenheit von Anti-Keratin-, ChromPure IgG-, und BARB-4-Antikörper.



**Abbildung 5: Immunperoxidasefärbungen von Adenokarzinomgewebe (A) und Normalgewebe (B) der Lunge mit BARB-4.** Nach Vorbereitung und Entparaffinisierung der Gewebeschnitte wurden diese für 30min mit je 5µg biotinyliertem BARB-4 als Primärantikörper bzw. mit Anti-Keratin-Antikörper als Positiv- und biotinyliertem ChromPure IgG als Isotypkontrolle inkubiert. Anschließend folgte die Markierung mit Peroxidase-gekoppeltem Sekundärantikörper nach Tabelle 5, Abschnitt 2.2.2.c und Färbung mit DAB (Diaminobenzidin). Die Gegenfärbung erfolgte mit dem Farbstoff Hämalaun.

Die Braunfärbung der vorliegenden Aufnahme (A) beweist die Anwesenheit des am Sekundärantikörper gebundenen Enzyms Peroxidase und damit die Bindung des BARB-4-Antikörpers an das Tumorgewebe. In den Aufnahmen des Normalgewebes (B) ist diese Braunfärbung nicht zu beobachten. Die Positivkontrolle mit Anti-Keratin zeigt die Peroxidase-Tätigkeit in beiden Geweben, die Negativkontrolle mit ChromPure IgG zeigt keine Braunfärbung. Auf dieser Grundlage entstand mit Tabelle 9 bzw Tabelle 10 eine Übersicht über die Expression des BARB-4-Antigens TAF15 auf unterschiedlichen Geweben maligner bzw. normaler Entität.

**Tabelle 9: Expressionsmuster des BARB-4 Antigens auf malignen Geweben:** Die histologischen Gewebeschnitte unterschiedlicher Organe zeigen mit Ausnahme der Lebermetastase eines Kolonkarzinoms einen positiven Farbumschlag nach braun. An alle diese neoplastischen Zellen bindet der Antikörper BARB-4.

<b>Gewebe</b>	<b>Histologische Einteilung</b>	<b>BARB-4 + / -</b>
<b>Blase</b>	Urotheliales Karzinom	3 / 0
<b>Brust</b>	Invasiv-duktales Karzinom (Primärtumor)	4 / 0
	Lunge, Lymphknoten (Metastase)	2 / 0
<b>Kolon</b>	Adenokarzinom (Primärtumor)	3 / 0
	Leber (Metastase)	0 / 1
<b>Lunge</b>	Neuroendokrines Karzinom,	9 / 0
	Plattenepithel, Adenokarzinom (Primärtumoren)	1 / 0
	Lymphknoten (Metastase)	
<b>Magen</b>	Adenokarzinom	5 / 0
<b>Melanom</b>	Malignes Melanom (Metastase)	5 / 0
<b>Ösophagus</b>	Adenokarzinom, Plattenepithelkarzinom	4 / 0
<b>Pankreas</b>	Adenokarzinom (Primärtumor)	5 / 0
	Lymphknoten (Metastase)	1 / 0
<b>Prostata</b>	Adenokarzinom	5 / 0
<b>Testis</b>	Seminom	3 / 0

**Tabelle 10: Expressionsmuster des BARB-4 auf Normalgewebe:** Die aufgeführten Gewebeschnitte zeigen ausnahmslos ein negatives Färbeergergebnis. Der Peroxidase-gekoppelte Antikörper BARB-4 konnte nicht an den exemplarisch ausgewählten physiologischen Zellen unterschiedlichster Entitäten binden und wurde ausgewaschen.

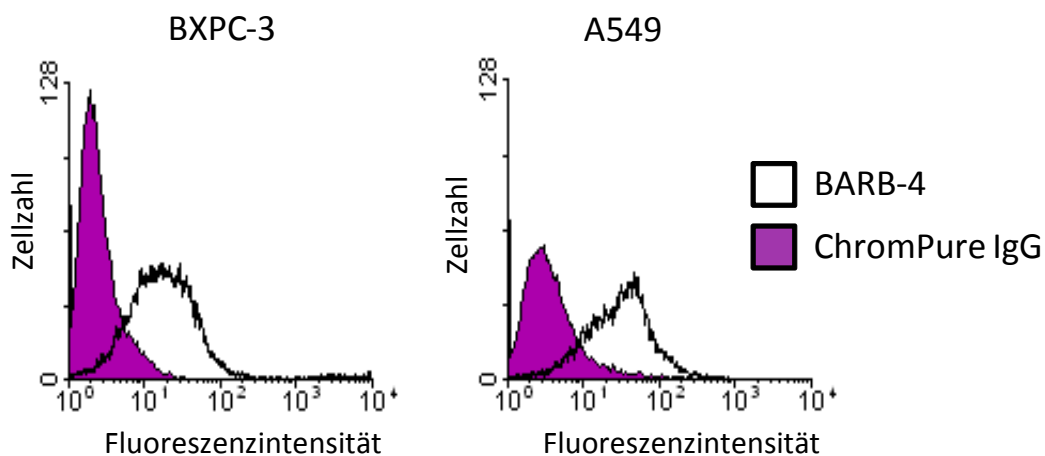
Gewebe	Histologische Einteilung	BARB-4 + / -
<b>Brust</b>	Glandulär	0 / 3
<b>Kolon</b>	Glandulär	0 / 5
<b>Lunge</b>	Glandulär, alveolär	0 / 4
<b>Lymphknoten</b>	Lymphozytär	0 / 2
<b>Magen</b>	Glandulär	0 / 3
<b>Ösophagus</b>	Epithelial	0 / 4
<b>Pankreas</b>	Glandulär	0 / 5
<b>Prostata</b>	Glandulär	0 / 3
<b>Testis</b>	Glandulär	0 / 3
<b>Uterus</b>	Epithelial	0 / 3

Mit Ausnahme der Lebermetastase eines Kolonkarzinoms zeigen hier alle Gewebeschnitte neoplastischer Zellen ein positives Färbeergergebnis. Die Färbung beispielhaft ausgewählter physiologischer Gewebeschnitte bleibt hingegen ausnahmslos negativ. Diese Daten belegen die Spezifität des BARB-4 für die Bindung auf Tumorgewebe. BARB-4 bindet hingegen nicht auf Normalgeweben, ist also tumorspezifisch.



### 3.1.2. Durchflußzytometrie

Die Durchflußzytometrie stellt ein weiteres Verfahren zum Nachweis einer bestehenden Antigen-Antikörper-Verbindung dar. Darüber hinaus erlaubt die FACS-Analyse auch eine Aussage über die Lokalisation des Zielantigens von BARB-4, da der gewählte Versuchsaufbau nur bei Bindung an Zelloberflächen zu einem positiven Ergebnis führt. Der BARB-4-Antikörper wird hierbei mit einem Fluoreszenzfarbstoffgekoppelten Sekundärantikörper inkubiert und die Antikörper-Zellsuspension in das FACScan überführt. Nach Anregung des Farbstoffes durch einen LASER registriert das FACScan die emittierte Strahlung und zeichnet ein Histogramm.

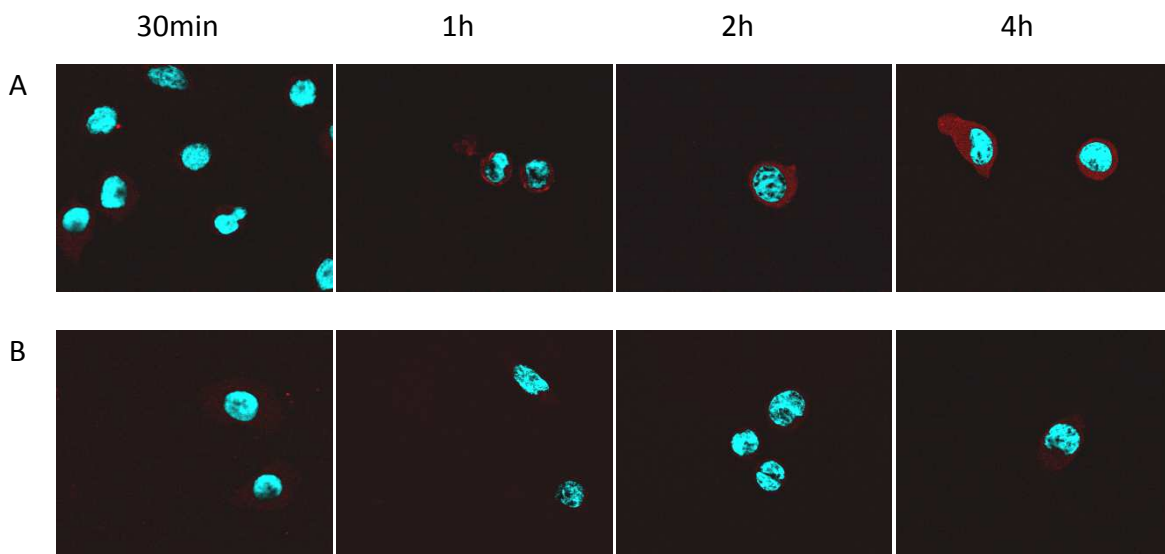


**Abbildung 6: Histogramm der FACS-Analyse mit BARB-4 auf malignen Zellen des Pankreas (BXPC-3) bzw. der Lunge (A549).**  $2 \times 10^5$  Zellen wurden 20min mit je  $60 \mu\text{g}$  Primärantikörper BARB-4 bzw. ChromPure IgG als Isotypkontrolle inkubiert. Anschließend wurden die Proben wiederum 20min mit dem entsprechenden Sekundärantikörper versetzt und im FACScan gemessen. Die Daten wurden mit WinMDI 2.8 ausgewertet. Die Fluoreszenzverschiebung bestätigt die Bindung von BARB-4.

Eine erfolgreiche Bindung des Primärantikörpers führt zur Markierung der Zellen mit Fluoreszenzfarbstoff und nach Anregung durch einen LASER zu einer Zunahme der Fluoreszenzintensität (farbloser Peak), wie sie bei beiden verwendeten Zelllinien zu beobachten ist. Somit liefert auch das FACScan den positiven Nachweis einer Bindung des BARB-4. Zusätzlich erlaubt dieses Ergebnis den Rückschluss, dass der Antikörper gegen Oberflächenstrukturen bindet.

### 3.1.3. Endozytose-Assay

Die Ergebnisse in Abschnitt 3.1.1. und 3.1.2. belegen die Bindung des BARB-4 an Tumorzellen. Um zu eruieren, ob der Antikörper im Anschluss endozytiert wird, wurde ein Endozytose-Assay durchgeführt. Hierbei wird der Farbstoff-markierte Antikörper durch Anregung mittels eines LASER in einem konfokalen Mikroskop sichtbar gemacht. Um den zeitlichen Verlauf der Endozytose erfassen zu können, wurde der Versuchsansatz nach 30min, 1h, 2h und 4h gestoppt und fotografiert.



**Abbildung 7: Aufnahmen des konfokalen Mikroskops zur Untersuchung der Endozytose von BARB-4.**

Für den Versuch wurden je Objektträger 85µg des an Orange 548-Fluoreszenzfarbstoff gekoppelten BARB-4 pipettiert. Nach Inkubation von  $1 \times 10^4$  BXPC-3-Zellen für 30min, 1h, 2h und 4h wurde jeweils der Versuch gestoppt und eine Aufnahme mit dem konfokalen Mikroskop angefertigt (A). Rot gefärbt zeigt sich der Antikörper, blau sind DNA Strukturen die mit dem Farbstoff DAPI (4',6-Diamidino-2-phenylindol) angefärbt wurden. ChromPure IgG diente, in gleicher Konzentration und Inkubationszeit, als Isotypkontrolle (B). 30 Minuten nach Versuchsansatz sind keine wesentlichen Unterschiede zu sehen. Nach einer Stunde zeigt sich dann eine Ansammlung des BARB-4 an der Zelloberfläche, der bei der Isotypkontrolle nicht zu beobachten ist. BARB-4 akkumuliert anschließend im Zellinneren (Aufnahme 2h und 4h). Die Isotypkontrolle zeigt lediglich in der 4h Aufnahme eine geringe Anreicherung im Interzellularraum.

Die erste Aufnahme 30 Minuten nach Inkubation zeigt keine wesentlichen lokalen Konzentrationen des Farbstoff-tragenden BARB-4 oder der Isotypkontrolle ChromPure IgG. Eine Stunde nach Inkubation ist bei den Zellen in Reihe (A), die mit BARB-4

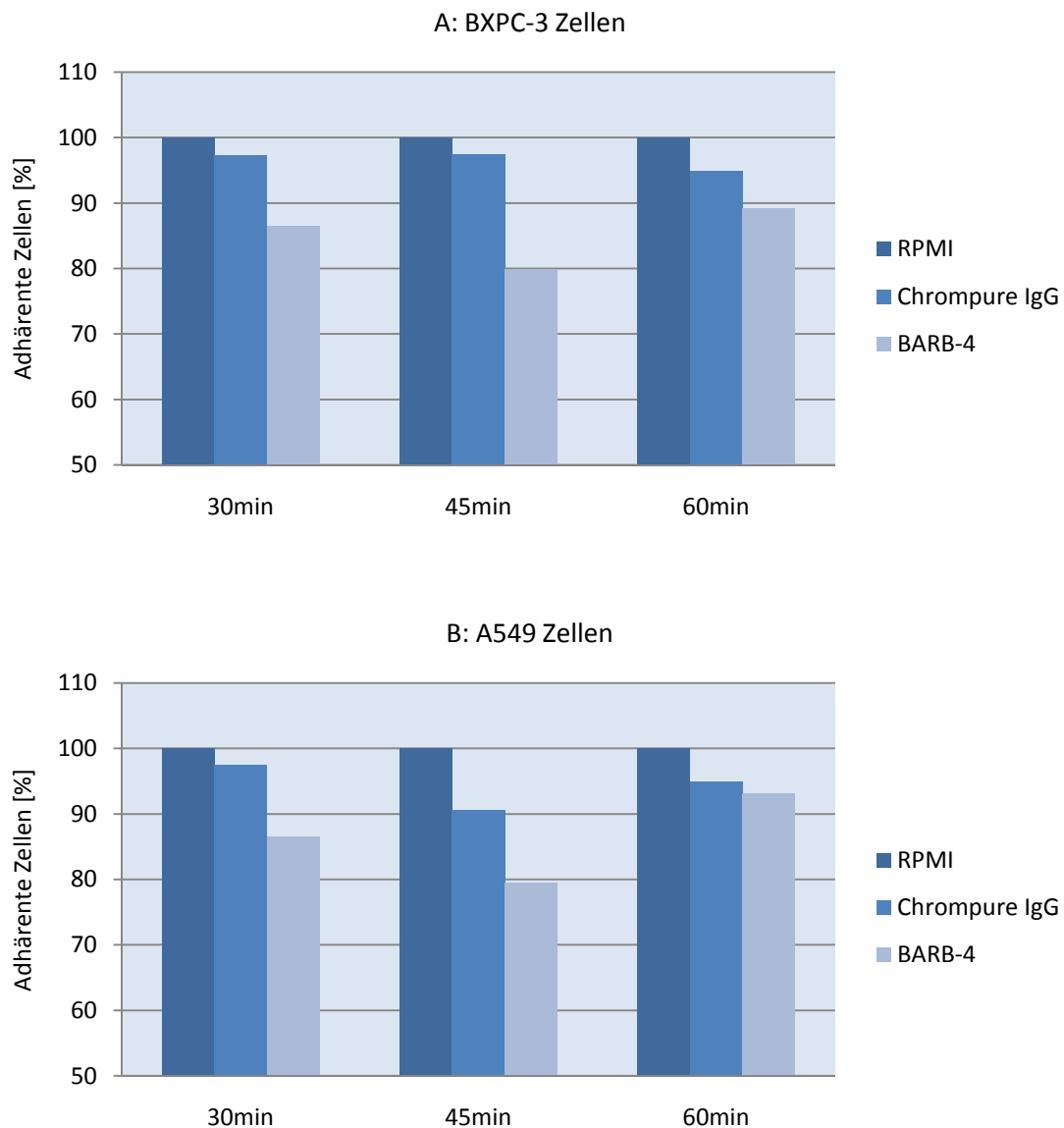
versetzt wurden, deutlich eine Signalanhebung an der Zellmembranoberfläche erkennbar. Diese ist bei der Isotypkontrolle (B) nicht zu beobachten. Die Aufnahmen der zwei bzw. vierstündigen Inkubation zeigen eine fortschreitende Ansammlung des fluoreszierenden Antikörpers BARB-4 im Intrazellularraum. Diese Beobachtungen lassen den Schluss zu, dass der Antikörper nach dem Antigenkontakt von der Zelle endozytiert wird. Die Negativkontrollen (B) weisen hingegen keine Akkumulation an der Zelloberfläche auf. Lediglich auf der 4 Stunden Aufnahme sind geringere Mengen des ChromPure IgG in der Zelle zu verzeichnen.

## **3.2. Funktions-Assays**

Nach dem erfolgreichen Nachweis, dass BARB-4 tatsächlich an Oberflächen von Tumorzellen bindet und anschließend endozytiert wird, soll im zweiten Teil der Arbeit nun die biologische Wirkung des BARB-4 auf Tumorzellen untersucht werden. Wie bereits erörtert, bestimmt besonders die Fähigkeit zur Metastasierung über die Malignität eines Tumors. Vor diesem Hintergrund wird in dieser Arbeit besonders die Adhäsionsfähigkeit von Tumorzellen und deren Motilität in Gegenwart von BARB-4 betrachtet.

### **3.2.1. Adhäsions-Assay**

Eine Zelle verfügt über eine Vielzahl von Möglichkeiten, feste Verbindungen zu den sie umgebenden Strukturen aufzubauen. Diese Adhäsionen sind unter Anderem wichtig für die Anheftung an Gefäßwände und die nachfolgende Penetration und Migration ins Gewebe, wichtige Schritte auf dem Weg zur Ansiedlung neuer Kolonien (Gassmann, Enns et al. 2004). Im Rahmen des Adhäsions-Versuchs soll untersucht werden, inwieweit die Anheftung der Zellkolonien BXPC-3 und A549 an den Boden einer Zellkulturschale durch die Anwesenheit von BARB-4 verhindert wird. Dazu wurden Tropfen mit je circa 200 Zellen in eine Kulturschale gegeben und für jeweils 30min, 45min und 60min mit dem Antikörper inkubiert. Als Negativkontrolle diente RPMI Vollmedium, als Isotypkontrolle ChromPure IgG. Nach dem Abspülen der nicht-adhärenenten Zellen wurde die jeweilige Zellzahl bestimmt.



**Abbildung 8: Einfluss des BARB-4 auf die Adhäsionsfähigkeit von Tumorzellen.** Je 200 Zellen **A:** BXPC-3-Zellen, bzw. **B:** A549-Zellen wurden für 30min, 45min und 60min mit je 10 $\mu$ g BARB-4, sowie RPMI Vollmedium als Negativkontrolle und 10 $\mu$ g ChromPure IgG als Isotypkontrolle inkubiert. Nach Entfernen des Überstandes erfolgte die Zählung der adhärenen Zellen. Auftrag der Werte als Prozent des Referenzwertes von RPMI. Unter Zugabe von BARB-4 nimmt die Zahl adhärenen Zellen zu allen Zeiten deutlich ab. Dies gilt sowohl für Tumorzellen des Pankreas (A) als auch der Lunge (B).

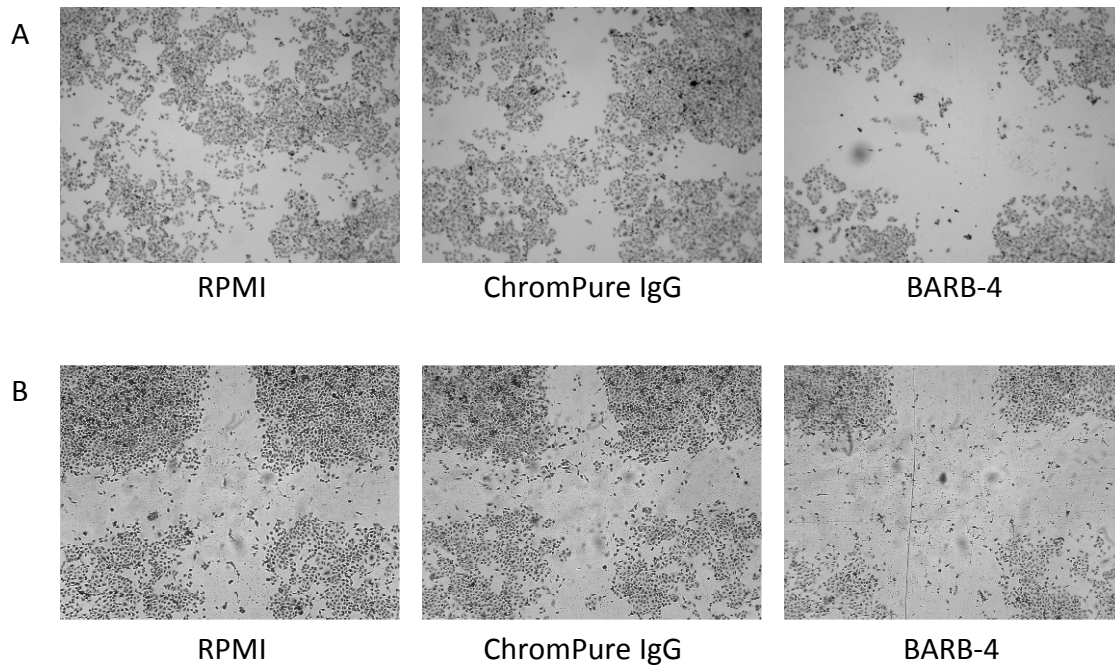
Abbildung 8 quantifiziert die adhärenen Zellen unter Zugabe der Negativkontrolle RPMI, der Isotypkontrolle ChromPure IgG und dem Antikörper BARB-4. Alle Werte sind in Relation zur Zahl der adhärenen Zellen unter RPMI, jeweils als 100% gesetzt, angegeben. Die Grafik zeigt bei allen Ansätzen näherungsweise gleiche Werte für die

Negativ- und die Isotypkontrollen. Unter Zugabe des Antikörpers BARB-4 findet sich im Gegensatz dazu zu allen Zeiten eine deutlich geringere Anzahl adhärenter Zellen. Besonders nach 45min Inkubationszeit sind hier etwa 20% weniger Zellen anhaftend. Bei einer längeren Inkubationszeit von 60min wurde der Tiefpunkt bereits unterschritten der Anteil haftender Zellen nimmt im Vergleich zur Negativkontrolle wieder zu. Dieser Effekt lässt sich sowohl bei Tumorzellen des Pankreas (A) als auch bei Lungenkarzinomzellen (B) beobachten. Offensichtlich ist die Adhäsionsfähigkeit der Tumorzellen unter der Präsenz von BARB-4 vermindert.

#### **3.2.2. Motilitäts-Assay**

Neben der Adhäsion ist die Zellmotilität entscheidend für die Fähigkeit zur Metastasierung. In dem hier präsentierten Versuch wurde in eine 70% konfluente Fläche ein Kreuz mit definierter Strichstärke von circa 1mm gezogen und die Überwucherung dieser präparierten Fläche mit und ohne BARB-4 untersucht. Als zusätzliche Negativkontrolle diente wiederum ChromPure IgG.

In den Ansätzen mit der Negativkontrolle RPMI Vollmedium und der Isotypkontrolle ChromPure IgG, ist nach 12 stündiger Inkubation eine deutliche Überwucherung des zuvor zellfreien Areals zu beobachten. Unter Zugabe des Antikörpers BARB-4 zeigt sich hingegen eine deutlich geringer ausgeprägte Überwucherung. Besonders eindrucksvoll ist dieser Unterschied bei den Tumorzellen des Pankreas BXPC-3 (A). Während unter BARB-4 das zuvor gezogene Kreuz noch deutlich zu erkennen ist, haben die Zellen in den Ansätzen mit RPMI Vollmedium und ChromPure IgG den Kulturboden weitgehend überwachsen. Die Präsenz von BARB-4 führte also zur deutlichen Motilitätshemmung in Relation zu den Ansätzen mit RPMI Vollmedium bzw. ChromPure IgG.



**Abbildung 9: Einfluss des BARB-4 auf die Motilität von Tumorzellen.** A: BXP3-Zellen, B: A549-Zellen. In eine, zu 70% konfluent bewachsene Zellschicht wurde ein Kreuz geritzt. Nach 12-stündiger Inkubation mit 400µg BARB-4 wurden die Proben fotografiert. RPMI Vollmedium und Chrompure IgG dienen in gleicher Konzentration als Negativ- und Isotypkontrollen. Deutlich erkennbar haben in den Ansätzen mit RPMI und ChromPure IgG beide Zelllinien das Kreuz überwuchert. Im Gegensatz dazu ist unter BARB-4 die Zellmotilität sichtbar gehemmt. Dieser Effekt zeigt sich sowohl für die Zelllinie BXP3 (A) als auch für A549 (B).

## **4. Diskussion**

---

## 4. Diskussion

### 4.1. Ergebnisse

Die vorliegende Arbeit untersucht den humanen IgG-Antikörper BARB-4. Dieser Antikörper wurde am Pathologischen Institut Würzburg mit Hilfe der Hybridomatechnologie von einem Patienten mit einem Siegelringkarzinom des Magens isoliert. Die Ergebnisse dieser Arbeit beweisen seine Bindung an maligne Zellen. In weiterführenden Untersuchungen konnte nachgewiesen werden, dass diese Bindung tumorspezifisch ist und über das modifizierte TAF15 (TATA box binding protein associated factor 15)-Protein, stattfindet (Schatz, Brandlein et al. 2010). Unter Anwesenheit von BARB-4 konnte eine deutliche Verminderung der Adhäsionsfähigkeit von Tumorzellen festgestellt werden. Zudem neigen die Tumorzellen weniger zu Migration und Ausbreitung. Beobachtungen mit Fluoreszenzfarbstoff-markierten Antikörpern unter dem konfokalen Mikroskop bestätigten die Bindung des BARB-4 an Tumorzellen und zeigten zudem eine Ansammlung im Intrazellularraum etwa 2h nach Inkubation.

### 4.2. Biologie einer Neoplasie

Ein Tumor stellt den Ausbruch einer oder mehrerer genetisch veränderter Zellen aus den Regulationsmechanismen des Körpers dar. Eine manifeste Neoplasie weist seltener eine einzige als vielmehr viele verschiedene Aberrationen auf, die Auswirkung auf unterschiedlichste Regulations-, Proliferations- und Migrationsvorgänge haben. Die verschiedenen Mutationen treten meist in zeitlicher Abfolge auf, und der Weg von der ersten genetischen Variation bis zum metastasierten Tumor dauert in der Regel Jahre oder wird zu Lebzeiten nicht beendet. Diese „Entwicklung“ der malignen Potenz einer Neoplasie wird auch als „neoplastic progression“ (neoplastische Progression) bezeichnet und folgt epigenetischen Prinzipien (Foulds 1954).

Weinberg beschrieb die unterschiedlichen Mutationen als Kennzeichen eines Tumors und formulierte die Theorie der „hallmarks of cancer“ (Hanahan and Weinberg 2000).



Die Entstehung einer Neoplasie beruht nach dieser Theorie auf verschiedenen Stützfeilern, die im Rahmen der Tumorgenese zwingend erforderlich sind. Zu diesen gehört die Fähigkeit, der regulatorischen Apoptose zu entgehen, Wachstumsfaktoren selbst zu generieren und eine Resistenz gegen Anti-Wachstumsfaktoren zu entwickeln. Als weitere Stützfeiler werden das Potential zur unbegrenzten Proliferation durch Modifikation der Telomerase-Enzyme, die Induktion der Angiogenese und schließlich die Fähigkeit zum invasiven Wachstum und zur Metastasierung aufgeführt. Die Entwicklung dieser Fähigkeiten verlangt dabei meist multiple Mutationen, die zeitlich versetzt auftreten. Fehlt den Tumorzellen nur eine dieser Anlagen, ist eine Entstehung einer malignen Neubildung oft nicht möglich. Die Selektion der Zellen eines Tumors, die alle diese Eigenschaften aufweisen, folgt dabei einem darwinistischen Prozess, bei dem sich besser ausgerüstete Zellen gegenüber dem restlichen Zellverbund durchsetzen. Der Selektionsdruck entsteht dabei besonders aus den metabolischen Veränderungen, vornehmlich der Hypoxie, denen die Tumorzellen ausgesetzt sind (Avni, Cohen et al. 2011). Diese Theorie wird auch durch neuere Modelle gestützt, nach denen Tumorzellverbänden genetisch heterogen sind und so genannte Tumorstammzellen besitzen (Lobo, Shimono et al. 2007; Greaves 2010).

Die Erkenntnisse dieses „hallmarks of cancer“-Modells zeigen auch Möglichkeiten therapeutischen Einschreitens auf. Gelingt es nur eine dieser „hallmarks“ auszuschalten, kann man eventuell das Wachstum des gesamten Tumors stoppen oder ihn sogar in Regression zwingen. Eine genaue Betrachtung der biologischen Vorgänge und Signalwege ist daher von äußerster Wichtigkeit, da es nur so möglich ist, spezifische Schlüsselstrukturen veränderter Zellprozesse auszumachen und diese mit spezifischen Stoffen, wie zum Beispiel Antikörpern, zu eliminieren.

### **4.3. Die Rolle des Immunsystems**

Statistisch betrachtet müsste der Mensch eine Vielzahl maligner Neoplasien aufweisen, berücksichtigt man die enorme Zellzahl und die Häufigkeit genetischer Störungen. Dem gegenüber steht jedoch ein äußerst effizienter Kontrollapparat, angefangen von der selbstinduzierten Apoptose bis hin zu hochspezialisierten

Abwehrmechanismen der natürlichen Immunität. Letztere sorgt im Organismus mit Hilfe von spezialisierten Zellen und ihren humoralen Komponenten, zu denen unter anderem die akute Phase-Proteine und das Komplementsystem gezählt werden, für die Detektion und Eliminierung maligner Zellen. Granulierte Lymphozyten besitzen an ihrer Oberfläche Rezeptoren für den F<sub>c</sub>-Teil von Antikörpern und werden durch Antigen-Antikörper-Komplexe aktiviert. Die darauffolgende Ausschüttung zytolytischer Moleküle wie Perforine, reaktive Sauerstoffmetabolite und Tumor-Nekrose-Faktor (TNF), die zum Absterben der Tumorzelle führt, wird als Antikörper-abhängige, Zell-vermittelte Zytotoxizität, kurz ADCC (antibodydependent cellular cytotoxicity) bezeichnet (Boes 2000; Murphy, Travers et al. 2008; Hahn 2009).

Neben der ADCC spielen nach neuerer Erkenntnis aber insbesondere niedrig-affine, Keimbahn-kodierte Antikörper, die meist der Klasse IgM angehören (Vollmers and Brandlein 2009), eine wichtige Rolle. Die tumorizide Wirkung der meisten der bisher untersuchten humanen Immunglobuline beruht auf der Induktion von Apoptose nach Bindung an tumorspezifische Rezeptoren. Diese elegante Abwehrreaktion kommt ohne Entzündungsreaktion und somit ohne Beschädigung von umgebenden Strukturen aus (Brandlein, Pohle et al. 2003; Vollmers and Brandlein 2005; Vollmers and Brandlein 2009). Es ist darüberhinaus auch denkbar, dass humane Immunglobuline zusätzlich die ADCC induzieren. Der in dieser Arbeit untersuchte IgG BARB-4 zeigte in bisherigen Untersuchungen hingegen keine eindeutig apoptotische Wirkung, vielmehr scheint dieser Antikörper hemmend auf Adhäsions- und Migrationsvorgänge von Tumorzellen Einfluss zu nehmen, was die vorliegenden Ergebnisse belegen.

Welch wichtige Rolle das innate Immunsystem bei der Tumorabwehr spielt, zeigt sich weiter an der Tatsache, dass die genetische Ausstattung des Wirtsorganismus eine prädiktive Variable für die Entstehung einer Metastase darstellt (Hunter, Welch et al. 2003). Aus diesen Beobachtungen entstanden Anstrengungen, die natürlichen Antikörper für therapeutische Zwecke zugänglich zu machen. Nach anfänglichen technischen Problemen bei der Isolierung und Synthese dieser Antikörper war schließlich das Verfahren der Hybridomatechnologie das entscheidende Werkzeug zur

Produktion rein humaner und damit immunverträglicher Antikörper (Faller, Vollmers et al. 1990; Vollmers and Brandlein 2009).

#### **4.4. Immunglobuline der natürlichen Immunität**

Mit Hilfe der Hybridomatechnologie konnten am Pathologischen Institut Würzburg unter der Leitung von Prof. Dr. Dr. Vollmers mehrere Antikörper isoliert werden, die ein tumorspezifisches Bindungsverhalten aufweisen und der natürlichen Immunität zuzurechnen sind. Zu diesen zählen unter Anderem SC-1 (Vollmers, O'Connor et al. 1989), PAM-1 (Hensel, Brandlein et al. 2001; Brandlein, Beyer et al. 2003), und SAM-6 (Pohle, Brandlein et al. 2004; Rauschert, Brandlein et al. 2008). Allen diesen Antikörpern ist gemeinsam, dass sie der innaten Immunität zugehörig sind, der Klasse der IgM angehören und über unterschiedliche Mechanismen an der Einleitung der Apoptose von Tumorzellen beteiligt sind. BARB-4 stellt nun den ersten IgG Antikörper dar, dessen Antigen und dessen Funktionen näher untersucht wurden.

#### **4.5. Der humane Antikörper BARB-4**

Der natürliche IgG Antikörper BARB-4 wurde aus einem Patienten isoliert, der an einem Siegelringkarzinom des Magens litt. Dieser Antikörper ist ebenfalls Keimbahnkodiert und Teil des natürlichen Immunsystems. Im Gegensatz zu den bisher gewonnenen Antikörpern, die überwiegend der Klasse IgM angehören, ist BARB-4 ein IgG. Dies macht BARB-4 zu einem besonders interessantem Forschungsobjekt. Die vorliegenden Ergebnisse aus den Untersuchungen zu den funktionellen Eigenschaften zeigen im Besonderen einen Einfluss von BARB-4 auf das Adhäsions- und Migrationsverhalten von Tumorzellen, während für die bisher untersuchten IgM Antikörper insbesondere Eingriffe in Apoptose-Vorgänge beschrieben sind. Gerade die Erforschung der Signalwege und Stoffwechsel, an denen BARB-4 beteiligt sein könnte, kann zum erweiterten Verständnis der Aufgaben und Wertigkeit des innaten Immunsystems bei der Bekämpfung von Neoplasien beitragen.

#### 4.5.1. Bindungsspezifität

Die Auseinandersetzung mit der Umgebung, dem Immunsystem und der Mangelversorgung des schnell wachsenden Tumorgewebes führt zur Notwendigkeit weiterer Anpassungsvorgänge der malignen Zellen durch weitere Mutationen und damit zu einer Veränderung der Oberflächen-spezifischen Zellstrukturen. Durch veränderte Methylierungen, Acetylierungen, Oxidierungen und Glykosylierungen weist der Tumor andere Oberflächenstrukturen auf als das entsprechende Normalgewebe. Diese körperfremden, sich häufig wiederholenden Glykopeptid-Strukturen werden auch als „pattern“ oder bezeichnet und spielen als so genannte „PAMP´s“ (pathogen-associated molecular patterns) eine Hauptrolle bei der Induktion der natürlichen Immunität (Kumar, Kawai et al. 2009). Diese pattern sind auch Ziel der innaten Antikörper. Die Ergebnisse der immunhistochemischen Färbungen, vorgestellt in Abschnitt 3.1.1., bestätigen, dass BARB-4 nur an Strukturen maligner Zellen bindet, nicht jedoch an Zellen aus normalem Gewebe. BARB-4 bindet also tumorspezifisch. Hervorzuheben ist besonders der Umstand, dass dieser Antikörper sowohl an den Primärtumor als auch an dessen Metastasen bindet. Dies ist keine Selbstverständlichkeit, da Metastasen durch den zunehmenden Evolutionsdruck häufig Modifikationen, wie z.B. veränderte Glykosylierungen, gegenüber dem Primärtumor entwickeln (Roessner 2008). Bei dem Einsatz von konventionellen Chemotherapeutika führen diese Modifikationen des Öfteren zu einem sekundären Therapieversagen. Die Eigenschaft von BARB-4 könnte demnach eine besondere Bedeutung für einen therapeutischen Einsatz haben. Die genauere Betrachtung mit Hilfe der Durchflußzytometrie (Abschnitt 3.1.2.) zeigt, dass der Antikörper explizit an der Zelloberfläche bindet. Dies lässt den Schluss zu, dass sein Antigen auf der Oberfläche von Tumorzellen exprimiert wird. Zu dem gleichen Ergebnis kommt man auch bei Betrachtung der Aufnahmen des Endozytose-Assays (Abschnitt 3.1.3.). BARB-4 akkumuliert an der Zelloberfläche und wird anschließend endozytiert.

### 4.5.2. Das Antigen TAF15

Vorausgehende Untersuchungen haben bereits eine Variante des TAF15 als Zielstruktur des BARB-4 entschlüsseln können (Schatz, Brandlein et al. 2010). TAF15 ist ein Protein der FET (FUS, EWL, TAF15)-Proteinfamilie, vormals als TET (TLS, EWL, TAF15)-Proteine bezeichnet. Proteine dieser Gruppe, zu der FUS (Fused in Sarcoma Protein, früher TLS, Translocated Liposarkoma Protein), EWS (Ewing Sarcoma Protein) und TAF15 gezählt werden, wurden erstmals bei Patienten mit Sarkomen oder Leukämien beobachtet (Andersson, Stahlberg et al. 2008). Sie sind normalerweise intrazellulär lokalisiert und spielen eine zentrale Rolle in der Regulation von Genexpression und mRNA (messenger Ribonukleinsäure)-Splicing. Dabei ist eine vermehrte Präsenz dieser Proteine zu verzeichnen, wenn die Zellen Stressbedingungen thermischer oder oxydativer Genese ausgesetzt sind. Das gehäufte Auftreten bei malignen Prozessen und Stressbedingungen, die Bedeutung bei zentralen Gen-Regulationsprozessen und der mögliche Einfluss auf die Zelladhäsion weisen deutlich auf die Rolle der FET-Regulationsproteine als Protoonkogene hin (Andersson, Stahlberg et al. 2008). Dies bestätigten auch genetische Aberrationen dieser Proteine in verschiedenen malignen Zellen (Rabbitts, Forster et al. 1993; Martini, La Starza et al. 2002). Das Zielantigen von BARB-4 ist eine 78-kDa große Variante des TAF15 und kommt, im Gegensatz zum Wildtyp, nicht nur intrazellulär sondern auch auf der Zelloberfläche vor (Abschnitt 3.1.2.). Die veränderte Lokalisation der Variante könnte in Zusammenhang mit veränderten Wirkmechanismen stehen, die TAF15 durch die Modifikation zu gewinnen scheint.

### 4.5.3. BARB-4 als Immunglobulin der Klasse IgG

Von den fünf Klassen der Immunglobuline zählen die tumorspezifischen Antikörper der innaten Immunität überwiegende zur Klasse der IgM. Natürliche IgG und IgA stellen dagegen nur je etwa ein Prozent der gegen Krebszellen gerichteten Antikörper (Brandlein, Pohle et al. 2003). Der wichtigste Unterschied der verschiedenen Antikörperklassen besteht in Ihrem F<sub>c</sub>-Teil. IgG sind die kleinsten und am besten gewebeängigen Antikörper. Diese Antikörper mit der schweren Kette vom Typ  $\gamma$ ,

stellen in der erworbenen im Gegensatz zur innatens Immunität den Großteil der Antikörper dar. IgA Antikörper sind meist Dimere deren schwere  $\alpha$ -Ketten über ein so genanntes J-Protein (Joining-Protein) verbunden sind. IgA's kommen in der erworbenen Immunität vorrangig als sekretorischer Antikörper in Sekreten und Umweltbarrieren wie Haut und Darmwand vor. Die Antikörper der Klasse IgM sind sozusagen der „first responder“ (erste Abwehr) der Immunabwehr. Die meist als Pentamer strukturierten Antikörper tragen viele Bindungsstellen und können so sehr effektiv an wirtsfremde Antigene auf Erregern oder Fremdstoffen binden. Die Aktivierung des Komplementsystems stellt im erworbenen Immunsystem eine wichtige Aufgabe der IgM dar. Ähnlich der Struktur von IgA Antikörpern sind die schweren  $\mu$ -Ketten mit J-Proteinen verknüpft. IgE stellen im menschlichen Körper den geringsten Anteil. Diese Antikörper kommen insbesondere gebunden an Mastzellen vor und spielen eine Rolle in der Parasitenabwehr und bei allergischen Reaktionen. Über die biologische Funktion der ebenfalls als Monomer vorkommenden IgD ist bisher wenig bekannt (Murphy 2009). Tabelle 11 gibt eine Übersicht über die verschiedenen Klassen der Immunglobuline.

**Tabelle 11: Übersicht über die Klassen der Immunglobuline.**

	IgG	IgA	IgM	IgD	IgE
<b>Molekulargewicht</b>	150kD	160kD*	900kD*	184kD	190kD
<b>Schwere Ketten</b>	$\gamma$	$\alpha$	$\mu$	$\delta$	$\epsilon$
<b>Aufbau</b>	Monomer	Dimer	Pentamer	Monomer	Monomer

\*: exklusive J-Proteine (Tabelle nach (Murphy, Travers et al. 2008))

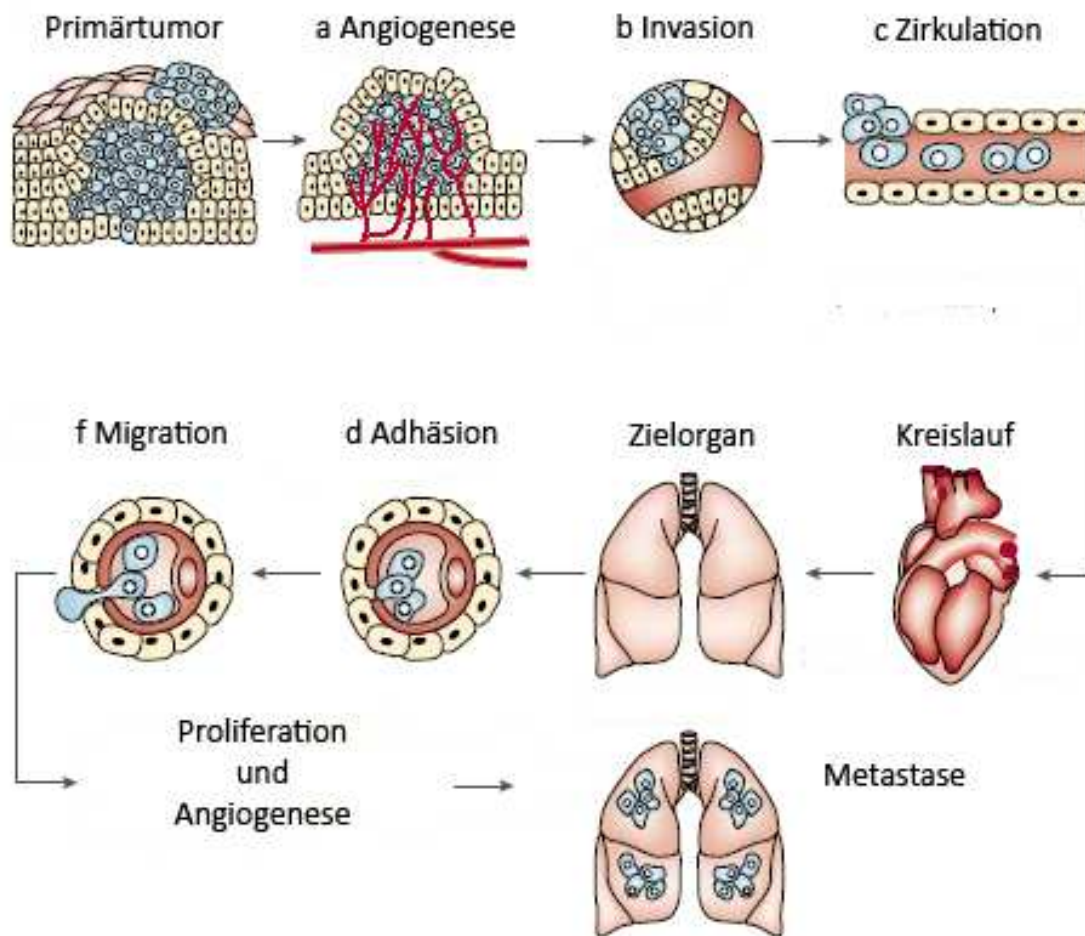
Die Molekülgröße der Antikörper nimmt Einfluss auf die Eigenschaften und Lokalisation der Immunglobuline im Körper. Besonders IgG zeichnen sich durch eine besonders ausgeprägte Fähigkeit zur Diffusion aus (Murphy 2009). Es sind die einzigen Immunglobuline die sogar die Plazentaschranke überwinden, und so von der Mutter auf den Fetus übertragen werden können. Zwar konnten Untersuchungen zeigen, dass

auch IgM's die Blutbahn verlassen und sich im Tumorgewebe anreichern können (Vollmers and Brandlein 2006). Es ist aber durchaus wahrscheinlich, dass die innaten IgG besser diffundieren und sich damit schneller in höheren Konzentrationen im Zielgewebe anhäufen. Besonders interessant ist daher die Isolierung eines tumorspezifischen IgG, des BARB-4, gerade in Hinblick auf die Unterschiede zu den bisher beschriebenen Antikörpern, die ja ausnahmslos der Klasse IgM angehören (Schatz, Brandlein et al. 2010). Die bessere Gewebegängigkeit könnte dazu beitragen, die nötige therapeutische Dosis zu reduzieren.

#### **4.6. Invasion und Metastasierung**

Nach Weinberg zählt die Gewebeinvasion und Metastasierung zu einer der Grundeigenschaften einer malignen Neoplasie (Hanahan and Weinberg 2000). Für die Bildung einer Fernmetastase müssen die Tumorzellen allerdings verschiedene Hürden meistern. Es gibt unterschiedliche Arten, wie maligne Zellen verschleppt werden können. Neben peritonealer und lymphogener Metastasierung interessiert hier vor allem die hämatogene Streuung von Tumorzellen. Die Metastasierung über das Gefäßsystem erfolgt grob in drei Schritten. Zunächst benötigt der Tumor den Zugang zu einem Blutgefäß und muss dazu die Basalmembran durchdringen. Bestimmte Rezeptoren (Lamine) ermöglichen die Anheftung an die Basalmembran, die dann mittels sekretorischer Proteasen, so genannter Matrixmetalloproteasen (MMP), durchbrochen werden kann (Morini, Mottolese et al. 2000; Chang and Werb 2001; Gassmann, Enns et al. 2004). Die vaskuläre Verschleppung stellt die zweite große Hürde dar. Abwehrmechanismen des Körpers, insbesondere die der innaten Immunität, haben hier die besten Voraussetzungen, die Tumorzellen auszuschalten. Sollte es den Tumorzellen dennoch gelingen, dem Immunsystem zu entkommen, heftet sich die Zelle, unterstützt durch einen Thrombozyten- und Fibrinmantel, an die Gefäßinnenwand an, durchdringt diese wiederum mit Hilfe proteolytischer Enzyme und wandert in das Zielgewebe (Chang and Werb 2001; Bogenrieder and Herlyn 2003). Hier kann sich die Zelle niederlassen und proliferieren. Die Versorgung der Metastase mit Nährstoffen stellt ein letztes Hindernis dar. Bei einem Tumor mit einem

Durchmesser von mehr als  $100\mu\text{m}$  ist die Versorgung der Zellen durch Diffusion nicht mehr ausreichend und das weitere Wachstum ist nur durch Initiation der Angiogenese möglich (Bouck, Stellmach et al. 1996; Hanahan and Weinberg 2000). Diese erfordert die Sezernierung von Wachstumsfaktoren wie FGF (Fibroblast growth factor) und VEGF (Vascular endothelial growth factor) (Holland 2000).



**Abbildung 10: Stationen auf dem Weg zur Metastasierung.** Wichtige Schritte stellen insbesondere die Invasion und den Einbruch in die Gefäßstrasse (b), die Zirkulation der Tumorzellen (c), die Adhäsion am Endothel des Zielorgans (d) sowie die Migration ins Zielgewebe (f) dar. Erneute Proliferation und Angiogenese führen zur Etablierung einer Metastase. Grafik nach (Fidler 2003).

Diese Hürden auf dem Weg zur Metastase verringern die Erfolgsaussichten einer Absiedelung deutlich. Quantitative Untersuchungen haben ergeben, dass 24h nach intravasaler Injektion von Tumorzellen noch 0,1% vital sind und nur 0,01% dieser Zellen tatsächlich Metastasen bilden (Fidler 1970). Ob eine Tumorzelle eine Metastase bildet



oder nicht, ist dabei nicht allein eine Frage der Wahrscheinlichkeit, sondern das Ergebnis einer Selektion von Zellen, die aufgrund ihrer genetischen Ausstattung besser für die Hindernisse auf dem Weg zur Metastase gewappnet sind (Fidler 2003).

Die Verteilung von Metastasen im Körper geschieht nicht zufällig. Jede Tumorentität bevorzugt unterschiedliche Organe als primäre Metastasen-Lokalisation. Dieses Phänomen wird als „seed and soil“ oder auch Homing-Phänomen bezeichnet (Paget 1989). Lange wurde vermutet, dass vor allem die Anatomie der Gefäßstraßen entscheidend für die Zielorgane der Metastasierung ist. Begründer dieser Theorie war in den 1930iger Jahren James Ewing (Ewing 1928). Aus dieser Annahme und klinischen Beobachtungen entstanden auch so genannte „Metastasierungstypen“ wie die cavale oder die portale Metastasierung. Zahlreiche Untersuchungen der letzten Jahrzehnte stützen aber vielmehr die so genannte „seed and soil“ Theorie (Fidler 2003). Nach heutiger Auffassung bestimmen besonders drei im Folgenden dargestellte Prinzipien die Wahrscheinlichkeit und die Art der Metastasierung eines Tumors:

Zunächst besteht die primäre Neoplasie, wie bereits erwähnt, aus genotypisch und phänotypisch divergierenden Subpopulationen, von denen nur wenige Zelllinien die genetische Potenz zur Metastasierung erlangen. Dies wird auch als genetische Heterogenität bezeichnet. Die Zellen erfahren besondere Anforderungen an die Resistenz gegen NK-Lymphozyten, die Lectin-Resistenz und an die Adhäsions- und Motilitätsfähigkeit. Zellen mit der Fähigkeit zur Metastasierung zeigen dabei eine hohe genetische Instabilität im Vergleich zu anderen Zellen des Primärtumors (Hanahan and Weinberg 2011). Neue Ansätze sprechen hierbei insbesondere so genannten Tumorstammzellen eine besondere Bedeutung zu. Die Hypothese der Tumorstammzelle wird derzeit wieder vermehrt diskutiert. Es wird vermutet dass nur eine geringe Anzahl von Zellen, die so genannten „Tumorstammzellen“, Stammzell-ähnliche Eigenschaften aufweisen und für die Tumorinitiation eine entscheidende Rolle spielen (Lobo, Shimono et al. 2007). Diese Zellen zeigen ähnlich wie physiologische Stammzellen viele Eigenschaften, die für eine erfolgreiche Metastasierung nötig sind, und könnten in Verbindung mit einer erhöhten genetischen

Variabilität eine wichtige Rolle in der Metastasierung spielen. Der Anstoß zu dieser Entdifferenzierung und der Entwicklung der metastatischen Potenz könnte auf die Auseinandersetzung dieser Tumorstammzellen mit Stressfaktoren, insbesondere der Hypoxie, zurückzuführen sein (Barnhart and Simon 2007).

Das zweite Prinzip der „seed and soil“-Theorie beschreibt die Selektivität des Metastasierungsprozesses, bei dem nur die Zellen („the seed“) überleben, die den oben aufgeführten Hindernissen der Metastasierung widerstehen. Diese Eigenschaften erlangen in einer Tumorphilipulation allerdings nur wenige Zellen (Fidler and Kripke 1977). Metastasen können von einer einzelnen Zelle, oder mehreren, genetisch verschiedenen Zellen des Primärtumors abstammen und entwickeln sich klonal aus einer oder weniger emigrierter Zellen (Talmadge, Wolman et al. 1982; Fidler and Talmadge 1986; Frost and Fidler 1986).

Der dritte Faktor wird durch die Eigenschaften des Zielgewebes definiert und ist der wohl wichtigste Faktor, der über die Entstehung neuer Metastasen bestimmt. Diese neue Tumorumgebung („soil“) entscheidet durch die Kompatibilität von Oberflächenrezeptoren der Gefäßwände und des Organs, der Wachstumsfaktoren sowie der Möglichkeiten zur Angiogeneese über den Erfolg einer Tumorsiedlung.

Einige der heutigen Therapieansätze versuchen, in diese Homöostase-Faktoren des Zielorgans einzugreifen und dem Tumor damit die Implantation zu erschweren. Die Blockade der Angiogeneese ist einer dieser Faktoren, die helfen können die Metastasierung zu verhindern. Eines der daraus entstandenen Medikamente, die bereits klinisch eingesetzt werden, ist beispielweise der VEGF-Rezeptorblocker Bevacizumab (Handelsname Avastin®) (Los, Roodhart et al. 2007; Schneider and Sledge 2007).

Die Erkenntnisse dieses „hallmarks of cancer“-Modells zeigen auch Möglichkeiten therapeutischen Einschreitens auf. Gelingt es nur eine „hallmark“ auszuschalten, kann man eventuell das Wachstum des gesamten Tumors stoppen oder ihn sogar in Regression zwingen. Eine genaue Betrachtung der biologischen Vorgänge und Signalwege ist daher von äußerster Wichtigkeit, da es nur so möglich ist, spezifische

Schlüsselstrukturen veränderter Zellprozesse auszumachen und diese mit spezifischen Stoffen, wie zum Beispiel mit Antikörpern, zu eliminieren.

#### **4.7. Zelladhäsion und Zellmotilität**

Die Invasion und Metastasierung von Neoplasien, nach Weinberg eine der „hallmarks of cancer“, hängt, wie bereits erwähnt, unmittelbar von der Fähigkeit der Zellen zur Adhäsion und Migration ab. Die Metastasierung kann nur erfolgreich sein, wenn alle Schritte dieser Kaskade funktionieren und die Tumorzellen adhären und nachfolgend extravadiieren können. Neben lokal invasivem Wachstum mit Einbruch des Tumors in die Gefäßstraßen, Extravasation, Zirkulation, Proliferation und Angiogenese der Satellitenzelle ist besonders die Adhäsion ein Engpass auf dem Weg zur erfolgreichen Metastasierung. Dies liegt unter anderem an der Komplexität dieses Vorganges, der nur bei einem reibungslosen Ablauf unterschiedlichster Oberflächen-Bindungen stattfinden kann. Für die Komplexität dieser Vorgänge spricht auch die geringe Erfolgsquote intravasal gelangter Tumorzellen von gerade einmal 0,01% (Fidler 1970), die sicherlich auch aus der körpereigenen Abwehr durch das innate Immunsystem resultiert.

Für die verschiedenen Schritte der Zellausschwemmung und der Ansiedlung im fremden Gewebe sind zahlreiche unterschiedliche Bindungsproteine verantwortlich. Die Extravasation beginnt mit der Anheftung an den Endothelzellen. Die Gruppe der Selektine führt zur zunächst losen Anheftung der Tumorzelle an die Gefäßwand. Diese Anheftung unterscheidet sich jedoch deutlich von den Vorgängen bei der Emigration von Leukozyten, die ebenfalls Selektine besitzen, und erlaubt kein „Rollen“, sondern führt zur ortsständigen Bindung (Glinskii, Huxley et al. 2003). Nach erfolgter Bindung an das Endothel verändert die Tumorzelle Ihre Struktur, verlässt die Blutbahn, wandert in das Gewebe ein und entgeht so der für sie toxischen Umgebung und der Überwachung durch das Immunsystem. Für diese Migration nutzt die Zelle Zell-Matrix-Verbindungen, die durch Integrine zustande kommen (Hood and Cheresch 2002). Integrine spielen auch physiologisch bei der Zellmigration im Rahmen eines Entzündungsprozesses eine wichtige Rolle. Experimentelle Untersuchungen haben

gezeigt, dass die Ausprägung von Integrinen auf Tumorzellen unmittelbar mit dem Grad der Motilität korreliert. Zudem konnte ein Zusammenspiel von Integrinen mit den oben erwähnten und für das invasive Wachstum wichtigen Matrixmetallproteasen (MMP) nachgewiesen werden (Morini, Mottolese et al. 2000). Allerdings zeigt sich die exzellente Anpassungsfähigkeit und maligne Potenz der Tumorzellen nach gezieltem Ausschalten dieser Proteasen. Die Zelle nutzt dann amöboide Fortbewegungsmittel und kompensiert so die fehlenden proteolytische Mechanismen (Wolf, Mazo et al. 2003).

Ein weiteres Beispiel für die vielfältigen Kompensationsmöglichkeiten der Tumorzellen zeigt sich bei genauer Betrachtung des Adhäsions-Assay's in Abschnitt 3.2.1.. Die Zugabe des Antikörpers BARB-4 hemmt besonders 30min bzw. 45min nach Versuchsansatz die Adhäsion der Tumorzellen. Im weiteren Verlauf nimmt die Zahl der adhärenenten Zellen relativ zu dem Ansatz mit RPMI wieder zu. Es ist zu vermuten, dass zu diesem Zeitpunkt der Antikörper BARB-4 zum Teil bereits endozytiert wurde und der Anteil funktionell aktiver Antikörper gesunken ist. Dies korreliert auch mit den Ergebnissen des Endozytose-Assay's aus Abschnitt 3.1.3.. Eine weitere Ursache könnte auch die Ausbildung anderer adhäsiver Strukturen und Zell-Matrix-Verbindungen darstellen, mit denen die Tumorzelle die blockierten Adhäsionsproteine kompensiert.

Die Zusammenschau aktueller Arbeiten über die Rolle von Adhäsion und Migration lässt deren Bedeutung für die Metastasierung erkennen. Darüber hinaus scheint die Spezifität der Zell-Zell bzw. Zell-Matrix-Verbindungen auch für die beobachtete Bevorzugung bestimmter Organe für die Metastasen, also der „seed and soil“-Theorie, verantwortlich zu sein (Gassmann, Enns et al. 2004).

### **4.8. Die Rolle des TAF15 bei Zelladhäsion und Zellmotilität**

Wie oben beschrieben hat das Zielprotein von BARB-4, eine Variante von TAF15, normalerweise regulatorische Aufgaben bei Transkriptionsvorgängen. Insbesondere die Entdeckung von FUS und TAF15 in so genannten „spreading initiation centers“ (SIC) adhärerender Zellen ist aber bemerkenswert. Diese Zentren existieren nur zu Beginn

eines Bewegungsprozesses und können mit Hilfe der spezifischer Marker Vinculin, FAK (Focal adhesion kinase) und RACK1 (receptor of activated kinase 1) detektiert werden (de Hoog, Foster et al. 2004).

Zudem wurde eine Interaktion zwischen den Proteinen der FET-Gruppe und v-Src (Viral Sarcoma Protein), einer mutierten Form des c-Src (Cellular Sarcoma Protein), festgestellt (Lee, Kim et al. 2004). Die Src (Sarcoma)-Proteine sind Tyrosin-Kinasen, denen Aufgaben bei der Induktion von Zellbindungen sowie bei der Umstrukturierung des Actin-Filaments zugesprochen werden (Frame, Fincham et al. 2002). In Neoplasien konnte ein erhöhter c-Src-Spiegel mit vermehrter Zell-Motilität in Korrelation gebracht werden (Sakamoto, Takamura et al. 2001). Das Protein scheint Integrin-abhängige Zell-Matrix-Verbindungen zu modulieren und damit Adhäsionsstrukturen und die Zellwanderung zu beeinflussen (Jones, Avizienyte et al. 2002). Die Hochregulierung von Src in Tumorzellen initiiert die Bildung von  $\alpha$ -Integrin und die gleichzeitige Herunterregulierung von FAK (Focal adhesion kinase), einem Protein, das zur Lösung von Adhäsionsverbindungen und zur Einleitung der Apoptose von entarteten Zellen führt (Park, Golubovskaya et al. 2004). Das gehäufte Vorkommen von TAF15 in diesen SIC-Zentren harmoniert zudem gut mit den Ergebnissen dieser Arbeit, wonach die Bindung des BARB-4 an TAF15 die Adhäsion und Bewegung von malignen Zellen hemmt. So zeigen Zellen derem Medium BARB-4 zugegeben wurde eine deutlich verminderte Adhäsionsfähigkeit (Abschnitt 3.2.1). Darüberhinaus konnte in Zellmotilitätsversuchen qualitativ eine Reduktion der Zellwanderung unter BARB-4 im Vergleich zur Isotypkontrolle mit ChromPure IgG nachgewiesen werden (Abschnitt 3.2.2.). Diese Erkenntnisse und die Ergebnisse dieser Arbeit bekräftigen die Annahme, dass die Proteine der FET-Gruppe, insbesondere TAF15, in Adhäsions- und Motilitätsvorgängen in Tumorzellen involviert sind (Andersson, Stahlberg et al. 2008).

### **4.9. Endozytose**

Neben direkten, funktionellen Untersuchungen erlaubt auch die Lokalisation und der weitere Verbleib des Antikörpers nähere Rückschlüsse auf seine Aufgaben und Auswirkungen in den und auf die Zellen. Nachdem erfolgreich bewiesen werden

konnte, dass BARB-4 an Oberflächen von Tumorzellen bindet (Abschnitt 3.1.3.), war ein weiteres Verfahren nötig, dass sowohl den Bindungsort von BARB-4 präzisierte, als auch Rückschlüsse auf den weiteren Verlauf nach erfolgter Antikörper-Antigen-Bindung zuließ. Hierzu wurde der unter Abschnitt 2.2.4. beschriebene Endozytose-Versuch durchgeführt. Die hier verwendete Technik der direkten Antikörper-Markierung mit fluoreszierenden Farbstoffen erlaubte unter Verwendung eines entsprechenden Konfokal-Mikroskops eine gute Differenzierung zwischen extrazellulärer, oberflächengebundener oder intrazellulärer Lage des BARB-4. Hierdurch konnte gezeigt werden, dass der Antikörper in der ersten Stunde nach Inkubation an die Zelloberflächen bindet. Nach einer weiteren Stunde konnte er verteilt im Interzellularraum nachgewiesen werden. Welche Bedeutung dies für eventuell veränderte Signalwege hat, ist Gegenstand der aktuellen Forschung. Denkbar wären sowohl Signalkaskaden, die durch die Bindung an die tumorspezifische TAF15 Variante an der Zelloberfläche direkt ausgelöst werden, wie auch eine Wanderung des TAF15-BARB-4-Komplexes in das Zellinnere. Letzteres ist wahrscheinlicher, da es dem physiologischen Aufgabenfeld von TAF15, der Beteiligung an Transkriptions- und Splicingvorgängen, nahe kommt (Schatz, Brandlein et al. 2010). Zudem könnte dies mit der Lokalisation in „spreading initiation centers“ (SIC) (de Hoog, Foster et al. 2004), und der in den Abschnitten 3.2.1. und 3.2.2. beschriebenen Rolle bei Adhäsions- und Migrationsvorgängen der Zellen korrelieren. Diese Zusammenhänge genauer auszuleuchten wird Gegenstand weitergehender Forschungsarbeiten darstellen.

#### **4.10. Notwendigkeit neuer Behandlungsstrategien**

Die Folgen der Metastasierung einer malignen Neoplasie stellen die Haupttodesursachen aller an Tumoren Erkrankter dar. 90 Prozent der Patienten sterben demnach nicht an den Folgen lokal verdrängendem oder invasivem Wachstums mit entsprechender Redression des den Primärtumor umliegenden Gewebes, sondern an der Absiedelung von zahlreichen Metastasen, die dann lebensnotwendige Organe funktionsuntüchtig machen (Sporn 1996). Alle bisherigen Anstrengungen diese besonders bedrohliche Eigenschaft von Tumoren zu bekämpfen

sind weitestgehend fehlgeschlagen. Das häufige Versagen bisheriger Behandlungsregime, die chirurgische, strahlentherapeutische und chemotherapeutische Maßnahmen einschließen, ist darauf zurückzuführen, dass all diese Angriffe vorwiegend makroskopischen Tumoren gelten können. Die größte Gefahr und schädliche Potenz eines Tumors geht aber, sobald dieser die Blutschanke erfolgreich überwunden hat, von unzähligen disseminierten Tumorzellen aus, die sich jeglicher lokaler Therapie entziehen.

Metastasen sind genetisch oft noch instabiler als Zellen des Primärtumors. Dies ist zum Einen auf die vielen notwendigen genetischen Veränderungen der Zellen während der Metastasierung, zum Anderen durch die ständige Exposition gegenüber Stressfaktoren im Tumorgewebe bedingt (Barnhart and Simon 2007; Campbell, Yachida et al. 2010; Pani, Galeotti et al. 2010). Zudem entwickeln Metastase häufig Modifikationen gegenüber dem Primärtumor. Diese genetische Instabilität und Heterogenität kann dazu führen, dass die Therapie die Metastasen eines Chemotherapeutika-sensiblen Primärtumors nicht mehr einschließt. Dieser Umstand ist ein weiterer Faktor der bei metastasierten Tumoren derzeit oft nur noch ein palliatives Therapieregime erlaubt.

Die Schlüsselvorgänge bei der Invasion und Metastasierung zu blockieren und die malignen Zellen selektiv zu eliminieren ist eine große Herausforderung an die Medizin, und beinhaltet gleichzeitig eine enorme therapeutische Potenz. Die größte Waffe gegen Krebs besitzt der Mensch in Form des Immunsystems selbst, und in den meisten Fällen ist diese auch erfolgreich. Spezifische Bestandteile des Immunsystems gezielt gegen funktionelle Strukturen maligner Neoplasien einzusetzen, bietet ungeahnte therapeutische Möglichkeiten. Der erste Schritt hierzu ist sicherlich das tiefgreifende Verständnis der Arbeitsweisen des Immunsystems. Und bereits heute gibt es vorzeigbare Erfolge bei Anwendungen dieser Erkenntnisse. Diesen eleganten, effizienten und nahezu nebenwirkungsfreien Therapien gehört sicherlich die Zukunft in der Bekämpfung von Neoplasien.

Mit BARB-4 gelang die Generierung eines innaten, rein humanen Antikörpers, der spezifisch an Tumorzellen bindet. Diese Arbeit liefert wichtige Daten die einen Beitrag

zu der Erforschung der funktionellen Eigenschaften dieses Antikörpers darstellen. Die Ergebnisse der Untersuchungen funktioneller Auswirkungen von BARB-4 auf maligne Zellen zeigen eindeutig einen Einfluss auf das Adhäsions- und Motilitätsverhalten. Dies gibt Grund zu der Hoffnung, der Antikörper könnte in der Zukunft therapeutisch gegen die Bildung von Metastasen eingesetzt werden. BARB-4 könnte ein potentes Mittel gegen die häufigste Todesursache an Krebs erkrankter Patienten, und ein wichtiger Schritt im Kampf gegen den Krebs darstellen.



## **5. Zusammenfassung**

---

## 5. Zusammenfassung

Der menschliche Organismus ist zeitlebens von malignen Neoplasien bedroht, die durch lokales oder metastasiertes Wachstum lebensnotwendige Funktionen des Körpers beeinträchtigen können. Als wichtigstes Werkzeug zur Abwehr dieser Neoplasien wurde in den letzten Jahrzehnten die natürliche Immunität aufgedeckt. Besonders die Antikörper der innaten Immunität spielen eine entscheidende Rolle.

BARB-4 ist ein humaner, tumorspezifischer Antikörper und Teil dieser natürlichen Immunität. Er wurde mit Hilfe der Hybridomatechnologie aus einem Patienten mit Siegelringkarzinom des Magens isoliert, und ist einer der wenigen Vertreter innater humaner IgG Antikörper.

Diese Arbeit gibt einen ersten Überblick über die Bindungsspezifität und die funktionellen Eigenschaften des BARB-4-Antikörpers. In den immunhistochemischen Färbungen konnte die Tumorspezifität des Antikörpers nachgewiesen werden. Bei dem zugehörigen Antigen handelt es sich um eine Variante des TAF15, einem Protein der FET-Familie, die intrazelluläre Aufgaben bei Transkriptionsvorgängen haben, bei denen zudem aber auch eine Beteiligung an Adhäsions- und Migrationsvorgängen vermutet wird. Diese Variante ist bei malignen Zellen an der Oberfläche lokalisiert, was die Ergebnisse der Durchflußzytometrie belegen. Durch konfokale Mikroskopie mit Fluoreszenz-markiertem BARB-4 konnte diese Oberflächenbindung an Tumorzellen bestätigt werden. Im weiteren zeitlichen Verlauf konzentrierte sich der Antikörper im Zellinneren.

Die Präsenz des Antikörpers führte bei Versuchen mit Tumorzellen zu einer bemerkenswerten Hemmung der Adhäsions- und Migrationsfähigkeit der Zellen. Beide stellen Schlüsseigenschaften für die Metastasierung von Tumorzellen dar. Diese Eigenschaften könnten BARB-4 für einen möglichen, therapeutischen Einsatz zur Prävention von Tumormetastasen qualifizieren.

## Summary

Throughout live, the human body is threatened by malign neoplasms whose local or metastasizing growth can restrict its essential functions. In the last decades, natural immunity was discovered as an instrumental tool in the fight against these neoplasms. Especially antibodies of the innate immune response play a central role in this defense.

BARB-4 is part of this repertoire of antibodies. B-cells producing BARB-4 were isolated from a patient suffering from signet ring carcinoma, and propagated using Hybridoma-technology. While most antibodies of the innate immune response are of the IgM subclass, BARB-4 is an IgG antibody.

This work offers an assessment of the specificity and functional properties of BARB-4. By using immuno-histochemistry, it could be shown that BARB-4 specifically binds to human cancer cells. More specifically BARB-4 binds to a variant of TAF15, a member of the FET family of transcriptional regulators. TAF15 is also assumed to be involved in adhesion and cell-migration. Flow-cytometry confirmed its localization to the plasma-membrane, which is unique to this tumor-specific variant of TAF15. Subsequent confocal microscopy showed that after initial binding of TAF15, the BARB-4 antibody is internalized by the bound cancer cells. Remarkably, BARB-4 treatment of cancer cells resulted in the inhibition of their ability to adhere and migrate. As both adhesion and migration are hallmarks of metastasis in cancer cells, BARB-4 is a possible candidate for therapeutic prevention of cancer metastasis.

## **6. Literaturverzeichnis**

---

## 6. Literaturverzeichnis

### 6.1. Verwendete Literatur

- Andersson, M. K., A. Stahlberg, et al. (2008). "The multifunctional FUS, EWS and TAF15 proto-oncoproteins show cell type-specific expression patterns and involvement in cell spreading and stress response." BMC Cell Biol **9**: 37.
- Avni, R., B. Cohen, et al. (2011). "Hypoxic stress and cancer: imaging the axis of evil in tumor metastasis." NMR Biomed **24**(6): 569-581.
- Barnhart, B. C. and M. C. Simon (2007). "Metastasis and stem cell pathways." Cancer Metastasis Rev **26**(2): 261-271.
- Boes, M. (2000). "Role of natural and immune IgM antibodies in immune responses." Mol Immunol **37**(18): 1141-1149.
- Bogenrieder, T. and M. Herlyn (2003). "Axis of evil: molecular mechanisms of cancer metastasis." Oncogene **22**(42): 6524-6536.
- Bouck, N., V. Stellmach, et al. (1996). "How tumors become angiogenic." Adv Cancer Res **69**: 135-174.
- Brandlein, S., I. Beyer, et al. (2003). "Cysteine-rich fibroblast growth factor receptor 1, a new marker for precancerous epithelial lesions defined by the human monoclonal antibody PAM-1." Cancer Res **63**(9): 2052-2061.
- Brandlein, S., M. Eck, et al. (2004). "PAM-1, a natural human IgM antibody as new tool for detection of breast and prostate precursors." Hum Antibodies **13**(4): 97-104.
- Brandlein, S., T. Pohle, et al. (2003). "Natural IgM antibodies and immunosurveillance mechanisms against epithelial cancer cells in humans." Cancer Res **63**(22): 7995-8005.
- Brandlein, S., T. Pohle, et al. (2004). "CFR-1 receptor as target for tumor-specific apoptosis induced by the natural human monoclonal antibody PAM-1." Oncol Rep **11**(4): 777-784.
- Brandlein, S., N. Rauschert, et al. (2007). "The human IgM antibody SAM-6 induces tumor-specific apoptosis with oxidized low-density lipoprotein." Mol Cancer Ther **6**(1): 326-333.
- Brandlein, S. and H. P. Vollmers (2004). "Natural IgM antibodies, the ignored weapons in tumour immunity." Histol Histopathol **19**(3): 897-905.
- Brigl, M. and M. B. Brenner (2004). "CD1: antigen presentation and T cell function." Annu Rev Immunol **22**: 817-890.
- Bundesamt, S. (2010 (a)). "Gesundheit Todesursachen in Deutschland 2008." destatis, Statistisches Bundesamt, Wiesbaden Fachserie 12 Reihe 4.
- Bundesamt, S. (2010 (b)). Pressemitteilung Nr.371.
- Burrus, L. W., M. E. Zuber, et al. (1992). "Identification of a cysteine-rich receptor for fibroblast growth factors." Mol Cell Biol **12**(12): 5600-5609.
- Campbell, P. J., S. Yachida, et al. (2010). "The patterns and dynamics of genomic instability in metastatic pancreatic cancer." Nature **467**(7319): 1109-1113.

- Casali, P. and E. W. Schettino (1996). "Structure and function of natural antibodies." Curr Top Microbiol Immunol **210**: 167-179.
- Chang, C. and Z. Werb (2001). "The many faces of metalloproteases: cell growth, invasion, angiogenesis and metastasis." Trends Cell Biol **11**(11): S37-43.
- de Hoog, C. L., L. J. Foster, et al. (2004). "RNA and RNA binding proteins participate in early stages of cell spreading through spreading initiation centers." Cell **117**(5): 649-662.
- Deutsche Krebsgesellschaft e.V., Ed. (2008). Kurzgefasste Interdisziplinäre Leitlinien 2008, Zuckschwerdt Verlag.
- Ewing, J. (1928). "Neoplastic Diseases." Philadelphia PA, Sanders.
- Faller, G., H. P. Vollmers, et al. (1990). "HAB-1, a new heteromyeloma for continuous production of human monoclonal antibodies." Br J Cancer **62**(4): 595-598.
- Fidler, I. J. (1970). "Metastasis: quantitative analysis of distribution and fate of tumor embolilabeled with <sup>125</sup>I-5-iodo-2'-deoxyuridine." J Natl Cancer Inst **45**(4): 773-782.
- Fidler, I. J. (2003). "The pathogenesis of cancer metastasis: the 'seed and soil' hypothesis revisited." Nat Rev Cancer **3**(6): 453-458.
- Fidler, I. J. and M. L. Kripke (1977). "Metastasis results from preexisting variant cells within a malignant tumor." Science **197**(4306): 893-895.
- Fidler, I. J. and J. E. Talmadge (1986). "Evidence that intravenously derived murine pulmonary melanoma metastases can originate from the expansion of a single tumor cell." Cancer Res **46**(10): 5167-5171.
- Foulds, L. (1954). "The experimental study of tumor progression: a review." Cancer Res **14**(5): 327-339.
- Frame, M. C., V. J. Fincham, et al. (2002). "v-Src's hold over actin and cell adhesions." Nat Rev Mol Cell Biol **3**(4): 233-245.
- Frost, P. and I. J. Fidler (1986). "Biology of metastasis." Cancer **58**(2 Suppl): 550-553.
- Gassmann, P., A. Enns, et al. (2004). "Role of tumor cell adhesion and migration in organ-specific metastasis formation." Onkologie **27**(6): 577-582.
- Glennie, M. J. and J. G. van de Winkel (2003). "Renaissance of cancer therapeutic antibodies." Drug Discov Today **8**(11): 503-510.
- Glinkskii, O. V., V. H. Huxley, et al. (2003). "Continuous real time ex vivo epifluorescent video microscopy for the study of metastatic cancer cell interactions with microvascular endothelium." Clin Exp Metastasis **20**(5): 451-458.
- Greaves, M. (2007). "Darwinian medicine: a case for cancer." Nat Rev Cancer **7**(3): 213-221.
- Greaves, M. (2010). "Cancer stem cells: back to Darwin?" Semin Cancer Biol **20**(2): 65-70.
- Hahn, K., Schulz et al., Ed. (2009). Medizinische Mikrobiologie und Infektiologie, Springer, Berlin.
- Hanahan, D. and R. A. Weinberg (2000). "The hallmarks of cancer." Cell **100**(1): 57-70.
- Hanahan, D. and R. A. Weinberg (2011). "Hallmarks of cancer: the next generation." Cell **144**(5): 646-674.
- Heine, H. and E. Lien (2003). "Toll-like receptors and their function in innate and adaptive immunity." Int Arch Allergy Immunol **130**(3): 180-192.

- Hensel, F., S. Brandlein, et al. (2001). "A novel proliferation-associated variant of CFR-1 defined by a human monoclonal antibody." Lab Invest **81**(8): 1097-1108.
- Hensel, F., R. Hermann, et al. (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**(11): 1553-1563.
- Hensel, F., R. Hermann, et al. (1999). "Characterization of glycosylphosphatidylinositol-linked molecule CD55/decay-accelerating factor as the receptor for antibody SC-1-induced apoptosis." Cancer Res **59**(20): 5299-5306.
- Holland, F., Bast, Kufe, Pollock, Weichselbaum, Ed. (2000). Cancer Medicine, BC Decker, London.
- Holmer, A. F. (2004). "Cetuximab in colon cancer." N Engl J Med **351**(15): 1575-1576; author reply 1575-1576.
- Hood, J. D. and D. A. Cheresh (2002). "Role of integrins in cell invasion and migration." Nat Rev Cancer **2**(2): 91-100.
- Hoogenboom, H. R. (2005). "Selecting and screening recombinant antibody libraries." Nat Biotechnol **23**(9): 1105-1116.
- Humblet, Y. (2004). "Cetuximab: an IgG(1) monoclonal antibody for the treatment of epidermal growth factor receptor-expressing tumours." Expert Opin Pharmacother **5**(7): 1621-1633.
- Hunter, K., D. R. Welch, et al. (2003). "Genetic background is an important determinant of metastatic potential." Nat Genet **34**(1): 23-24; author reply 25.
- Illert, B., C. Otto, et al. (2005). "Human antibody SC-1 reduces disseminated tumor cells in nude mice with human gastric cancer." Oncol Rep **13**(4): 765-770.
- Illert, B., W. Timmermann, et al. (2005). "[New concepts in treatment of gastric carcinoma]." Rozhl Chir **84**(8): 432-435.
- Jager, D. (2007). "Potential target antigens for immunotherapy identified by serological expression cloning (SEREX)." Methods Mol Biol **360**: 319-326.
- Jones, R. J., E. Avizienyte, et al. (2002). "Elevated c-Src is linked to altered cell-matrix adhesion rather than proliferation in KM12C human colorectal cancer cells." Br J Cancer **87**(10): 1128-1135.
- Kim, D. R., S. J. Park, et al. (2000). "V(D)J recombination: site-specific cleavage and repair." Mol Cells **10**(4): 367-374.
- Köhler, G. and C. Milstein (1975). "Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity." Nature **256**(5517): 495-497.
- Kumar, H., T. Kawai, et al. (2009). "Toll-like receptors and innate immunity." Biochem Biophys Res Commun **388**(4): 621-625.
- Lakowicz, J. R. (2010). "Principles of fluorescence spectroscopy." Springer-Verlag, New York third: S.186.
- Lang, G. (2006). "Histotechnik: Lehrbuch für biomedizinische Analytik." Springer-Verlag, Wien, New York: 266.
- Larrson, L.-. (1993). "Tissue preparation methods for light microscopic immunohistochemistry." Appl Immunohistochem; **1**:2-16.
- Lee, H. J., S. Kim, et al. (2004). "Stimulation of hTAFII68 (NTD)-mediated transactivation by v-Src." FEBS Lett **564**(1-2): 188-198.

- Lobo, N. A., Y. Shimono, et al. (2007). "The biology of cancer stem cells." Annu Rev Cell Dev Biol **23**: 675-699.
- Los, M., J. M. Roodhart, et al. (2007). "Target practice: lessons from phase III trials with bevacizumab and vatalanib in the treatment of advanced colorectal cancer." Oncologist **12**(4): 443-450.
- Martini, A., R. La Starza, et al. (2002). "Recurrent rearrangement of the Ewing's sarcoma gene, EWSR1, or its homologue, TAF15, with the transcription factor CIZ/NMP4 in acute leukemia." Cancer Res **62**(19): 5408-5412.
- Morini, M., M. Mottolese, et al. (2000). "The alpha 3 beta 1 integrin is associated with mammary carcinoma cell metastasis, invasion, and gelatinase B (MMP-9) activity." Int J Cancer **87**(3): 336-342.
- Murphy, K., P. Travers, et al. (2008). Janeway's immunobiology, Garland Science.
- Murphy, K., Travers, P., Walport, M. (2009). "Janeway Immunologie." Spektrum, Heidelberg **7. Auflage**.
- Nanda, R. (2007). "Targeting the human epidermal growth factor receptor 2 (HER2) in the treatment of breast cancer: recent advances and future directions." Rev Recent Clin Trials **2**(2): 111-116.
- Ormerod, M. G. (1999). "Flow Cytometry." Springer-Verlag, New York **2. Ausgabe**.
- Paget, S. (1989). "The distribution of secondary growths in cancer of the breast. 1889." Cancer Metastasis Rev **8**(2): 98-101.
- Pani, G., T. Galeotti, et al. (2010). "Metastasis: cancer cell's escape from oxidative stress." Cancer Metastasis Rev **29**(2): 351-378.
- Park, H. B., V. Golubovskaya, et al. (2004). "Activated Src increases adhesion, survival and alpha2-integrin expression in human breast cancer cells." Biochem J **378**(Pt 2): 559-567.
- Pohle, T., S. Brandlein, et al. (2004). "Lipoptosis: tumor-specific cell death by antibody-induced intracellular lipid accumulation." Cancer Res **64**(11): 3900-3906.
- Rabbitts, T. H., A. Forster, et al. (1993). "Fusion of the dominant negative transcription regulator CHOP with a novel gene FUS by translocation t(12;16) in malignant liposarcoma." Nat Genet **4**(2): 175-180.
- Rauschert, N., S. Brandlein, et al. (2008). "A new tumor-specific variant of GRP78 as target for antibody-based therapy." Lab Invest **88**(4): 375-386.
- Renz-Polster, H. and S. Krautzig (2008). "Basislehrbuch Innere Medizin." Urban&Fischer **4.Auflage**: S.622.
- RKI (2010 (a)). "Krebs in Deutschland 2005/2006. Häufigkeiten und Trends." Robert Koch-Institut (Hrsg) und die Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e. V., Berlin **7. Ausgabe**.
- RKI (2010 (b)). "Verbreitung von Krebserkrankungen in Deutschland. Entwicklung der Prävalenzen zwischen 1990 und 2010. Beiträge zur Gesundheitsberichterstattung des Bundes." Robert-Koch-Institut, Berlin.
- Roessner, A. (2008). "Allgemeine Pathologie und Grundlagen der Speziellen Pathologie." Elsevier Urban&Fischer: S. 120.
- Sahin, U., O. Tureci, et al. (1995). "Human neoplasms elicit multiple specific immune responses in the autologous host." Proc Natl Acad Sci U S A **92**(25): 11810-11813.



- Sakamoto, M., M. Takamura, et al. (2001). "Involvement of c-Src in carcinoma cell motility and metastasis." Jpn J Cancer Res **92**(9): 941-946.
- Schatz, N., S. Brandlein, et al. (2010). "Diagnostic and therapeutic potential of a human antibody cloned from a cancer patient that binds to a tumor-specific variant of transcription factor TAF15." Cancer Res **70**(1): 398-408.
- Schneider, B. P. and G. W. Sledge, Jr. (2007). "Drug insight: VEGF as a therapeutic target for breast cancer." Nat Clin Pract Oncol **4**(3): 181-189.
- Schroeder, H. W., Jr. and L. Cavacini (2010). "Structure and function of immunoglobulins." J Allergy Clin Immunol **125**(2 Suppl 2): S41-52.
- Singh, J. A., R. Christensen, et al. (2009). "A network meta-analysis of randomized controlled trials of biologics for rheumatoid arthritis: a Cochrane overview." CMAJ **181**(11): 787-796.
- Singh, J. A., R. Christensen, et al. (2009). "Biologics for rheumatoid arthritis: an overview of Cochrane reviews." Cochrane Database Syst Rev(4): CD007848.
- Sporn, M. B. (1996). "The war on cancer." Lancet **347**(9012): 1377-1381.
- Sporn, M. B. (1997). "The war on cancer: a review." Ann N Y Acad Sci **833**: 137-146.
- Talmadge, J. E., S. R. Wolman, et al. (1982). "Evidence for the clonal origin of spontaneous metastases." Science **217**(4557): 361-363.
- Tjandra, J. J., L. Ramadi, et al. (1990). "Development of human anti-murine antibody (HAMA) response in patients." Immunol Cell Biol **68 ( Pt 6)**: 367-376.
- Viani, G. A., S. L. Afonso, et al. (2007). "Adjuvant trastuzumab in the treatment of her-2-positive early breast cancer: a meta-analysis of published randomized trials." BMC Cancer **7**: 153.
- Vollmers, H. P. and S. Brandlein (2002). "Nature's best weapons to fight cancer. Revival of human monoclonal IgM antibodies." Hum Antibodies **11**(4): 131-142.
- Vollmers, H. P. and S. Brandlein (2005). "Death by stress: natural IgM-induced apoptosis." Methods Find Exp Clin Pharmacol **27**(3): 185-191.
- Vollmers, H. P. and S. Brandlein (2006). "Natural IgM antibodies: the orphaned molecules in immune surveillance." Adv Drug Deliv Rev **58**(5-6): 755-765.
- Vollmers, H. P. and S. Brandlein (2007). "Natural antibodies and cancer." J Autoimmun **29**(4): 295-302.
- Vollmers, H. P. and S. Brandlein (2009). "Natural antibodies and cancer." N Biotechnol **25**(5): 294-298.
- Vollmers, H. P. and S. Brandlein (2009). "Natural human immunoglobulins in cancer immunotherapy." Immunotherapy **1**(2): 241-248.
- Vollmers, H. P., F. Hensel, et al. (1998). "Tumor-specific apoptosis induced by the human monoclonal antibody SC-1: a new therapeutical approach for stomach cancer." Oncol Rep **5**(1): 35-40.
- Vollmers, H. P., R. O'Connor, et al. (1989). "SC-1, a functional human monoclonal antibody against autologous stomach carcinoma cells." Cancer Res **49**(9): 2471-2476.
- Vollmers, H. P., U. Zimmermann, et al. (1998). "Adjuvant therapy for gastric adenocarcinoma with the apoptosis-inducing human monoclonal antibody SC-1: first clinical and histopathological results." Oncol Rep **5**(3): 549-552.

- Willey, J., L. Sherwood, et al. (2008). Prescott, Harley, and Klein's microbiology, McGraw-Hill Higher Education.
- Wolf, K., I. Mazo, et al. (2003). "Compensation mechanism in tumor cell migration: mesenchymal-amoeboid transition after blocking of pericellular proteolysis." J Cell Biol **160**(2): 267-277.

## 6.2. Publikationen, Poster

1. Schatz N., Brändlein S., **Rückl K.**, Hensel F., Vollmers H. P.

„Diagnostic and therapeutic potential of a human antibody cloned from a cancer patient that binds to a tumor-specific variant of transcription factor TAF15”

Cancer Res; 70(1); 398-408; Jan 2010

2. Schatz N., Brändlein S., **Rückl K.**, Hensel F., Vollmers H. P.

“TAF 15, a new tumor-specific antigen defined by the natural human monoclonal IgG antibody PAT-BA4”

American Association for Cancer Research (AACR) 100th Annual Meeting; Denver; April 2009

3. Vollmers H. P., Schatz N., **Rückl K.**, Brändlein S., Hensel F.

“The natural IgG antibody PAT-BA4 binds to a tumor-specific form of TAF 15 and inhibits tumor-cell adhesion and movement“

American Association for Cancer Research (AACR) 101st Annual Meeting; Washington, D.C.; April 2010

## 7. Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung	Bedeutung
A	Absorption
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
ADP	Adenosindiphosphat
AFP	Alpha-1-Fetoprotein
AK	Antikörper
BCA	Bicinchoninsäure
BSA	bovine serum albumin (Rinderserumalbumin)
Ca <sup>2+</sup>	Calciumion
CD	cluster of differentiation (Differenzierungsantigen)
CDR	complementarity determining region
CEA	Carcinoembryonales Antigen
CFR	cysteine-rich receptor for fibroblast growth factors
c-SRC	cellular sarcoma protein
DAB	Diaminobenzidin
DAF	decay-accelerating factor (Faktor zum beschleunigten Verfall)
DAPI	4',6-Diamidino-2-phenylindol
DANN	Desoxyribonukleinsäure
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGF	epidermal growth factor
EGFR	epidermal growth factor receptor
ELISA	enzyme-linked immunosorbant assay
EWS	ewing sarcoma protein
FACS	fluorescence activated cell scanning (Durchflußzytometrie)

FAK	focal adhesion kinase
FCS	fetal calf serum (Fötales Kälberserum)
FET	FUS, EWL, TAF15
FGF	firboblast growth factor
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FPLC	fast protein liquid chromatography
FUS	fused in sarcoma protein
g	Erdbeschleunigung (ca. $9,81 \text{ N/s}^2$ )
GRP78	glucose-regulated-protein 78
h	Stunde
HAMA	human anti mouse antibodies (humane Anti-Maus Antikörper)
HAT	Hypoxanthin-Aminopterin-Thymidin
HER2/neu	human epidermal growth factor receptor 2, ErbB2
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Wasserstoffperoxid
ICD	international statistical classification of diseases and related health problems
Ig	Immunglobulin
J-Protein	joining-protein
kDa	Kilodalton
LASER	light amplification by stimulated emission of radiation
LDL	low density lipoprotein
Lsg.	Lösung
m	Masse
M	Molare Masse
m/v	Gewichtsprozent
mg	Milligramm
MHC	major histocompatibility complex

min	Minuten
ml	Milliliter
mm	Millimeter
MMP	Matrixmetalloproteasen
mRNA	messenger ribonukleinacid
NHL	Non-Hodgkin-Lymphom
NK	Natürliche Killer
PAMP	pathogen-associated molecular patterns
PARP	Poly-Adenosindiphosphat-ribosepolymerase
PBS	Phosphate Buffered Saline
pH	Potentia Hydrogenium
PSA	Prostata-spezifisches Antigen
RACK1	receptor of activated kinase 1
RKI	Robert-Koch-Institut
RNA	Ribonukleinsäure
RPM	rounds per minute
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
RT	Raumtemperatur
SEREX	serological analysis of autologous tumor antigens by recombinant cDNA expression cloning
SIC	spreading initiation centers
Src	sarcoma protein
TAF15	TATA box binding protein associated factor 15
TBS	Tris-Borat-Natriumchlorid
TCEP	Tris(2-chlorethyl)phosphat
TET	TLS, EWL, TAF15
TLR	toll like receptor

TLS	translocated liposarkoma protein
TNF	tumor nekrose factor
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
UV	Ultraviolett
V	Volumen
v/v	Volumenprozent
VEGF	vascular endothelial growth factor
VLDL	very low density lipoprotein
v-Src	viral sarcoma protein

## **Danksagung**

Die Anregung zu dieser Arbeit erfolgte durch Herrn Prof. Dr. Dr. Hans-Peter Vollmers, der dessen Fertigstellung leider nicht mehr miterleben konnte.

Mein besonderer Dank gilt hier Frau Dr. Stephanie Brändlein, die die Betreuung der Arbeit mit großem persönlichem Engagement fortführte.

Danken möchte ich auch im Besonderen Herrn Prof. Dr. Andreas Rosenwald für die Möglichkeit die Arbeit an seinem Lehrstuhl durchzuführen und ebenso für die Übernahme des Erstgutachtens. Herrn Prof. Dr. Frank Weidemann danke ich für die Übernahme des Zweitgutachtens.

Mein Dank gilt weiterhin den Mitarbeitern der ehemaligen Arbeitsgruppe Vollmers/Brändlein für ein angenehmes Arbeitsklima; Im Besonderen Frau Dr. Nicole Schatz und Herrn Dr. Leo Rasche für zahlreiche wissenschaftliche Diskussionen und Anregungen sowie Frau Miriam Eckstein für die fundierte Unterstützung im Experiment.

Einen großen Anteil am erfolgreichen Abschluss meiner Dissertation tragen meine Familie und meine Freunde, die mir stets bedingungslosen Rückhalt und Unterstützung gewährt haben.



## Lebenslauf

### Kilian Thomas Rückl

Geboren 11.02.1983 in München

### Bisheriger Werdegang

---

Seit 2011	Assistenzarzt in der Weiterbildung zum Facharzt für Unfallchirurgie und Orthopädie am Lehrkrankenhaus der Ludwigs-Maximilians-Universität München in Agatharied
2010	Staatsexamen und Approbation
2006	Erster Abschnitt der ärztlichen Prüfung
2004-2010	Studium der Humanmedizin an der Julius-Maximilians-Universität Würzburg
2003-2004	Studium der Physik an der Julius-Maximilians-Universität Würzburg
2002-2003	Zivildienst
2002	Allgemeine Hochschulreife

---

Kilian Rückl