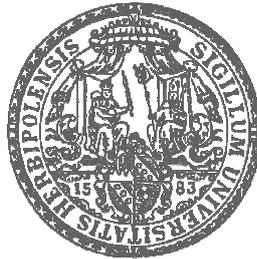


Identifizierung und Charakterisierung des SAM-6 Tumorantigens



DISSERTATION

zur Erlangung
des naturwissenschaftlichen Doktorgrades
der Julius-Maximilians-Universität Würzburg

vorgelegt von
Nicole Rauschert
aus Rothenburg ob der Tauber

Würzburg 2009

Eingereicht am:

bei der Fakultät für Chemie und Pharmazie

1. Gutachter:

2. Gutachter:

der Dissertation

1. Prüfer:

2. Prüfer:

3. Prüfer:

des Öffentlichen Promotionskolloquiums

Tag des Öffentlichen Promotionskolloquiums:

Doktorurkunde ausgehändigt am:

Die vorliegende Arbeit wurde auf Anregung und unter Anleitung von

Herrn Prof. Dr. H.P. Vollmers

am Pathologischen Institut
der Julius-Maximilians-Universität Würzburg angefertigt.

Meiner Familie

Teile der vorliegenden Dissertation wurden bereits an folgenden Stellen veröffentlicht:

Originalpublikationen:

Rauschert N, Brändlein S, Holzinger E, Hensel F, Müller-Hermelink HK und Vollmers HP. A new tumor-specific variant of GRP78 as target for antibody-based therapy. *Lab Invest* 2008; 88: 375-86.

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

Posterbeiträge:

Rauschert N, Brändlein S, Holzinger E, Hensel F und Vollmers HP. The human lipotoxic antibody SAM-6 targets a new variant of the heat shock protein GRP78. AACR-NCI-EORTC International Conference, Molecular Targets and Cancer Therapeutics, San Francisco, CA, USA, 22.–26. Oktober 2007.

Rauschert N, Brändlein S, Holzinger E, Hensel F und Vollmers HP. The human lipotoxic antibody SAM-6 targets a new variant of the heat shock protein GRP78. 100th AACR Meeting 2007, Los Angeles, CA, USA, 14.–18. April 2007.

Vollmers HP, Dreykluft A, Rauschert N, Rasche L und Brändlein S. The “intrinsic” pathway of antibody SAM-6 induced lipoptosis. 9th International Symposium of Molecular Medicine, Hersonissos, Kreta, Griechenland, 12.–14. Oktober 2006.

Vollmers HP, Dreykluft A, Rauschert N, Rasche L, Müller K, Wozniak E, Hensel F und Brändlein S. The “intrinsic” pathway of antibody SAM-6 induced lipoptosis. 99th AACR Meeting 2006, Washington, DC, USA, 1–5 April 2006.

Vollmers HP, Rauschert N, Wozniak E, Pawlas L, Müller-Hermelink HK, Hensel F und Brändlein S. Lipoptosis, *in vitro* and *in vivo* cell death by antibody SAM-6 induced lipid accumulation. 98th AACR Meeting 2005, Anaheim, CA, USA, 16.–20. April 2005.

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen Personen recht herzlich bedanken, die mich direkt oder indirekt bei der Entwicklung und Durchführung dieser Arbeit unterstützt haben.

In erster Linie möchte ich ganz besonders Herrn Prof. Dr. H.P. Vollmers für die freundliche Aufnahme in seine Arbeitsgruppe und die Überlassung des sehr interessanten und aktuellen Themas danken. Besonders danke ich ihm für die stete Unterstützung, die stets geduldige Betreuung während der Arbeit und das mir dabei entgegengebrachte Vertrauen sowie für die guten Arbeitsbedingungen und den Freiraum, den er mir bei der Umsetzung der Aufgabenstellung einräumte.

Herrn Prof. Dr. Utz Fischer, Theodor-Boveri-Institut für Biowissenschaften, Lehrstuhl für Biochemie, danke ich sehr für die Bereitschaft, die Arbeit vor dem Fachbereich Chemie und Pharmazie zu vertreten und die freundliche Übernahme des zweiten Gutachtens.

Herrn Prof. Dr. H.K. Müller-Hermelink, Institutsvorstand des Pathologischen Instituts, danke ich für die Möglichkeit an seinem Institut zu promovieren und die Bereitstellung des Arbeitsplatzes. Mein Dank geht ebenso an die Firma Patrys GmbH, Würzburg, für die finanzielle Unterstützung.

Besonderer Dank gilt Frau Dr. Stephanie Brändlein, die mich exzellent in die zellbiologischen und laborchemischen Arbeitsmethoden einwies. Sie war jederzeit für wissenschaftliche Diskussionen offen und stand in nahezu unbegrenzter Hilfsbereitschaft zur Verfügung. Ich möchte ihr nicht nur für die Tipps und Anregungen danken, sondern auch für ihre Freundschaft und Unterstützung, sei es fachlicher oder privater Natur. Wenn ich nicht mehr weiter wusste, war sie zur Stelle und hat mich ermutigt.

Bei Herrn Prof. Dr. Ernst Conzelmann, Theodor-Boveri-Institut für Biowissenschaften, Lehrstuhl für physiologische Chemie II, und seinen Mitarbeitern Herrn Dr. Werner Schmitz und Frau Nadine Schoberth bedanke ich mich für die freundliche und kompetente Durchführung dünnschichtchromatographischer und massenspektroskopischer Analysen. Danke Werner für deine Zeit, für die hilfreichen Ideen und dein stetig offenes Ohr für die Sorgen des Laboralltags.

Ein Dankeschön geht an alle Mitarbeiter des Pathologischen Instituts, die mich herzlich integrierten, mich tatkräftig im Laboralltag unterstützten und so zum Gelingen der Arbeit beitrugen. Besonders möchte ich mich bei meiner Arbeitsgruppe für die sehr freundschaftliche Arbeitsatmosphäre und die gute Zusammenarbeit bedanken: Kerstin Müller und Miriam Eckstein für die vorbildliche technische Assistenz, sei es bei der Zellkultur, bei der Vorbereitung und Durchführung immunhistologischer Färbungen oder sonstigen kleinen und großen Dingen des Laboralltags. Vielen Dank an Tina Grieb, für die tatkräftige Hilfestellung und die Tipps bei

der Durchführung der molekularbiologischen Methoden. Danke an Leo Rasche für anregende Diskussionen und die neuen Ideen, die erfolgreich zusammen umgesetzt werden konnten. Danke an Marc Röse, der durch seine angenehme Art lange Labortage und –nächte verkürzte. Danke an Elisabeth Holzinger, die die Süßigkeiten im „Schubber“ nie ausgehen lies, an Jeanine Hess, die ihr Blut für mich gab, an Karina Leppin, Sabine Eisenbrandt und Angela Dreykluft für das freundschaftliche Verhältnis auch außerhalb des Labors. Danke an Ewa Wozniak, Tina Grieb und Jacqueline Maar für die gute Laune, für den Platz am Mittagstisch, die interessanten Mittagspausen und die amüsanten Cocktailabende. Danke für die schöne Zeit und eure Freundschaft.

Bedanken möchte ich mich außerdem bei der Arbeitsgruppe Rosenwald, insbesondere bei Dr. Christoph Burek und Dr. Elena Hartmann, für ihre Aufmunterungen und Unterstützung bei übergreifenden Fragestellungen. Bei den Mitarbeitern der Arbeitsgruppe Serfling für deren Hilfsbereitschaft und wissenschaftlichen Rat, insbesondere bei Dr. Sergej Chuvpilo und Dr. Avotis Andris. Mein Dank gilt Dr. Bernhard Schmauß für seine hilfreichen wissenschaftlichen Ratschläge und seinem unermüdlichen Humor, Sabine Roth und Andrea Homburger für die Einweisung und die immer freundliche Unterstützung am FACScan und bei den Aufnahmen am konfokalen Fluoreszenzmikroskop. Nicht zuletzt Gerhard Walter, dem Mann für alle Fälle und allen Mitarbeitern des Instituts die mich durch die angenehme Atmosphäre und die Kollegialität während der Anfertigung dieser Arbeit unterstützten.

Mein Dank geht vor allem an alle Freunde, die an mich geglaubt und mich während dieser Promotion nicht im Stich gelassen haben. Danke an Dr. Anagnostis Valotis, Roswitha Skrabala und Dr. Matthias Freiwald für die gemeinsamen Abende mit endlosen Diskussionen fachlicher und privater Natur. Herzlichen Dank an Dr. Daniela Ulmer und Dr. Andreas Heinze für ihre Freundschaft und Hilfsbereitschaft.

Bei Dr. Stephanie Brändlein und bei Dr. Matthias Freiwald bedanke ich mich außerdem für die aufmerksame Durchsicht des Manuskripts und die wertvollen Tipps bezüglich der Formatierung und Gestaltung der Dissertation.

Ganz besonderen Dank verdienen schließlich meine Eltern, Renate und Walter Rauschert, meine Schwester Carolin und meine Oma Martha. Danke, dass ihr mich in allen Lebenslagen unterstützt und mir jederzeit mit Rat und Tat beiseite steht.

Zu guter Letzt möchte ich mich insbesondere bei Matthias recht herzlich für seine Geduld und sein Verständnis während der Entstehung dieser Arbeit bedanken. Danke, für die Kraft und deine kompromisslose Unterstützung.

*„Der Zweifel ist der
Beginn der Wissenschaft“.*

(Teilhard de Chardin, 1881-1955)

Inhaltsverzeichnis

I.	Einleitung	17
1	Die zielgerichtete Tumorthherapie	20
2	Monoklonale Antikörper in der onkologischen Therapie	21
2.1	Murine monoklonale Antikörper	24
2.2	Humanisierte monoklonale Antikörper	25
2.3	Humane monoklonale Antikörper	29
3	Hybridoma-Technik (Triomatechnologie)	31
4	Das Immunsystem des Menschen	33
5	Innate Immunität	33
5.1	Natürliche Antikörper	36
5.1.1	Antikörper SC-1	38
5.1.2	Antikörper PAM-1	39
5.1.3	Antikörper SAM-6	40
6	Ziel der Arbeit	41
II.	Material und Methoden	43
1	Materialien	45
1.1	Verbrauchsmaterialien	45
1.2	Eukaryotische Zelllinien	49
1.3	Geräte	49
1.4	Medien, Puffer und sonstige Lösungen	51
1.5	Patientenmaterial	59
1.6	Hard- und Software	59
2	Methoden	61
2.1	Zellkultur	61
2.1.1	Kultivierung der Karzinomzelllinien	61
2.1.2	Kultivierung der nasalen Epithelzelllinie	61
2.1.3	Kultivierung von Hybridomzellen	61
2.1.4	Kryokonservierung eukaryotischer Zellen	62
2.1.5	Auftauen eukaryotischer Zellen	62
2.1.6	Zellzahlbestimmung	62

2.2	Zellbiologische Methoden	63
2.2.1	Transfektion von Tumorzellen mit siRNA	63
2.2.2	MTT-Proliferationstest.....	65
2.2.3	Apoptose-Test (Cell Death Detection ELISA ^{PLUS})	66
2.2.4	Cytochrom C-ELISA.....	67
2.2.5	Test auf Caspasen-Aktivierung	68
2.2.6	Färbung mit Sudanrot	69
2.2.7	<i>Ectodomain Shedding</i> transmembranärer Proteine	69
2.3	Proteinbiochemische Methoden.....	71
2.3.1	Präparation von Membranproteinen aus Tumorzellen	71
2.3.1.1	Fraktionierte Zentrifugation (Differentialzentrifugation).....	71
2.3.1.2	ProteoExtract TM Native Membrane Protein Extraction Kit.....	71
2.3.2	Bestimmung der Proteinkonzentration mittels Bicinchoninsäure (BCA)	72
2.3.3	Präzipitation von Proteinen für die Gelelektrophorese	73
2.3.4	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE).....	73
2.3.5	Färben von Polyacrylamidgelen	74
2.3.5.1	Coomassie-Färbung	74
2.3.5.2	Silberfärbung	74
2.3.6	Western Blot-Analyse.....	75
2.3.7	Dot Blot-Analyse	75
2.3.8	Immundetektion immobilisierter Proteine.....	76
2.3.9	Reinigung von Proteinen.....	77
2.3.9.1	Aufreinigung des SAM-6 Antigens	77
2.3.9.2	Reinigung des SAM-6 Antikörpers aus Kulturüberständen	79
2.3.10	Massenspektrometrische Analyse von Proteinen	80
2.3.11	Enzymatischer Verdau von Membranextrakten	80
2.3.12	Enzymatischer Verdau von LDL	81
2.3.13	Isoelektrische Fokussierung des SAM-6 Antikörpers.....	81
2.4	Molekularbiologische Methoden.....	82
2.4.1	Isolierung von Gesamt-RNA.....	82
2.4.1.1	RNA-Isolierung aus Magenwebe	82
2.4.1.2	RNA-Isolierung aus Tumorzellen	83
2.4.2	Konzentrations- und Reinheitsbestimmung von Nukleinsäurelösungen.....	83
2.4.3	Reverse Transkription von mRNA in cDNA	84
2.4.4	Polymerasekettenreaktion.....	84
2.4.5	Semiquantitative PCR mit GAPDH.....	85

2.4.6	Agarosegelelektrophorese	86
2.4.7	DNA-Sequenzierung	86
2.5	Immunfluoreszenz	87
2.5.1	FACS-Analyse	87
2.5.1.1	Nachweis der Antigenexpression auf der Zelloberfläche durch indirekte Immunfluoreszenz	89
2.5.1.2	Nachweis hypodiploider DNA durch direkte Immunfluoreszenz nach Propidiumiodid-Färbung	90
2.5.2	Fluoreszenzmikroskopie	91
2.5.2.1	Fluoreszenzmikroskopische Bestimmung der Zellviabilität	92
2.5.2.2	Endozytose fluoreszenzmarkierter Antikörper	93
2.6	Immunhistochemische Methoden	94
2.6.1	Herstellung von Zytospinpräparaten	94
2.6.2	Herstellung von Paraffinschnitten	94
2.6.3	Immunperoxidase-Färbung	95
2.6.3.1	Immunperoxidase-Färbung von Zytospinpräparaten	95
2.6.3.2	Immunperoxidase-Färbung von Paraffinschnitten	97
2.6.4	Enzymatischer Verdau von Oberflächenproteinen vitaler Zellen	99
III.	Ergebnisse	101
1	Charakterisierung des SAM-6 Antikörpers	103
1.1	Der SAM-6 Antikörper	103
1.2	Funktionelle Analyse des SAM-6 Antikörpers	104
1.2.1	Induktion tumorspezifischer Apoptose	104
1.2.1.1	Bestimmung der Zellviabilität (Vybrant® Apoptosis Assay Kit #13)	105
1.2.1.2	Nachweis hypodiploider DNA	106
1.2.2	Induktion tumorspezifischer, zelltoxischer Lipideinlagerungen	108
1.2.3	Endozytose	111
1.2.4	Signalweg der SAM-6-induzierten Apoptose	112
1.2.4.1	Aktivierung Cytochrom C-abhängiger, mitochondrialer apoptotischer Ereignisse	113
1.2.4.2	Aktivierung caspasenabhängiger Apoptosewege	114
2	Expression des SAM-6 Antigens	117
2.1	Tumorspezifität	117
2.1.1	Immunhistochemische Färbung auf Tumor- und Normalgewebe	117
2.1.2	FACS-Analyse auf Tumorepithel- und normalen Epithelzellen	120

3	Isolierung und Identifizierung des SAM-6 Antigens.....	121
3.1	Western Blot-Analyse auf Tumorzellmembranextrakten.....	121
3.2	Optimierung der Membranpeparation	121
3.3	Chromatographische Aufreinigung des SAM-6 Antigens aus Tumormembranextrakten.....	124
3.3.1	Gelfiltrationschromatographie.....	125
3.3.2	Anionenaustauschchromatographie	126
3.4	Sequenzierung und Identifizierung des SAM-6 Tumorantigens.....	127
4	Untersuchungen zur Verifizierung des SAM-6 Zielproteins.....	130
4.1	Effekt des Protein- <i>Knock-Down</i> von GRP78 auf die Bindung des SAM-6 Antikörpers ...	130
4.1.1	FACS-Analyse	130
4.1.2	Western Blot-Analyse.....	133
4.2	Effekt des Protein- <i>Knock-Down</i> von GRP78 auf die SAM-6-induzierte Apoptose	134
4.2.1	MTT-Proliferationstest.....	134
4.2.2	Apoptose-Test (Cell Death Detection ELISA ^{PLUS})	136
5	GRP78^{SAM-6}.....	138
5.1	Überexpression von GRP78 in Tumorgewebe	138
5.2	Tumorspezifische Modifikation von GRP78.....	140
5.2.1	Co-Expression von GRP78 ^{SAM-6}	140
5.2.2	Carbohydrat-Epitop auf GRP78 ^{SAM-6}	141
5.3	Funktioneller Vergleich des SAM-6 Antigens mit dem GRP78-Wildtypen	144
5.3.1	Induktion der Apoptose	144
5.3.2	Induktion zelltoxischer Lipideinlagerungen	145
5.3.3	<i>Ectodomain Shedding</i> von GRP78 ^{SAM-6} und GRP78.....	146
5.3.3.1	Abspaltung von GRP78 ^{SAM-6} von der Zelloberfläche	146
5.3.3.2	Freisetzung von GRP78 ^{SAM-6} in den Extrazellularraum.....	148
6	Das (potentielle) SAM-6 Target	150
IV.	Diskussion	153
1	Der SAM-6 Antikörper – Bedeutung und Funktion.....	155
2	Natürliche Immunität des Menschen.....	157
2.1	Zelluläre und humorale Komponenten des angeborenen Immunsystems	157
2.2	Rezeptoren des angeborenen Immunsystems.....	158
3	Immunogenität von Tumoren.....	159

3.1	Kontrolle der Tumorentstehung durch natürliche IgM-Antikörper.....	159
3.1.1	Keimbahnkodierung.....	160
3.1.2	Affinität und Reaktivität.....	161
3.1.3	Penetration an den Wirkort.....	161
3.1.4	Erkennung von Carbohydrat-Epitopen.....	161
3.2	Immunogenität von Carbohydrat-Antigenen.....	162
3.3	Die tumorspezifische Zelloberfläche als Zielstruktur natürlicher IgM-Antikörper.....	163
3.3.1	Frei zirkulierende Carbohydrat-Antigene.....	165
3.3.2	Kovalent gebundene Carbohydrat-Antigene.....	166
3.3.3	Carbohydrat-Antigene auf Schutzmolekülen und Wachstumsfaktoren.....	167
4	GRP78 - Bedeutung und Funktion des Hitzeschockproteins.....	169
4.1	Struktur und Funktionsweise des intrazellulären GRP78.....	169
4.2	Physiologische Rolle des intrazellulären GRP78.....	171
4.3	Translokation von GRP78 an die Zelloberfläche.....	172
4.4	Physiologische Rolle des extrazellulären GRP78.....	174
4.5	Rolle des GRP78 bei der Tumorentstehung.....	174
4.6	Rolle des GRP78 in der Tumorthherapie.....	175
4.7	Protektive Eigenschaften der GRP78-Überexpression.....	177
4.8	Existenz löslicher GRP78-Varianten.....	179
5	Kreuzreaktivität des SAM-6 Antikörpers mit oxLDL.....	183
6	Der apoptotische SAM-6-Signalweg.....	185
6.1	Pro-apoptotische Funktion des oxLDL.....	185
6.2	Interaktion von GRP78 mit Lipoproteinen.....	186
6.3	Inaktivierung der anti-apoptotischen Funktion von GRP78.....	187
7	Resumé.....	189
V.	Zusammenfassung.....	193
1	Zusammenfassung.....	195
2	Summary.....	197
VI.	Abkürzungsverzeichnis.....	199
VII.	Literaturverzeichnis.....	203

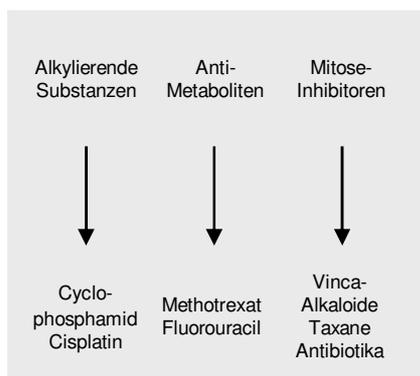
I. Einleitung

Weltweit leben 22 Millionen Menschen mit Krebserkrankungen. Jedes Jahr wird bei mehr als 10 Millionen Menschen Krebs neu diagnostiziert, mehr als 6 Millionen sterben infolge ihrer Erkrankung [1]. Allein in Deutschland wird die Zahl der jährlich auftretenden Neuerkrankungen auf über 424.000 geschätzt, darunter 206.000 Frauen und über 218.000 Männer [2]. Nach Angaben des Statistischen Bundesamtes in Wiesbaden beläuft sich die Zahl der jährlichen Krebssterbefälle in Deutschland derzeit auf über 211.000 und entspricht dabei einem Anteil von 25 % aller Todesfälle [3]. Krebserkrankungen stellen damit neben den Herz-Kreislauf-Erkrankungen die zweithäufigste Todesursache dar [3].

Angesichts der hohen Letalität bei malignen Tumoren wurden in den letzten Jahrzehnten große Anstrengungen unternommen, um die Prognose der Patienten zu verbessern. Daher sind viele Krebserkrankungen heute längst kein Todesurteil mehr. Je nach Tumorart und –stadium sind Heilungsraten bei Erwachsenen von durchschnittlich 50 % keine Seltenheit mehr und liegen bei bestimmten Tumorarten sogar bei 80 % und mehr [4]. Diese Erfolge sind in erster Linie auf verbesserte Früherkennungsmethoden, die systematische Fortentwicklung der Chemo- und Strahlentherapie sowie optimierte chirurgische Operationstechniken zurückzuführen. Ebenso führten signifikante Fortschritte der Krebsforschung, die sich in den letzten Jahren auf die Entwicklung und Einführung neuer, zielgerichteter Therapien zentrierten, zu verbesserten Therapiemöglichkeiten der Krebspatienten (Abbildung 1).

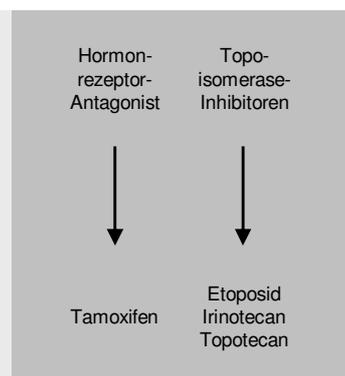
1. Generation

Chemotherapie:
DNA-Synthese und Zellzyklus



2. Generation

Hormon-abhängiges
Wachstum, Transkription,
DNA-Reparatur



3. Generation

Zielgerichtete Tumorthherapie:
Tumorspezifische Antigene,
Signaltransduktion,
Angiogenese

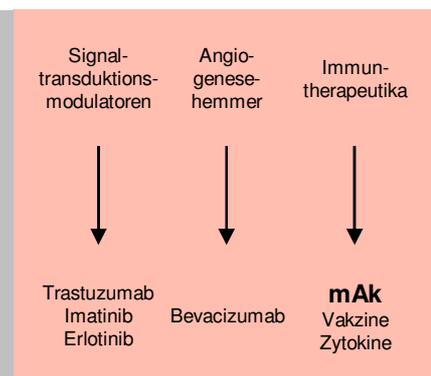


Abbildung 1: Weiterentwicklung von Wirkstoffen zur Behandlung von Tumoren. Die Behandlungsmöglichkeiten von Tumorpatienten haben sich über Generationen von Wirkstoffen kontinuierlich verbessert. Neue Erkenntnisse in der Molekular- und Zellbiologie führten zur Entwicklung zielgerichteter Therapien (*Targeted Therapies*), die heute Bestandteil der Behandlung maligner Erkrankungen sind [5].

Dennoch reichen die konventionellen Behandlungsmethoden aufgrund des heterogenen Erscheinungsbildes der Tumorzellen oft nicht aus und eine Vielzahl der Krebspatienten kann nach wie vor nicht geheilt werden. Das ultimative Ziel ist es, Krebserkrankungen zu heilen oder - noch notwendiger - bestehende und ungezielte Chemotherapien durch weniger toxische, gezielte Agentien zu ersetzen. Für die meisten Krebsarten konnte dies bisher noch nicht erreicht werden [6].

1 Die zielgerichtete Tumorthherapie

Auf der Basis neuer Erkenntnisse in der Molekular- und Zellbiologie wurden innovative zielgerichtete Therapien (*Targeted Therapies*) entwickelt, deren klinische Einführung einen wesentlichen Fortschritt in der Behandlung maligner Erkrankungen darstellt. Substanzen gegen spezifische Zielmoleküle (*Targets*) modulieren zelluläre Prozesse, die an der Tumorentstehung beteiligt sind. Sie greifen gezielt in gestörte Regulationsmechanismen maligner Zellen ein, wodurch eine verbesserte Wirksamkeit und gleichzeitig eine verminderte Toxizität ermöglicht werden kann. Zielgerichtete Therapieformen ergänzen die klassischen Ansätze der konventionellen Behandlung von Tumorerkrankungen in Form von Chemotherapie, Strahlentherapie und Chirurgie und gewinnen derzeit als zusätzliche oder aber alternative und nebenwirkungsärmere Möglichkeit der therapeutischen Intervention zunehmend an Bedeutung. Inzwischen sind mehrere zielspezifische Substanzen zugelassen, die zu nennenswerten Ergebnissen in der klinischen Anwendung führten [6-9].

Im Rahmen der primären Prävention onkologischer Erkrankungen wurde im Jahr 2006 mit Gardasil® ein erster, zielbezogener Impfstoff zugelassen. Gardasil®, ein nicht infektiöser Impfstoff aus rekombinanten virusähnlichen Partikeln des Hauptkapsidproteins L1 humaner Papillomaviren (HPV), bietet durch aktive Immunisierung prophylaktischen Schutz gegen onkogene Papillomaviren [10]. Sie sind hauptsächlich für die Entstehung von Zervix- und Vaginalkarzinomen bzw. deren präkanzerogenen Vorstufen verantwortlich, die zweithäufigste Krebserkrankung bei Frauen [11]. Trotz enormer Fortschritte befindet sich die aktive Immuntherapie auf weiteren Indikationsgebieten der Onkologie nach wie vor auf einer experimentellen Stufe [12-16]. Hingegen konnten besonders durch passive immuntherapeutische Verfahren nennenswerte Erfolge in der Onkologie erzielt werden [6, 15]. Hier ist insbesondere die Substanzklasse der monoklonalen Antikörper hervorzuheben. Durch deren therapeutischen Einsatz profitieren behandelte Patienten von einer erhöhten Lebenserwartung und einer verbesserten Lebensqualität, wie in kontrollierten randomisierten

Studien belegt werden konnte [6, 8]. So wurden z.B. Patienten, die an einem kolorektalen Karzinom erkrankten, mit Bevacizumab (Avastin[®]), einem monoklonalen Antikörper gegen VEGF (*Vascular Endothelial Growth Factor*), behandelt. In Kombination mit einer Chemotherapie profitierten die Patienten gegenüber mit alleiniger Chemotherapie behandelter Patienten mit einem Überlebensvorteil [17]. Auch Cetuximab (Erbix[®]), ein Antikörper gegen den EGF-Rezeptor (*Epidermal Growth Factor*), stellte sich im gleichen Indikationsgebiet in Kombination mit der Chemotherapie als vorteilhaft heraus. In Kombination mit Bestrahlungen wird der Antikörper außerdem zur Behandlung von Tumoren im Kopf- und Halsbereich erfolgreich eingesetzt [6]. Als weiteres Beispiel ist Trastuzumab (Herceptin[®]), ein Antikörper gegen das Onkogenprodukt HER2/neu, zu nennen. Er hat als erster Antikörper Eingang in die adjuvante (postoperative) Therapie gefunden. Das Rückfallrisiko bei Patienten mit HER2-positivem Mammakarzinom konnte durch die Gabe von Trastuzumab signifikant reduziert werden [18, 19]. Die monoklonalen Antikörper haben sich nach langer Zeit der Skepsis sowohl in wissenschaftlichen, wirtschaftlichen und vor allem therapeutischen Ansätzen zu einer festen Größe etabliert [9, 20-24].

2 Monoklonale Antikörper in der onkologischen Therapie

Antikörper gehören zu den wirksamsten Waffen des Immunsystems. Vor ungefähr 100 Jahren postulierte der deutsche Mediziner und Bakteriologe Paul Ehrlich die *Side-Chain Theory*, das erste immunologische Model zur Abwehr invasiver Partikel und maligner Zellen [25, 26]. Die Quintessenz seiner Theorie war, dass Zellen des Immunsystems die genetisch determinierten Eigenschaften besitzen, körperfremde Substanzen und Zellen zu erkennen und zu zerstören. Die für die Bindung zuständigen Rezeptoren, die nach seiner Theorie auch sezerniert werden konnten, nannte er Seitenketten (*Side Chains*). Paul Ehrlich beschrieb mit seiner Theorie zum ersten Mal die Existenz und Funktion von Antikörpern. Ungefähr 70 Jahre nach Entdeckung der Antikörper gelang es Cesar Milstein und Georges Köhler, antikörperproduzierende B-Zellen der Maus zu immortalisieren und damit Immunglobuline in monoklonaler Form und unbegrenzter Menge zu produzieren [27, 28]. Dreißig Jahre später hat die Anwendung monoklonaler Antikörper in der Onkologie einen wichtigen Stellenwert erreicht. Monoklonale Antikörper stellen heute die am schnellsten expandierende Substanzklasse humaner Therapeutika dar. Wie viel Hoffnung in die Therapie mit monoklonalen Antikörpern gesetzt wird, zeigt sich in der Fülle aktueller Untersuchungen. Mittlerweile befinden sich mehr als 150 Antikörper in klinischen

Erprobungsphasen der unterschiedlichsten Indikationsgebiete. Bereits zugelassene therapeutische Antikörper bewähren sich bei der Behandlung von Abstoßungsreaktionen gegen Transplantate, rheumatoider Arthritis und Morbus Crohn (z.B. Infliximab, Remicade®), der koronaren Revaskularisation (Aciximab, ReoPro®) oder zur antiviralen Prophylaxe (Pavilizumab, Synagis®) [9].

Eine Auswahl an therapeutischen Antikörpern, die derzeit auf den Indikationsgebieten der Onkologie zugelassen sind oder sich in der klinischen Prüfung befinden, ist in Tabelle 1 dargestellt. Sie gehören hauptsächlich der Immunglobulin-Klasse G an, einige kommen als Radio- oder Toxin-Immunkonjugate (z.B. DNA-Synthese-Hemmer wie Calicheamicin) zum Einsatz.

Tabelle 1: Zugelassene und sich in klinischer Prüfung befindliche therapeutische monoklonale Antikörper

Antikörper	Typ	Zielstruktur	Indikationsgebiete
Murine Antikörper			
Ibritumomab-Tiuxetan (Zevalin®)	Murin IgG1 ⁹⁰ Y-markiert	CD20-Antigen auf B-Lymphozyten	Non-Hodgkin-Lymphome (Radioimmuntherapie)
Oregovomab (OvaRex®)*, **	Murin IgG1	CA125	Ovarialkarzinom
Tositumomab (Bexxar®)**	Murin IgG2a ¹³¹ I-markiert	CD20-Antigen auf B-Lymphozyten	Non-Hodgkin-Lymphome (Radioimmuntherapie)
Chimäre Antikörper			
Cetuximab (Erbix®)	Chimär IgG1	EGF-Rezeptor (<i>Epidermal Growth Factor-Receptor</i>)	Kolorektales Karzinom, Kopf- und Halstumore
Rituximab (MabThera®, Rituxan®)	Chimär IgG1	CD20-Antigen auf B-Lymphozyten	Non-Hodgkin-Lymphome
Humanisierte Antikörper			
Alemtuzumab (MabCampath®)	Humanisiert IgG1	CD52-Antigen auf Lymphozyten	Chronische lymphatische Leukämie, T-Zell-Lymphome*, akute lymphatische Leukämie*
Apolizumab (Remitogen®)*, **	Humanisiert IgG1	HLA-DR-Antigen auf B-Lymphozyten	Solide Tumoren, akute und chronische lymphatische Leukämie, Non-Hodgkin-Lymphome
Bevacizumab (Avastin®)	Humanisiert IgG1	VEGF (<i>Vascular Endothelial Growth Factor</i>)	Kolorektales Karzinom, Mammakarzinom, nichtkleinzelliges Bronchialkarzinom*

Tabelle 1: Zugelassene und sich in klinischer Prüfung befindliche therapeutische monoklonale Antikörper

Humanisierte Antikörper			
Eculizumab (Soliris®)	Humanisiert IgG2/4	C5 Komplement-Faktor	Paroxysmale nächtliche Hämoglobinurie (PNH)
Epratuzumab (LymphoCide®)*, **	Humanisiert IgG1	CD22-Antigen auf B-Lymphzyten	Non-Hodgkin-Lymphome, akute lymphatische Leukämie, Autoimmunerkrankungen
Gemtuzumab (Mylotarg®)**	Humanisiert IgG4 Calicheamicin-konjugiert	CD33-Antigen	Akute myeloische Leukämie
Pertuzumab (Omnitarg®)*	Humanisiert IgG1	Heterodimer; EGF und HER2/neu-Rezeptor	Ovarial-, Mamma-, Bronchial- und Prostatakarzinom
Trastuzumab (Herceptin®)	Humanisiert IgG1	HER2/neu-Rezeptor ErbB2	Metastasierendes Mammakarzinom mit ErbB2-Überexpression
Humane Antikörper			
Panitumumab (Vectibix®)**	Human IgG2k	EGF-Rezeptor	EGF-Rezeptor exprimierende Tumoren, insb. metastasierendes kolorektales Karzinom

*In klinischer Prüfung

**In Deutschland bisher keine Zulassung (Stand 8/2007)

Durch den Einsatz monoklonaler Antikörper in der Onkologie haben sich die Erfolgsaussichten für die betroffenen Patienten entscheidend verbessert. Monoklonale Antikörper können die Angiogenese und die Proliferation der Tumorzellen durch verschiedene Mechanismen inhibieren (z.B. Bevacizumab, Cetuximab, Trastuzumab), direkt Apoptose induzieren (z.B. Cetuximab, Rituximab) oder indirekt über sekundäre immunologische Funktionen die Abwehrzellen und das Komplementsystem des Immunsystems aktivieren (z.B. Alemtuzumab, Cetuximab, Rituximab, Trastuzumab). Des Weiteren können sie das Ansprechen einer Therapie verbessern oder Zellen für die Chemo- und Radiotherapie sensibilisieren (z.B. Cetuximab, Rituximab, Trastuzumab) [9, 20, 29, 30], durch ihre Anti-Tumor-Effekte insbesondere die Lebenszeit verlängern und in seltenen Fällen die Tumorerkrankung sogar heilen [31].

2.1 Murine monoklonale Antikörper

Die ersten in der Therapie von Tumoren erfolgreich eingesetzten monoklonalen Antikörper wurden durch Xenoimmunisierung von Mäusen mit humanen Tumorzellen gewonnen (murine Antikörper; Endung: -omab). Die murinen Antikörper sind jedoch nur begrenzt therapeutisch einsetzbar, da ein immunkompetenter Organismus Antikörper gegen die Fremdproteine bildet (sog. HAMA, *Human Anti Mouse Antibodies*). Dies kann zur Neutralisation und Elimination der Antikörper führen und bei einer wiederholten Applikation gravierende anaphylaktische Reaktionen zur Folge haben [32, 33]. Neben der hohen Immunogenität der murinen Fremdproteine interagieren die Maus-Antikörper nur schwach mit humanem Komplement und Fc-Rezeptoren immunkompetenter Zellen. Dadurch fehlende Effektor-Funktionen wie die antikörperabhängige zellvermittelte Zytotoxizität (ADCC, *Antibody-Dependent Cell Mediated Cytotoxicity*), die komplementabhängige Zytotoxizität (CDC, *Complement-Dependent Cytotoxicity*) und die antikörperabhängige zelluläre Phagozytose (ADCP, *Antibody-Dependent Cell Mediated Phagocytosis*) führen zur ineffizienten Beseitigung der Zielzelle. Zusätzlich weisen murine IgG-Antikörper im humanen Blutkreislauf eine geringe Halbwertszeit auf, da sie eine geringe Affinität zum neonatalen Fc-Rezeptor (FcRn) aufweisen. Der MHC Klasse I-verwandte Rezeptor wird nicht nur in der Plazenta exprimiert, wo er für den Transfer von Immunglobulinen von der Mutter zum ungeborenen Kind sorgt, sondern ist ubiquitär zu finden. Aufgrund seiner Expression auf Endothelzellen soll er direkt bei der Zirkulation und Homöostase von Serumantikörpern involviert sein. Er verhindert den frühzeitigen Abbau von gebundenen Antikörpern und beeinflusst somit direkt das pharmakokinetische Verhalten der Antikörper [30, 34, 35].

Murine monoklonale Antikörper werden vor allem als Radio-Immunkonjugate erfolgreich bei der Therapie des Non-Hodgkin-Lymphoms eingesetzt (siehe Tabelle 1). Große Erfolge versprach der murine monoklonale IgG2-Antikörper Edrocolomab (Panorex[®]), der jedoch seit August 2000 in Deutschland nicht mehr vertrieben wird. Er kam gegen kolorektale Karzinome zum Einsatz und schien zunächst das für die Tumorart hohe Rückfallrisiko zu vermindern und die mittlere Überlebenszeit betroffener Patienten zu verlängern [36]. In nachfolgenden Studien zeigte sich der Antikörper allerdings sowohl in der Mono- als auch in der Kombinationstherapie im Vergleich zur Standardtherapie (5-Fluorouracil/Leukovorin) in seiner Wirksamkeit als unterlegen [37].

2.2 Humanisierte monoklonale Antikörper

Mit Hilfe gentechnischer Methoden können große Teile des murinen Antikörpermoleküls gegen humane Aminosäuresequenzen ausgetauscht werden, sodass lediglich die Antigenbindungsstellen (CDR; *Complementarity Determining Region*) murinen Ursprungs bleiben (siehe Abbildung 2) [9, 20, 38-40].

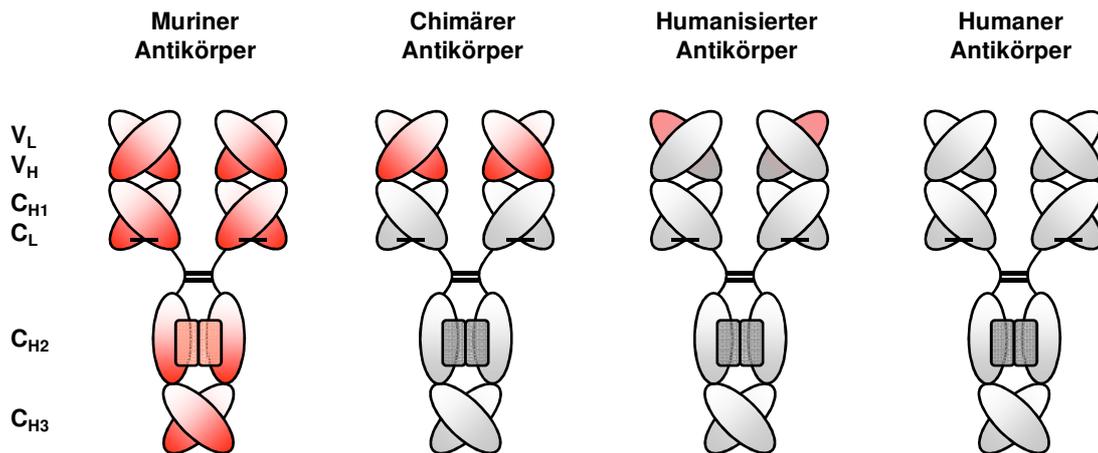


Abbildung 2: Modifizierter Antikörper für die therapeutische Anwendung. Schematische Darstellung muriner (rot) und humaner Anteile (grau) eines Immunglobulins (modifiziert nach [9]). (C_H – konstanter Bereich der schweren Kette, C_L – konstanter Bereich der leichten Kette, V_H – variabler Bereich der schweren Kette, V_L – variabler Bereich der leichten Kette)

Durch die Chimärisierung (75 % Humananteil; Endung: -ximab) und Humanisierung (90 % Humananteil; Endung: -zumab) muriner Antikörper können Mensch-Maus-Hybride synthetisiert werden (z.B. Rituximab, Trastuzumab), die verglichen mit den reinen Mausantikörpern eine verringerte Immunogenität [41, 42] und damit verlängerte Halbwertszeiten aufweisen [35, 43]. In Tabelle 2 sind humanisierte Antikörper dargestellt, die sich derzeit in der präklinischen oder in der klinischen Phase der Entwicklung befinden.

Tabelle 2: Humanisierte therapeutische monoklonale Antikörper in präklinischer Phase und in Phase I/II-Studien

Präparat	Typ	Zielstruktur	Anwendungsgebiete
Cantuzumab	Humanisiert Mersantin- konjugiert	CanAg (MUC1)	Kolorektales Karzinom, Magen-, Pankreaskarzinom, NSCLC*
Labetuzumab	Humanisiert	CEA (Carcinoembryonales Antigen)	Kolorektales Karzinom, Pankreas- und Ovarialkarzinom

Tabelle 2: Humanisierte therapeutische monoklonale Antikörper in präklinischer Phase und in Phase I/II-Studien

Präparat	Typ	Zielstruktur	Anwendungsgebiete
Lumiliximab	Humanisiert	CD23	Chronische lymphatische Leukämie, (Asthma bronchiale)
Mepolizumab	Humanisiert	IL-5 (Interleukin-5)	Hypereosinophilie-Syndrom
Nimotuzumab (TherCim®)	Humanisiert	EGF-Rezeptor	-
Matuzumab (EMD72000)	Humanisiert	EGF-Rezeptor	Kolorektales Karzinom, Magenkarzinom, NSCLC
Pertuzumab (Omnitarg®)	Humanisiert	HER/neu	Mammakarzinom, Prostata-, Ovarialkarzinom, NSCLC

*NSCLC: Nichtkleinzelliges Lungenkarzinom (*Non-Small-Cell Lung Cancer*)

Dennoch weisen humanisierte Antikörper einen entscheidenden Nachteil auf. Wie die murinen Antikörper sind auch humanisierte Antikörper meist ausschließlich gegen Differenzierungsantigene gerichtet, die zwar tumorspezifisch überexprimiert, aber gleichzeitig auch auf gesunden Zellen zu finden sind. Deshalb handelt es sich bei den betreffenden Antigenen nicht um tumorspezifische Zielmoleküle im eigentlichen Sinne. Demzufolge reagieren auch gesunde Zellen mit dem Antikörper, was einerseits die Verfügbarkeit und Halbwertszeit der Immunglobuline reduziert und andererseits das Risiko unerwünschter Wirkungen erhöhen kann [21].

Bei einer Therapie mit humanisierten Antikörpern treten meist nur geringe Nebenwirkungen auf. So klagten Patienten (Non-Hodgkins Lymphom) nach der ersten Verabreichung von Rituximab (mAk spezifisch gegen CD20) über Fieberschübe und Hitzewallungen, deren Schweregrad und Häufigkeit in der Regel mit nachfolgenden Dosierungen abnahm [9]. Jedoch sind während der klinischen Phase immer wieder unerwartete Reaktionen zu beobachten, infolgedessen Präparate aufgegeben werden bevor es zur endgültigen Zulassung kommt. Auch bereits auf dem Markt befindliche Antikörper wurden wegen Unwirksamkeit gegenüber der Standardtherapie oder aufgrund des Auftretens von schwerwiegenden Nebenwirkungen wieder vom Markt genommen (siehe Tabelle 3) [29].

So wurde beispielsweise die Bildung von Immunkomplexen bestehend aus endogenen und infundierten Antikörpern berichtet, die bei einigen Patienten nach wiederholter Gabe humanisierter Antikörper zu beobachten waren. In einem Fall führte diese Anti-Antikörper-Reaktion zu Nierenversagen mit letalem Ausgang [21]. In einem anderen Fall starben zwei von

5000 Multiple-Sklerose-Patienten an den Folgen antikörperinduzierter schwerer Leuko-enzephalopathie, nachdem sie mit Natalizumab (mAk spezifisch gegen $\alpha_4\beta_1$ - und $\alpha_4\beta_7$ -Integrin) behandelt wurden [44]. Folglich wurde das entsprechende Präparat 2005 vom Markt genommen und erst nach erneuten Studien im Jahr 2006 wieder in den USA und zusätzlich in Europa zugelassen. Im März 2006 wurde die Entwicklung von TGN1412 eingestellt. Der agonistisch monoklonale Antikörper gegen T-lymphozytäres CD28 sollte zur Behandlung von Autoimmunkrankheiten und Leukämie auf den Markt gebracht werden. Bei der Erstanwendung im Menschen löste der Antikörper bei gesunden Probanden schwerwiegende Nebenwirkungen in Form von lebensbedrohlichen Zytokinstürmen (Systemisches inflammatorisches Response-Syndrom) mit Multiorganversagen aus [45].

Der humanisierte mAk Bevacizumab (Avastin[®]) führt durch die Bindung an VEGF zur verminderten Vaskularisierung und Wachstumshemmung eines Tumors, wird aber mitunter mit schwerwiegenden und z.T. lebensbedrohlichen unerwünschten Arzneimittelwirkungen in Verbindung gebracht [46, 47]. In einem aktuellen Fall wurde der AkdÄ (Arzneimittelkommission der deutschen Ärzteschaft) erneut von einer Patientin mit nicht-kleinzelligem Lungenkarzinom (NSCLC) berichtet, die 6 Tage nach Gabe von platinhaltiger Chemotherapie und Bevacizumab eine Kolonnekrose mit Perforation der Kolonflexur entwickelte. Aus der Vorgeschichte der Patientin ergaben sich keine Hinweise auf eine vorbestehende Darmerkrankung oder Metastasenbildung des Bronchialkarzinoms. Bei zwei Patienten, die an kleinzelligem Lungenkarzinom (SCLC) erkrankt waren, kam es während der Avastin[®]-Erhaltungsphase zu schwerwiegenden unerwünschten Ereignissen von Tracheoösophagealfisteln, die in einem Fall zum Tode führten. In einem weiteren, tödlichen Fall traten schwerwiegende Blutungen im oberen Verdauungstrakt auf. Hier wurde eine Tracheoösophagealfistel vermutet, aber nicht bestätigt [48, 49]. Seit der Zulassung von Humira[®] (Adalimumab) im Dezember 2002, wurden bei Patienten unter Adalimumab-Behandlung drei Fälle von hepatosplenalem T-Zell-Lymphom (HSTCL), einer seltenen und aggressiven Form des Non-Hodgkin-Lymphoms mit schlechter Prognose, registriert. Der gentechnisch gewonnene TNF- α -Blocker wurde bei erwachsenen Patienten für die Behandlung der rheumatoiden Arthritis, Psoriasis-Arthritis, ankylosierender Spondylitis, Morbus Crohn und Plaque-Psoriasis zugelassen. Auch hier ist es nicht auszuschließen, dass unter der Therapie mit Adalimumab ein erhöhtes Risiko für die Entwicklung des HSTCL besteht [50]. Beide Antikörper befinden sich derzeit noch auf dem Markt.

Tabelle 3 zeigt humanisierte therapeutische Antikörper, deren Entwicklung aufgrund ihres Nebenwirkungsspektrums aufgegeben wurde oder die nach dem Auftreten schwerwiegender unerwarteter Ereignisse vom Markt genommen wurden, nochmals im Überblick.

Tabelle 3: Zurückgezogene oder aufgegebene humanisierte therapeutische monoklonale Antikörper

Präparat	Typ	Zielstruktur	Indikation	Grund der Rücknahme
Natalizumab (Tysabri®)	Humanisiert IgG4	α_4 -Untereinheit von $\alpha_4\beta_1$ - und $\alpha_4\beta_7$ -Integrin	Multiple Sklerose	Zulassung in USA Nov. 2004; Feb. 2005 vom Markt genommen, da fünf von 5000 Patienten z.T. tödliche Leukoenzephalopathien entwickelten [44] 2006 wiederholte Zulassung in USA, Zulassung in Europa 2006
Nebacumab (Centoxin®)	Humanisiert IgM	Endotoxin HA-1A	Sepsis	Zulassung in Europa 1991; 1993 wegen erhöhter Sterblichkeit bei behandelten Patienten im Vergleich zu Placebo-Patienten vom Markt genommen [51]
TGN1414	Humanisiert	CD28	Leukämie Autoimmunerkrankungen	Zytokinsturm mit Multiorganversagen bei Behandlung am gesunden Probanden [45]

Monoklonale therapeutische Antikörper werden aufgrund ihrer spezifischen Eigenschaften als vielversprechende Ergänzung zu herkömmlichen therapeutischen und diagnostischen Methoden als neue immuntherapeutische Reagenzien erprobt. Der Erfolg einer Immuntherapie hängt allerdings entscheidend von der Effektivität und Immunogenität der Reagenzien und der Spezifität der Zielstrukturen ab.

Die existierenden therapeutischen Antikörper erfüllen diese Bedingungen nur eingeschränkt, basierend auf deren Struktur und Pharmakokinetik, der Zugänglichkeit des Zielgewebes und Abwehrmechanismen des Tumors. Ganz entscheidend binden die bisher etablierten Antikörper aber nicht an tumorspezifische Strukturen, sondern richtiger an tumorassoziierte Antigene [52-54]. In der Regel handelt es sich dabei um überexprimierte Formen zellspezifischer Membranproteine (z.B. CD20), Rezeptor-Tyrosinkinasen (z.B. HER2), Zelladhäsionsmolekülen (z.B. EpCAM) oder Wachstumsfaktoren (z.B. VEGF), die auch auf gesunden Zellen zu finden sind. Diese Tatsache erhöht nicht nur das Risiko unerwünschter Nebenwirkungen, sondern erniedrigt durch die parallele Adsorption des verabreichten Antikörpers an gesundes Gewebe gleichzeitig dessen therapeutische Verfügbarkeit in der Blutzirkulation. Zum anderen können die Anteile an Bestandteilen fremder Spezies unerwünschte Reaktionen hervorrufen, die nur durch die Reduktion dieser fremden Proteinbestandteile eliminiert werden können. Trotz der enormen Fortschritte in der Medizin besteht demnach weiterhin ein Bedarf an neuen monoklonalen Antikörpern, die neben einer erhöhten Spezifität vor allem eine geringere Toxizität und somit

eine bessere Verträglichkeit aufweisen müssen. Dieses Ziel kann nur durch den Einsatz gänzlich humaner Antikörper verwirklicht werden, die an tumorspezifische Antigene binden und ein Optimum an Verträglichkeit versprechen. Die Zukunft der monoklonalen Antikörper liegt daher nicht in der Entwicklung von murinen, chimären oder humanisierten Immunglobulinen, sondern in der Herstellung rein humaner Antikörper.

2.3 Humane monoklonale Antikörper

Nur wenige der neu entwickelten Antikörper, die derzeit in die klinische Entwicklung aufgenommen werden, stellen ganzheitlich humane Antikörper dar [55, 56]. Einige Beispiele sind in Tabelle 4 aufgeführt.

Tabelle 4: Humane therapeutische monoklonale Antikörper in präklinischer Phase und in Phase I/II-Studien

Präparat	Typ	Zielstruktur	Anwendungsgebiete
Mapatumumab	Human	-	Kolonkarzinom, chronische lymphatische Leukämie, Multiples Myelom
R1450	Human	Amyloid- β	Alzheimer-Krankheit
1D09C3	Human	MHC-II	Non-Hodgkin-Lymphom
SC-1	Human, IgM	Modifiziertes CD55	Magenkarzinom

Humane Antikörper werden derzeit meist über *Phage-Display* von Antikörper-Bibliotheken (*Phage Display Technology*) [57] oder durch Immunisierung transgener Mäuse (*HumAb-Mouse*) [58] gewonnen.

Beim *Phage-Display* werden Peptide (z.B. Antikörperfragmente) oder komplette Proteine funktionell auf der Oberfläche von Bakteriophagen präsentiert, die anschließend über die Wechselwirkung mit bestimmten Antigenen aus großen rekombinanten *Phage-Display*-Bibliotheken isoliert und identifiziert werden können. Aus den isolierten Antikörper-Phagen wird die zugehörige Gensequenz des Antikörpers isoliert und das entsprechende Protein mit Hilfe eines Zellsystems (z.B. *Escherichia coli*) exprimiert. Letztendlich werden so aus positiven

Einzelsträngen gentechnisch komplette Antikörper hergestellt. Die Methode eignet sich sehr gut, um humane Antikörper gegen bekannte Antigene herzustellen, die in reiner, löslicher Form und ausreichender Menge vorliegen. Beispielsweise wurde der TNF-spezifischer Antikörper Adalimumab (Humira[®]) über *Phage-Display* gewonnen [9]. Tumorspezifische Antikörper im eigentlichen Sinn, konnten mit dieser Technik jedoch noch nicht gewonnen werden.

Transgene Mäuse (*HumAb-Mouse*) enthalten ein genetisches Repertoire an humanen Immunglobulinen. Werden die Mäuse mit Tumorzellen oder Tumorzell-Extrakten immunisiert und anschließend isolierte B-Lymphozyten nach der klassischen Zellfusionsmethode hybridisiert, werden humane Antikörper exprimiert. Doch auch mit dieser Technik konnten bisher keine explizit tumorspezifischen Antikörper hergestellt werden, sondern lediglich humane Antikörper gegen tumorspezifisch überexprimierte Proliferationsantigene wie z.B. den EGF-Rezeptor (Panitumumab, Vectibix[®]) [9].

Mit Hilfe der von Sahin et al. 1995 entwickelten SEREX-Methode (*Serological Analysis of Autologous Tumor Antigens by Recombinant cDNA Expression Cloning*) ist es möglich, Serumantikörper gegen tumorassoziierte Antikörper zu finden [59, 60]. Dafür wird aus der Tumor-mRNA eine Expressions-cDNA-Bank in λ -Phagen angelegt. Nach der Infektion von *Escherichia coli*-Bakterien werden alle Proteine auf einer Membran fixiert und mit Serum von Tumorpatienten inkubiert. Positive Klone können mittels eines Sekundärantikörpers in einer enzymatischen Farbreaktion nachgewiesen werden. Sie werden isoliert, präpariert und stehen als Phagemid-Vektor für weitere Untersuchungen (z.B. Sequenzierung, Expressionsstudien) zur Verfügung. Der Vorteil dieser Technik liegt in der relativ einfachen technischen Handhabung zur Identifizierung tumorrelevanter Strukturen. Der entscheidende Nachteil ist, dass zwar neue Antigene definiert werden können, aber man erst durch weitere aufwendige molekularbiologische Schritte monoklonale humane Antikörper erhält.

Andere experimentelle Ansätze basieren auf der Technologie des Ribosomen-, mRNA- und Hefen-*Displays*, der Klonierung von Antikörper-cDNA aus einzelnen selektierten Lymphozyten [9] oder der klassischen Methode der somatischen Hybridisierung von direkt aus Patienten gewonnenen B-Lymphozyten (Hybridoma-Technik) [61].

3 Hybridoma-Technik (Triomatechnologie)

Eine Methode rein humane monoklonale Antikörper herzustellen ist die klassische Hybridisierung von B-Zellen, die direkt aus lymphatischem Material von Krebspatienten und gesunden Probanden isoliert werden. Die Entwicklung dieser Technologie zur Herstellung monoklonaler Antikörper geht auf Georges Köhler und César Milstein im Jahr 1975 zurück, die dafür im Jahre 1984 den Nobelpreis für Medizin erhielten [28]. Die Technik beruht auf der Fusion von murinen antikörperproduzierenden B-Lymphozyten mit immortalen Zellen einer Mausmyelomzelllinie, wodurch hybride Zellen entstehen, die beinahe unbegrenzt monoklonale Antikörper einer bestimmten Spezifität produzieren. Diese Entdeckung führte zu einer enormen Ausweitung der Nutzung von Antikörpern in Wissenschaft und Medizin [9, 56].

Am Pathologischen Institut der Julius-Maximilians-Universität Würzburg wurde 1989 basierend auf der klassischen Hybridisierung ein Verfahren entwickelt, rein humane monoklonale Antikörper zu generieren, die direkt aus dem Menschen stammen [62]. Im Gegensatz zum *Phage-Display* oder der SEREX-Methode werden bei dieser Methode sofort antikörperproduzierende Klone erhalten.

Antikörpersezernierende B-Lymphozyten werden aus Lymphknoten oder der Milz von Tumorpatienten bzw. gesunden Probanden isoliert. Durch die Fusion mit einer immortalisierten nicht-sezernierenden Heteromyelomzelle entstehen durch die sog. HAT-Selektionierung (Hypoxanthin-Aminopterin-Thymidin Sensitivität) stabile Zellklone (Triome), die komplette, rein humane monoklonale Antikörper produzieren (siehe

Abbildung 3, humane Triomatechnologie) [62, 63]. Im Anschluss wird mit Hilfe der ELISA-Technik (*Ezyme Linked Immunosorbent Assay*) der Isotyp der sezernierten Antikörper bestimmt und die Antikörper in immunhistochemischen und zellbiologischen Untersuchungen auf ihre Tumorspezifität hin untersucht. Zusätzlich bietet sich hier die Möglichkeit, über die neu gewonnen tumorreaktiven Antikörper nicht nur tumorassoziierte, sondern bisher unbekannte und vor allem rein tumorspezifische Antigene auf Tumorzellen zu definieren und anschließend mit Hilfe biochemischer Methoden zu isolieren bzw. zu charakterisieren. Im Gegensatz dazu können über die bereits erläuterten Methoden wie dem *Phage-Display* oder der transgenen Maus monoklonale Antikörper nur gegen bereits bekannte Zielstrukturen synthetisiert werden, die meist tumorassoziiert und nicht tumorspezifisch sind. Die Definition neuer und unbekannter Antigenstrukturen ist hier nicht möglich [9, 59, 60].

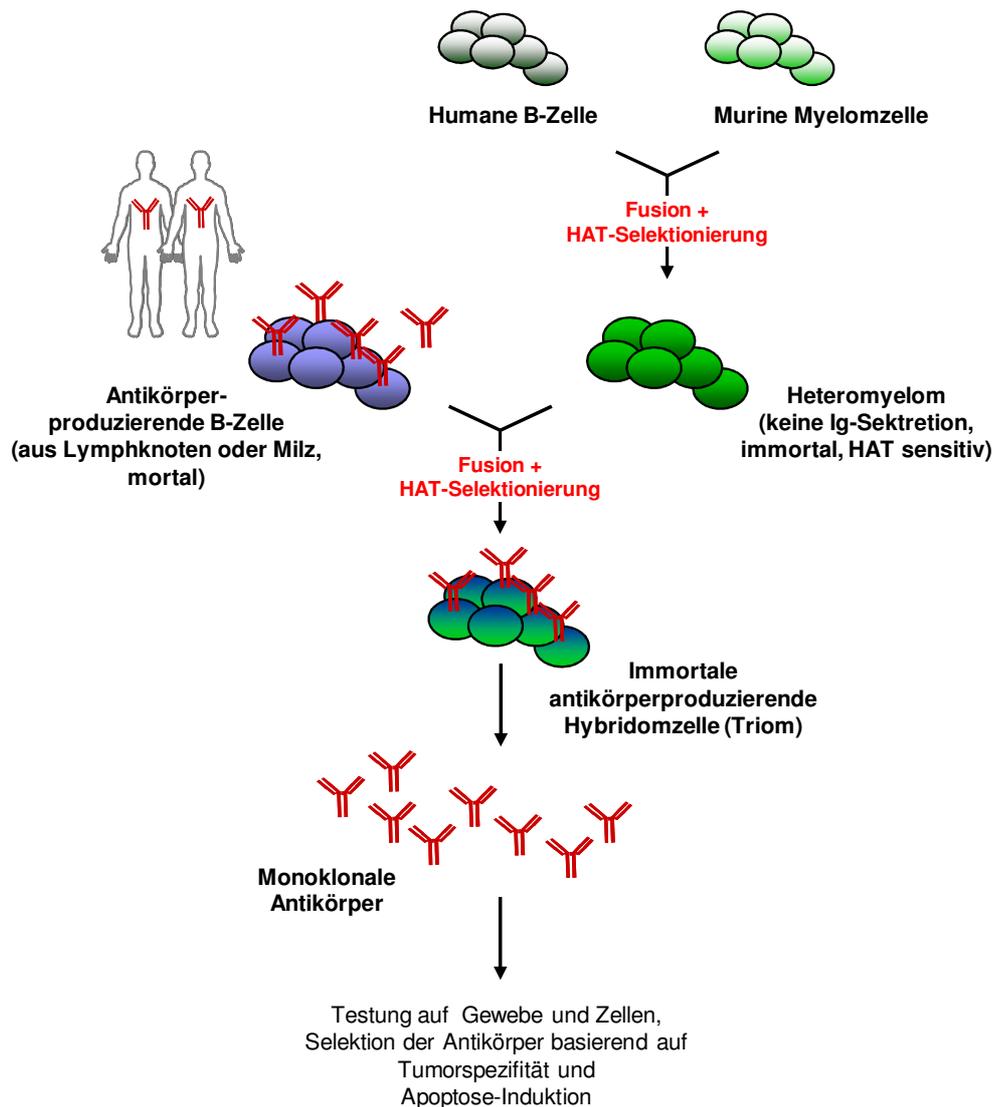


Abbildung 3: Humane Triomatechnologie.

Die klassische Hybridisierung von B-Zellen direkt aus dem Patienten bringt demnach entscheidende Vorteile mit sich: Neben Antikörpern rein humaner Natur können tumorspezifische Antikörper isoliert werden, die sich gegen bisher unbekannte und tumorspezifische Oberflächenantigene im eigentlichen Sinne richten. Die isolierten Antikörper können direkt in präklinischen und klinischen Versuchen eingesetzt werden und stellen effektive therapeutische Wirkstoffe hoher Spezifität für die Therapie und die Diagnose maligner Erkrankungen dar [62, 64-75]. Zusätzlich ist es möglich, durch die Charakterisierung dieser Antikörper und ihrer Antigene neue Einblicke in die humorale Tumorimmunität des Menschen zu gewinnen [61, 70, 76, 77].

4 Das Immunsystem des Menschen

Das Immunsystem des Menschen besteht aus einem komplexen Netzwerk, das für die Erkennung und Beseitigung von Pathogenen aus seiner Umwelt oder pathologisch veränderter eigener Zellen verantwortlich ist. Dabei stellt die Fähigkeit, fremdes oder transformiertes Gewebe (*Non-Self*) von eigenem und gesundem Gewebe (*Self*) zu unterscheiden, eine der wichtigsten Aufgaben des Immunsystems dar.

Das Immunsystem setzt sich aus der angeborenen (innaten oder primären) und der erworbenen (adaptierten oder sekundären) Immunität mit jeweils zellulären und humoralen Komponenten zusammen [78, 79]. Im Gegensatz zur adaptiven Immunantwort, die dem Körper erst nach klonaler Selektion von Lymphozyten gezielten Schutz bieten kann, stellt die innate Immunität ein vererbtes und nicht durch Affinitätsreifung entstandenes Abwehrsystem dar. Über initial vorhandene Mechanismen wird der Großteil aller Infektionen erkannt und erfolgreich bekämpft, ohne dass ein Lebewesen bereits vorher mit dem Erreger in Kontakt getreten sein muss. Hier stellen hochspezifische und hochreaktive Abwehrmechanismen den ersten unmittelbaren Schutz für den Organismus dar und verleihen ihm dadurch eine natürliche Immunität.

5 Innate Immunität

Die angeborene Immunabwehr entwickelte sich bereits früh in der Stammesgeschichte der Lebewesen. Im Laufe der phylogenetischen Entwicklung vom einfachen Lebewesen (Invertebraten) bis hin zum komplexen Organismus (Vertebraten), hat sich diese Abwehrstrategie als sehr effizient erwiesen [80, 81]. Invertebraten sind nur mit einer angeborenen Immunität, d.h. mit einer bestimmten Anzahl von genetisch determinierten Rezeptoren ausgestattet, die ohne weitere Reifung für die primäre Erkennung körperfremder Strukturen und für die Auslösung einer zellulären und humoralen Immunantwort ausreichen [82-87]. Vertebraten besitzen zusätzlich eine sekundäre, erworbene Immunität, die durch Reifung und Mutation eine höhere Variabilität der Rezeptoren erreichen kann [88-90].

Die Erkennung und Beseitigung infektiöser Partikel erfolgt sowohl bei Invertebraten als auch bei Vertebraten primär über die angeborene Immunität [79, 81]. Neben der physiologischen Epithelbarriere stützt sich das System dabei vor allem auf phagozytierende Zellen wie z.B. den Makrophagen, dendritische Zellen, Mastzellen, Natürliche Killerzellen (NK-Zellen) [91, 92] und

antikörperproduzierende, sogenannte CD5-positive B-Lymphozyten [93-96]. Durchdringt eine pathogene Substanz die Epithelbarriere, wird sie von den Zellen des Immunsystems erkannt und attackiert. Immunkompetente Zellen sind dabei in der Lage, den Eindringling selbst zu vernichten oder durch die Produktion von Botenstoffen (z.B. Interleukine) die Immunreaktion unter anderem durch die Induktion der adaptiven Immunantwort weiter zu verstärken [78, 82, 96-100].

Die innate Immunität unterscheidet zwischen Körperfremdem und Körpereigenem und ist für die frühzeitige und spezifische Immunabwehr vieler Krankheitserreger, wie z.B. Pilze, Viren, Bakterien, einzellige (Protozoen wie Plasmodien) bzw. mehrzellige Parasiten (Bandwürmer) verantwortlich [97, 101-103]. Sie bildet eine initiale Verteidigungsstrategie (*First Line of Defense*), die nicht nur in der Lage ist, eingedrungene Mikroorganismen und fremde Substanzen zu eliminieren, sondern insbesondere auch interne Bedrohungen in Form von fehlerhaften, körpereigenen Zellen frühzeitig zu erkennen und zu zerstören [79, 104, 105].

Vielzellige Organismen unterliegen permanent der Transformation körpereigener Strukturen. Die Ursachen genetischer Veränderungen können sowohl exogener als auch endogener Natur sein. Die Mehrzahl der menschlichen Tumore wird auf den Einfluss exogener Noxen (kanzerogene Substanzen aus Nahrung und Umwelt) zurückgeführt, wobei bei der Entstehung einer malignen Neoplasie gleichzeitig die genetische Prädisposition eines Individuums eine bedeutende Rolle spielt [106]. Auch durch endogene, ständig ablaufende Abbau- und Metabolisierungsvorgänge (Apoptose, Oxidationen, Radikalbildung etc.) werden im Körper schädliche Stoffwechselprodukte und zelluläre Abfallprodukte freigesetzt, die zur Veränderung körpereigener Zellen beitragen können. Bedingt durch den Alterungsprozess können sowohl auf genetischer Ebene als auch auf Proteinebene vermehrt spontane Mutationen einsetzen und zur Entartung körpereigener Zellen beitragen [107, 108]. Akkumulieren irreversible genetische Veränderungen, führt dies zur Transformation einer Zelle, aus der sich durch klonale Proliferation über einen längeren Zeitraum hinweg ein Tumor entwickeln kann [107, 109]. Durch die Transformation einer Zelle verändert sich neben ihren Eigenschaften (Wachstumsverhalten, Regulationsmechanismen, Zellkontakte) gleichzeitig ihr phänotypisches Aussehen. Es werden neue, veränderte Strukturen auf der Zelloberfläche exprimiert, die für das Überleben der transformierten Zelle von Vorteil sind. Genau diese Strukturen werden vom Immunsystem als fremd erkannt und bekämpft, da sie sich von den normalen, körpereigenen Strukturen unterscheiden. Die meisten neoplastischen Zellen werden bekämpft und so das Heranwachsen solider Tumore im Vorfeld verhindert [61, 66, 110-112]. Bei der Vielzahl der täglich ablaufenden Transformationen, stellt ein manifester Tumor die Ausnahme und nicht die Regel dar [113].

Um eine schnelle Reaktion zu gewährleisten, verläuft die primäre Immunantwort unabhängig von einer T-Zell-vermittelten Antigenpräsentation [82, 114]. Die Zellen, die an der innate Immunantwort beteiligt sind, erkennen statt einzelner spezifischer Strukturen vielmehr spezifische konservative Muster, die unabhängig des ursächlichen Mutationsereignisses exprimiert werden [115]. Sie sind eng mit dem Überleben und/oder den pathogenen Eigenschaften des Erregers verbunden und bestehen meist aus repetitiven Carbohydrateinheiten auf Glykoproteinen oder Glykolipiden (bakterielle Zellbestandteile wie z.B. Lipopolysaccharide (LPS), Protozoen- und Pilzbestandteile, bakterielle und virale Nukleotidbestandteile etc.) [82, 83, 115-117]. Die spezifischen Muster, die sog. pathogen-assoziierten molekularen Muster (*Pathogen Associated Molecular Pattern*, PAMP), werden über keimbahnkodierte Rezeptoren immunkompetenter Zellen (NK-Zellen, $\gamma\delta$ -T-Zellen, CD5-positive B-Zellen) erkannt [82, 83]. Bisher konnten vier Familien dieser spezifischen Erkennungsrezeptoren (sog. *Pattern Recognition Receptors*, PRRs) identifiziert werden. Zu ihnen gehören die sog. Interleukin-1 und Drosophila Toll-ähnlichen Rezeptoren (*Drosophila Toll-like Receptors*, TLRs) (für die Erkennung von Bakterien, Viren, Protozoen und Pilzen zuständig), die sich außerhalb der Zelle oder in den Endosomen befinden [118]. Sie arbeiten synergistisch mit weiteren, im Zytosol lokalisierten Rezeptoren zusammen, wie den RIG-1-ähnlichen Rezeptoren (*Retinoic Acid Inducible Gene 1-like Receptors*, RLRs) (für die Erkennung viraler Ribonukleinsäuren zuständig), den NOD-ähnlichen Rezeptoren (*Nucleotide Binding and Oligomerization Domain-like Receptors*, NLRs) (Erkennung bakterieller Bestandteile) und den Lektin-Rezeptoren vom C-Typ (*C-Type Lectin Receptors*, CLRs) (Erkennung von Pilzen) [119]. Erfolgt die Bindung an eine der konservativen Strukturen, kommt es zur Induktion diverser Signalkaskaden bis hin zur Aktivierung von Zytokinen und weiteren Immunzellen [116]. Die keimbahnkodierten Rezeptoren erkennen verwandte Muster (PAMP) anstatt spezifische Strukturen. In der Regel handelt es sich um Polysaccharide und Polynukleotide, die sich von Pathogen zu Pathogen meist nur geringfügig unterscheiden und im eigenen Organismus nicht vorkommen [117]. Durch diese Strategie kann über eine geringe Anzahl von Rezeptoren und Erkennungsmotiven ein breites Spektrum pathogener Substanzen zuverlässig abgedeckt werden.

Bereits in den 70er Jahren postulierten Burnet und Thomas, dass immunologische Vorgänge maßgeblich an der Entstehung, der Progression und vor allem der Abwehr und Bekämpfung von Tumoren beteiligt sind [120-122]. Trotz erster Hinweise darauf, dass die innate Immunität eine zentrale Rolle bei der Abwehr pathogener Eindringlinge [115] und maligner Zellen [62] einnimmt, wurde sie aus immunologischer Sicht lange als unspezifisch definiert und hauptsächlich für autoreaktive Immunprozesse verantwortlich gemacht. Bis Mitte der 90er Jahre

galt ausschließlich die adaptierte Immunantwort für die Abwehr fremder Strukturen als verantwortlich, die, induziert durch Antigenkontakt, hochspezifische Antikörper und Zellen zum Einsatz bringt. Inzwischen hat sich die zentrale Rolle der innaten Immunität wissenschaftlich bestätigt: Sie ist nicht nur für die initiale Abwehr eingedrungener Krankheitserreger verantwortlich, sondern spielt vor allem bei der Abwehr transformierter Zellen eine wichtige Rolle. Sie erkennt und eliminiert eine Zelle bereits nach ersten Veränderungen, die im Rahmen der Tumorentstehung auftreten können [61, 77, 123, 124]. Des Weiteren fungiert sie als Induktor und Stimulus für die sekundär erworbene Immunantwort, wodurch im Bedarfsfall die Immunantwort weiter verstärkt werden kann [82, 96, 98-100].

5.1 Natürliche Antikörper

Antikörper spielen eine zentrale Rolle bei der humoralen Immunantwort der Vertebraten. Sie erkennen nicht nur Pathogene oder fremde Strukturen, sondern sie verfügen darüber hinaus über bestimmte Effektor-Mechanismen, die allein oder zusammen mit anderen Komponenten des Körpers (beispielsweise Komplement) zur Vernichtung fremder Partikel und veränderter Zellen führen. Als natürliche Antikörper werden Antikörper bezeichnet, die in einem gesunden Individuum ohne vorausgegangene exogene Stimulation mit einem Antigen zirkulieren. Gerade in der frühen Phase der Detektion und Beseitigung fremder und insbesondere veränderter körpereigener Zellen stützt sich der Körper auf das effektive Abwehrsystem der innaten Immunität, bei dem vor allem natürliche Antikörper eine entscheidende Rolle spielen [125-128].

In den letzten Jahren ist es gelungen, aus dem Menschen natürliche Antikörper mit tumorspezifischen Eigenschaften zu isolieren [61]. Bei den tumorreaktiven Antikörpern handelt es sich zu 99 Prozent um pentamere IgM-Isotypen, die aufgrund der geringen Mutationen in den Keimbahngenen zu den nicht affinitätsgereiften Antikörpern gehören. Nur ein sehr geringer Prozentsatz (kleiner 1 %) konnte der Immunglobulin-Klasse A und G zugeordnet werden. Sie alle werden von ganz bestimmten Keimbahngenfamilien kodiert, ausschließlich von CD5-positiven B-Lymphozyten produziert, und konnten sowohl aus an Tumoren erkrankten Patienten als auch aus gesunden Probanden isoliert werden. Sie sind Bestandteil der innaten Immunität und demnach nicht nur im bereits (an Krebs) Erkrankten, sondern ebenso im gesunden Menschen zu finden [61, 127].

Betrachtet man die Häufigkeit spontaner Mutationen und zellulärer Transformationen, sorgen effiziente zelluläre Reparatur- und immunkompetente Abwehrmechanismen dafür, dass sich ein Tumor nur selten manifestiert [113]. Natürliche Antikörper sind nicht nur bei der initialen

Bekämpfung externer Pathogene beteiligt [115, 129], sondern vor allem bei der Erkennung und Elimination kanzerogener Läsionen und deren Vorstufen entscheidend involviert [61, 68, 69, 111, 124, 130].

Die bisher untersuchten tumorreaktiven IgM-Antikörper sind in der Lage, maligne Zellen durch die Induktion verschiedener Apoptosemechanismen zu eliminieren [130]. Die Apoptose gilt als besonders selektive, schnelle und effektive Methode der Beseitigung unerwünschter Zellen. Komplexe intrazelluläre Vorgänge enden programmgemäß im Abbau der Zellstruktur. Bestimmte Proteasen zerlegen die Proteine der Zelle, Endonukleasen fragmentieren die Nukleinsäuren. Als Ergebnis bilden sich Membranvesikel, die vom Organismus wiederverwertet oder abgebaut werden, ohne merklich inflammatorische Prozesse auszulösen [131]. Die Form des molekularen Recyclings kommt nicht nur während der Zelldifferenzierung und -entwicklung zum Einsatz, sondern garantiert vor allem eine schnelle und unverzögerte Beseitigung maligner Zellen. Als weiteres Charakteristikum zeigen die isolierten Antikörper ein oligoreaktives Bindungsverhalten und sind daher in der Lage, an mehrere Antigene zu binden [125]. Dabei bevorzugen sie Carbohydrat-Epitope tumorspezifisch modifizierter Oberflächenrezeptoren [61, 65, 72, 74].

Um Überleben und Wachstum einer malignen Zelle zu gewährleisten, werden meist Schutzmoleküle und Wachstumsrezeptoren modifiziert bzw. modifiziert überexprimiert. So detektiert der natürliche IgM-Antikörper SC-1 eine modifizierte Form des Oberflächenrezeptors CD55 auf Magenkarzinomzellen [62, 74], der natürliche IgM-Antikörper PAM-1 eine neue Variante des Wachstumsfaktorrezeptors CFR-1 (*Cystein Rich Fibroblast Growth Factor Receptor 1*) [68, 69, 71, 72]. Vor kurzem wurde im Gewebe einer aggressiven Form des Prostatakarzinoms eine neue Isoform des Hitzeschockproteins GRP94 (*Glucose Regulated Protein 94 kD*) entdeckt, die im Vergleich zum bisher bekannten Wildtypen ein modifiziertes Glykosilierungsmuster aufwies [132]. Keine der modifizierten Varianten konnte in normalem Gewebe nachgewiesen werden. Man fand jedoch heraus, dass die Modifikationen in der Regel parallel zu deren Wildtypformen exprimiert werden. In allen Fällen fand die Modifizierung in der Kohlenhydratkette der jeweiligen Moleküle statt.

Eine transformierte Zelle weist nicht nur antigenes sondern auch immunogenes Potential auf. Im Rahmen der Tumorentstehung präsentiert sie feste Merkmale, die parallel zu den PAMP von den natürlichen Antikörpern spezifisch erkannt und bekämpft werden, bevor sich krankhafte Veränderungen manifestieren können. Obwohl die maligne Veränderung zur Überlebensstrategie der Tumorzelle gehört, wird diese gerade durch die Expression solch tumorspezifischer Moleküle zum Angriffspunkt der körpereigenen Immunabwehr (*Immune Surveillance*) und der natürlichen IgM-Antikörper. Neu gewonnene Erkenntnisse der letzten

Jahre deuten dabei bezüglich ihrer Kreuzreaktivität, Affinität und der Bindung an Carbohydrat-Antigene auf große Parallelen zur bakteriellen Immunabwehr hin [111, 133]. Die isolierten Antikörper, die sich als Produkte der natürlichen (angeborenen) Immunität bestätigten, stellen optimale Therapeutika für neue immuntherapeutische Ansätze in der Onkologie dar.

5.1.1 Antikörper SC-1

Der monoklonale Antikörper SC-1 wurde aus einem Patienten mit Siegelringzellkarzinom des Magens durch Fusion der Milzzellen mit dem Heteromyelom SPM4-0 generiert [62]. Es handelt sich um einen IgM-Antikörper, der von einem leicht mutierten Gen der VH3-Familie codiert wird (Homologie zum Keimbahn-Gen DP-49 beträgt 97 %) [134]. Der Antikörper bindet an eine Isoform des CD55/DAF-Rezeptors (*Decay-Accelerating Factor*), die spezifisch auf Magenkarzinomzellen exprimiert wird [74]. Der membranständige GPI-Rezeptor (Glycosylphosphatidylinositol), der die Zellen vor autologem Komplement schützt, indem es die Bildung von C3-Convertase im klassischen Komplementweg verhindert, liegt im Menschen in verschiedenen Isoformen vor (u.a. als DAF B) und wird auf einer Vielzahl von Tumoren überexprimiert [135]. Bei dem Rezeptor handelt es sich demnach nicht um ein Molekül der klassischen CD95-Familie mit einem *Death-Domain*-Komplex, sondern um eine modifizierte Variante des Schutzmoleküls. Durch enzymatischen Verdau mit Endoglykosidasen wurden N-glykosidisch gebundene Carbohydratreste des CD55-Rezeptors als Zielstruktur für die Antikörperbindung identifiziert [74].

Der Antikörper SC-1 reagiert mit über 70 % aller Adenokarzinome des Magens vom diffusen und vom intestinalen Typ, jedoch nicht mit Karzinomen anderer Organe, malignen Melanomen, verschiedenen malignen Lymphomen und Normalgewebe [62, 64, 136]. *In vitro* und in experimentellen *in-vivo*-Systemen inhibiert der Antikörper das Wachstum von Magenkarzinomzellen [75, 134, 136], wobei molekularbiologische und zellbiologische Untersuchungen ergaben, dass sich der apoptotische Mechanismus deutlich von den bisher beschriebenen klassischen Signalwegen der Apoptose-Induktion unterscheidet [73, 137].

In einer Phase I/II Studie (Chirurgische Klinik und Missionsärztliche Klinik, Würzburg) an 50 Patienten konnten mit dem SC-1 Antikörper signifikante Effekte auf Primärtumore beobachtet werden [67, 138-140]. Im Rahmen dieser Studie wurden Magenkarzinompatienten präoperativ mit SC-1 Antikörper behandelt. Der Antikörper wurde von den Patienten ausnahmslos sehr gut vertragen und zeigte keinerlei toxische Kreuzreaktionen mit gesundem Gewebe. Infolge der Behandlung kam es bei ca. 60 % der Patienten zu einer signifikanten Regression der Tumormasse. Die histomorphologische Bewertung der Resektate spiegelte bei

84 % der Fälle, verglichen mit Gewebeproben, die vor der Behandlung mit dem SC-1 Antikörper entnommen wurden, eine erhöhte Apoptoserate auf. 35 der Patienten profitierten von der Behandlung mit dem SC-1 Antikörper und zeigten im Vergleich zu Magenkarzinompatienten, die mit der Standardtherapie (Deutsche Magenkarzinomstudie 1998 [141]) behandelt wurden, nach 3 Jahren eine deutlich höhere Überlebensrate. Die Wirksamkeit des SC-1 Antikörper war der der entsprechenden Standardtherapie überlegen. Weitere Analysen deuteten darauf hin, dass die SC-1 spezifische Isoform des CD55-Rezeptors möglicherweise auf besonders aggressiven Tumoren exprimiert wird. In diesem Falle bietet sich der Einsatz des SC-1 Antikörpers als geeigneter Prognosefaktor und Biomarker für das Ansprechen von Tumortherapien an.

5.1.2 Antikörper PAM-1

Der humane Antikörper PAM-1 wurde ebenfalls aus einem Patienten mit einem Magenkarzinom isoliert. Hierzu wurden Milzzellen des Karzinompatienten mit dem Heteromyelom HAB-1 fusioniert [142]. Es handelt sich bei PAM-1 um einen IgM-Antikörper, der von einem nicht mutierten Gen der VH3-Familie codiert wird (Homologie zum Keimbahn-Gen DP-49 beträgt 100 %) und somit zur Gruppe der natürlichen Antikörper gezählt werden kann [61]. Der Antikörper PAM-1 bindet an einen Carbohydratrest einer modifizierten Form des integralen Membranproteins CFR-1 [68, 69, 72]. Durch die Blockade des Wachstumsrezeptors CFR-1^{PAM-1} induziert der PAM-1 Antikörper *in vitro* und *in vivo* tumorspezifisch Apoptose [71]. Der Rezeptor wird ausschließlich auf prä-malignen und malignen Zellen exprimiert und ist aufgrund dieser Spezifität vor allem für diagnostische Zwecke im Rahmen der Tumorprävention interessant. Zu den Tumoren, die durch den PAM-1 Antikörper spezifisch erkannt werden, gehören die meisten epithelialen Karzinome verschiedenen Ursprungs. Hier spielt nicht nur die Identifizierung von Risikofaktoren und deren Beseitigung eine Rolle, sondern vielmehr auch die Früherkennung von Vorläuferstadien und Präkanzerosen. CFR-1^{PAM-1} ist durch sein Verteilungsmuster ein potentieller Marker für entartete Zellen. Zu den Präkanzerosen, die eine positive Reaktion mit PAM-1 zeigen, gehören Präkanzerosen des Magens (*Helicobacter pylori*-assoziierte Gastritis, intestinale Metaplasie, hochgradige Dysplasie), des Barrett-Ösophagus (Barrett-Metaplasie und Barrett-Dysplasie), der Zervix (CIN I-III) und des Bronchus (Plattenepithel-Metaplasie und -Dysplasie) [68, 69, 72]. Untersucht wurden auch die als Vorstufen klassifizierten tubulären und villösen Adenome des Kolons sowie Präkanzerosen des Prostata- und Mammakarzinoms. PAM-1 bindet auch im Falle dieser Präkanzerosen spezifisch an die atypischen, entarteten Zellen. Gesunde Zellen dagegen werden nicht erkannt.

5.1.3 Antikörper SAM-6

Der humane IgM-Antikörper SAM-6 wurde ebenfalls nach Fusionierung von HAB-1 Heteromyelomen mit den Milzzellen eines an Magenkarzinom erkrankten Patienten generiert. Auch dieser Antikörper gehört zur Immunglobulin-Klasse M und weist keinerlei Mutationen in der Sequenz der Keimbahngene auf (Gen IgHV3-30.3*01 und IgLV3-1*01) [61].

Immunhistochemische Untersuchungen und FACS-Analysen zeigten, dass der SAM-6 Antikörper an ein membranständiges Molekül bindet, wobei die Bindung ausschließlich auf malignen und nicht auf gesunden Geweben und Zellen zu detektieren war [143]. Erste Untersuchungen deuteten hierbei auf ein 140 kD großes Membranmolekül auf der Tumorzelloberfläche hin.

Der Antikörper SAM-6 fiel besonders durch seine funktionelle Aktivität gegenüber Tumorzellen auf. Durch die Bindung an seinen Rezeptor hemmt er *in vitro* nicht nur konzentrationsabhängig das Wachstum von Magen- und Pankreaskarzinomzellen, sondern induziert tumorspezifisch Apoptose [143]. Diese Beobachtung konnte durch elektronenmikroskopische Aufnahmen von SAM-6 behandelten Tumorzellen ergänzt werden. Bereits nach kurzer Zeit stellten sich erste apoptotische Veränderungen wie die Ausbildung von Stressfasern und der Verlust von Zell-Zell-Kontakten ein. Nach 24 h zeigten sich drastische morphologische Veränderungen wie Zellschrumpfung, Anschwellung des Zellkerns sowie die Ausbildung sog. *Apoptotic Bodies*. Bei normalen, nicht malignen Zellen zeigte sich dagegen kein antikörperinduzierter Einfluss auf das Wachstumsverhalten. Interessanterweise konnte eine verstärkte Akkumulation intrazellulärer Lipideinlagerungen in den mit SAM-6 behandelten Tumorzellen beobachtet werden, die in Kontrollzellen ebenfalls nicht zu detektieren waren [143]. Bei der Fetteinlagerung handelt es sich demnach um einen durch den Antikörper vermittelten direkten Effekt, der zu einer neuen Art des apoptotischen Zelltodes, der sog. Lipoptose führt. Auch der SAM-6 Antikörper ist aufgrund der tumorspezifischen Expression seiner Zielstruktur sowie der außergewöhnlichen Art der Apoptose-Induktion für einen potentiellen therapeutischen Einsatz von größtem Interesse.

6 Ziel der Arbeit

Mit Hilfe der humanen Hybridomatechnologie ist es möglich, sowohl neue tumorspezifische Antigene zu identifizieren als auch neue therapeutische Wirkstoffe in Form von hocheffektiven monoklonalen Antikörpern zu gewinnen.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden die tumorspezifischen Eigenschaften des natürlichen Antikörpers SAM-6 genauer charakterisiert, um die Wirkungsweise des natürlichen IgM-Antikörpers besser verstehen zu können. Hierbei war besonders von Interesse, wie der Antikörper in den Lipidhaushalt der Zelle eingreift und über welche Signalwege der lipotoxische Zelltod eingeleitet wird. In diesem Zusammenhang waren gleichzeitig die Art und die Rolle der eingelagerten Lipide von großem Interesse.

Neben der funktionellen Analyse des SAM-6 Antikörpers und seines apoptotischen Signalwegs, lag der Schwerpunkt der folgenden Arbeit auf der Identifizierung und Charakterisierung der Zielstruktur des SAM-6 Antikörpers. Die potentielle Bindungsstelle sollte über gängige biochemische Verfahren isoliert und identifiziert werden. Im Verlauf der weiteren Charakterisierung des Antigens sollte ermittelt werden, ob es sich, wie bei den bereits erwähnten Zielstrukturen der IgM-Antikörper SC-1 und PAM-1, auch hier um eine tumorspezifisch modifizierte Variante eines Membranmoleküls handelt. Weiterhin sollte geklärt werden, ob bei der Bindung des SAM-6 Antikörpers bestimmte Glykosilierungsmuster von Bedeutung sind, und somit Parallelen zu den bereits identifizierten Tumorantigenen existieren.

II. Material und Methoden

1 Materialien

1.1 Verbrauchsmaterialien

Allgemeine Materialien und Kits	Hersteller
Agarose	Roth, Karlsruhe
BCA-Lösung A	Perbio Science Deutschland GmbH, Bonn
BigDye [®] Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit	Applied Biosystems Inc, Foster City, USA
Blotting-Papier (0.37 mm, 190 g/m ²)	Schleicher & Schuell, Dassel
Caspase 6 Assay Kit, Colorimetric	Calbiochem, San Diego, USA
Caspase 9 Assay Kit, Colorimetric	Calbiochem, San Diego, USA
Chemolumineszenzsubstrat SuperSignal [®] West Pico Chemiluminescent Substrate	Perbio Science Deutschland GmbH, Bonn
Cell Death ELISA Kit	Roche Diagnostics, Mannheim
Complete/ Complete mini Protease Inhibitor	Roche Diagnostics, Mannheim
Cytochrom C ELISA Kit	Calbiochem, San Diego, USA
DAB Tabletten SigmaFAST [™] DAB Tablets	Sigma, München
Demaskierlösung G	Biologo, Kronshagen
Fluorescent Mounting Medium	Dako-Cytomation, Carpinteria, USA
Fluorescent orange 548 reactive	Fluka, Buchs, Schweiz
Fluoro Taq FITC Conjugation Kit	Sigma, München
Gel Drying Film (17,5 x 20 cm)	Promega, Mannheim
Gene Ruler [™] 100bp DNA Ladder	MBI Fermentas, St. Leon-Rot
HEPES Lösung 1M	Biochrom AG, Berlin
HiLoad [™] 26/60 Superdex [™] 200 prep grade	GE Healthcare, München
HiTrap [™] Q XL, 5 ml	GE Healthcare, München
HiTrap [™] SP FF, 5 ml	GE Healthcare, München
6x Loading Dye Solution	Fermentas, St. Leon-Rot
MTT Reagenz	Sigma, München
NAP [™] 10 Sephadex [™] G25	GE Healthcare, München
Nitrozellulose Protran [®] (0,2 µm)	Schleicher & Schuell, Dassel
Protein Marker peqGOLD II	PeQLab, Erlangen
ProteoExtract [™] Native Membrane Protein Extraction Kit	Calbiochem, San Diego, USA

Allgemeine Materialien und Kits	Hersteller
QIAquick PCR Purification Kit	Qiagen, Hilden
Rotiphorese 30	Roth, Karlsruhe
Sephadex™ G25	GE Healthcare, München
SilverSNAP® Stain Kit II	Perbio Science Deutschland GmbH, Bonn
Tissue Tek® O.C.T.™	Sakura, Zoeterwoude, Niederlande
Transfektionsreagenz siLentFect™	Bio-Rad Laboratories, Hercules, USA
Trizol® Reagent	Invitrogen, Karlsruhe
Vybrant® Apoptosis Assay Kit #13	Invitrogen, Karlsruhe

Antikörper		Hersteller
Unkonjugiert	SAM-6, humaner IgM-Antikörper	Eigenes Labor
	Mouse anti human CD55	DPC Biermann, Bad Nauheim
	Rabbit anti human GRP78 (ET-21)	Sigma, Taufkirchen
	Rabbit anti human GRP78 (GL-19)	Sigma, Taufkirchen
	Chicken anti human LDL Receptor	Abcam, Cambridge, USA
	Rabbit anti human LDL Receptor	Acris, Hiddenhausen
	Goat anti human Apolipoprotein B 48/100	Acris, Hiddenhausen
Isotypen	Chrompure human IgM	Dianova, Hamburg
	Mouse Serum IgG	Sigma, Taufkirchen
	Rabbit Serum IgG	Sigma, Taufkirchen
Konjugiert	Rabbit anti human IgM, FITC	Dako, Hamburg
	Rabbit anti human IgM, HRP	Dako, Hamburg
	Goat anti rabbit IgG, FITC	Acris, Hiddenhausen
	Goat anti rabbit IgG, HRP	Dako, Hamburg
	Goat anti mouse IgG, IgA, IgM, FITC	Acris, Hiddenhausen
	Goat anti human Apolipoprotein B 48/100, HRP	Acris, Hiddenhausen

Enzyme	Hersteller
N-Glykosidase F, recombinant	Roche Applied Science, Mannheim
O-Glykosidase	Roche Applied Science, Mannheim
Ribonuklease A (RNase A)	Sigma, Taufkirchen
Recombinant RNAsin [®] Ribonuklease-Inhibitor	Promega, Mannheim
Super Script [™] II Reverse Transkriptase (M-MLV RT)	Invitrogen, Karlsruhe
Taq Polymerase	MBI Fermentas, St.Leon-Rot
Trypsin/EDTA (1x)	PAA, Wien, Österreich

Oligonukleotide für die Transfektion (siRNA)	Hersteller
siGENOME <i>SMART</i> pool Reagent, Human HSPA5	Dharmacon, Lafayette, USA
siGENOME <i>SMART</i> pool Reagent, Human LDLR	Dharmacon, Lafayette, USA
Silencer [™] TRA1 siRNA, Cenix Pre-designed	Ambion, Cambridge, UK

Kontroll-siRNA

Silencer [™] Cy [™] 3-Labeled GAPDH siRNA	Ambion, Cambridge, UK
Silencer [™] Negative Control	Ambion, Cambridge, UK

Verwendete siRNA-Duplicates gegen HSPA5

Ziel-nukleotide	Sequenz	
	Sense-Strang	Antisense-Strang
1094-1112	CGACUCGAAUCCAAAGAUdTdT	5'-P AUCUUUGGAAUUCGAGUCGdTdT
1366-1384	GAUAAUCAACCAACUGUUAdTdT	5'-P UAACAGUUGGUUGAUUAUCdTdT
1615-1633	GAAAGGAUGGUUAAUGAUGdTdT	5'-P CAUCAUUAACCAUCCUUUCdTdT
1821-1839	CCACCAAGAUGCUGACAUUdTdT	5'-P AAUGUCAGCAUCUUGGUGdTdT

Primer zur cDNA-Synthese		Hersteller
Oligodeoxythymidylsäure-Primer (Oligo-dT15)		MWG Biotech, Ebersberg

Primer für die PCR	Sequenz
GRP78_Fragment 1*	5'- ATG AAG CTC TCC CTG GTG GCC -3'
GRP78_Fragment 1**	5'- GTT TGA TGA AGT GTT CCA TGA C -3'
GRP78_Fragment 2*	5'- GTC ATG GAA CAC TTC ATC AAA C -3'
GRP78_Fragment 2**	5'- CAG GGG TCT TTC ACC TTC ATA G -3'
GRP78_Fragment 3*	5'- CTA TGA AGG TGA AAG ACC CCT G -3'
GRP78_Fragment 3**	5'- CTA CAA CTC ATC TTT TTC TGC TG -3'

Kontroll-PCR	
GAPDH*	5'- AAG GTC GGA GTC AAC GGA TTT -3'
GAPDH**	5'- AGA TGA TGA CCC TTT TGG CTC -3'

*Sense: 5'-Primer
 **Antisense: 3'-Primer

Die spezifischen PCR-Primer für die Amplifikation von GRP78 und GAPDH wurden mit Hilfe des DNAsis-Programms nach deren bekannten Sequenzen bestimmt und über die Firma MWG-Biotech AG, Ebersberg, bezogen.

Alle weiteren verwendeten Chemikalien wurden von den Firmen Sigma (München), Roth (Karlsruhe) oder Merck (Darmstadt) in der höchsten Reinheitsstufe bezogen.

Für die Zellkultur der Tumorzelllinien wurden RPMI 1640 Medium, Fötale Kälber Serum (FCS Gold), L-Glutamin und Penicillin/Streptomycin der Firma PAA (Wien, Österreich) verwendet. Normale nasale Epithelzellen wurden in Airway Epithelial Cell Growth Medium plus Supplement Mix der Firma PromoCell (Heidelberg) und Hybridomzellen in HyQ[®] ADCF-MAb[™] Medium der Firma HyClone (Perbio Science, Bonn) jeweils unter Zusatz von Penicillin/Streptomycin der Firma PAA (Wien, Österreich) kultiviert.

Die Transfektion der Tumorzellen mit siRNA wurde in OPTI-MEM, ein serumfreies Medium der Firma Gibco/Invitrogen (Karlsruhe), angesetzt.

Alle Einmal- und Verbrauchsartikel wurden von der Firma Greiner Labortechnik (Frickhausen) geliefert.

1.2 Eukaryotische Zelllinien

Die verwendeten Zelllinien wurden von der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ, Braunschweig) oder der PromoCell GmbH (Heidelberg) bezogen. In Tabelle 5 sind Informationen über den Ursprung der einzelnen Zelllinien, die Verdopplungszeiten und Subkultivierungsdaten zusammengestellt.

Tabelle 5: Übersicht über die verwendeten Zelllinien

Zelllinie	Organ	Zell-/Karzinom-Typ	Wachstum	Verdopplungszeit [h]	Subkultivierung
23123/87	Magen	Adenokarzinom	adhärent	30	1:8 alle 5-6 Tage
BXPC-3	Bauchspeicheldrüse	Adenokarzinom	adhärent	40	1:10 alle 3 Tage
RPMI 2650	Nase	Plattenepithelkarzinom	adhärent	40-50	1:6 alle 4-5 Tage
HNEPc	Nase	Plattenepithel	adhärent	12-48	1:4 alle 4-5 Tage

1.3 Geräte

Gerät	Hersteller
Blotkammer (Semi-Dry)	Bio-Rad, München
Brutschränke Heracell	Kendro, Langenselbold
Konfokales System:	
Mikroskop Leica DMRE/ UV	Leica Microsystems AG, Wetzlar
Innova [®] Ion Laser System	Coherent Inc., Santa Clara, USA
DNA-Sequencer 373	Applied Biosystems, Weiterstadt
ELISA-Reader 550	Bio-Rad, München
FACScan	BD Bioscience, San Jose, USA
FPLC System:	GE Healthcare, München
Liquid Chromatography Controller LCC-500	
Pump P-500	
Pump P-50	

Gerät	Hersteller
Single Path Monitor UV-1, Control Unit and Optical Unit	
Motor Valve MV-7	
Superloop 30 ml	
Recorder REC-112	
Fraction Collector FRAC-100	
Gelelektrophoresekammer, Minigel G42	Biometra, Göttingen
Kryostat 2800 Frigocut E	Reichert-Jung, Nussloch
Mikroskop Leica DMIL	Leica Microsystems AG, Wetzlar
Mikroskop Olympus BX50	Olympus Deutschland GmbH, Hamburg
Mikrotom SM 2000R	Leica Microsystems AG, Wetzlar
Mikrozentrifuge Eppendorf 5415 D	Eppendorf, Hamburg
PCR-Maschine Mastercycler <i>gradient/personal</i>	Eppendorf, Hamburg
pH-Meter inolab pH Level 1	WTW, Weilheim i. OB
Photometer GeneQuant <i>pro</i>	GE Healthcare, München
Pipetten (10, 100, 200, 1000 µl)	Gilson, Middleton, USA
Reinstwassersystem Milli-Q®	Millipore, Eschborn
Röntgenfilme Fuji Super RX	Fuji Photo Film Co., Ltd., Tokyo, Japan
Röntgenkassette (13 x 18 cm)	Dr. Goos–Suprema GmbH, Heidelberg
Schüttler/Mischgerät Unimax 1010	Heidolph Instruments, Schwabach
Sonifikator Labsonic VB.	Braun, Melsungen
Spannungsgerät Electrophoresis Power Supply EPS 300	GE Healthcare, München
Sterilbank Herasafe	Kendro, Langenselbold
Thermoblock neoBlock 1	NeoLab, Heidelberg
Ultrazentrifuge L8-M	Beckmann, München
Videokamera 3CCD Sony	Sony Deutschland GmbH, Köln
Vortex Mixer 7-2020	NeoLab, Heidelberg
Waage MC 1	Sartorius, Göttingen
Wasserbad WB10	Memmert, Schwabach
Zentrifuge Biofuge <i>fresco</i>	Kendro, Langenselbold
Zentrifuge Cytospin 2	Shandon, Großbritannien

1.4 Medien, Puffer und sonstige Lösungen

Für die Herstellung der folgenden Puffer und Lösungen wurde Wasser verwendet, das mit einer hauseigenen Wasseraufbereitungsanlage (*Milli-Q®-Reagent Grade Water System*, Schwalbach) aufbereitet wurde. Es wird nachfolgend als *Millipore®-Wasser* bezeichnet.

Medien für die Zellkultur

Kulturmedium für die Tumorzelllinien 23132/87, BXPC-3 und RPMI 2650

RPMI 1640 Medium

1 % (v/v) Glutamin

1 % (v/v) Penicillin/Streptomycin

10 % (v/v) FCS (Fötale Kälberserum/*Fetal Calf Serum*)

Vor Gebrauch auf 37 °C erwärmt

Inkubation bei 37 °C und 7 % CO₂

Kulturmedium für die normale nasale Epithelzelllinie HNEPc

Airway Epithelial Cell Growth Medium

Supplement Mix (bei der Lieferung inklusive)

1 % (v/v) Penicillin/Streptomycin

Vor Gebrauch auf 37 °C erwärmt

Inkubation bei 37 °C und 7 % CO₂

Kulturmedium für die Hybridomzelllinie 108/98-31-38

HyQ® ADCF-MAb™ Medium

1 % (v/v) Penicillin/Streptomycin

Vor Gebrauch auf 37 °C erwärmt

Inkubation bei 37 °C und 7 % CO₂

Einfrier-Medium

RPMI 1640

1 % (v/v) Glutamin

1 % (v/v) Penicillin/Streptomycin

20 % (v/v) FCS

10 % (v/v) DMSO (Dimethylsulfoxid, C₂H₆OS)

Häufig verwendete Puffer

Phosphate Buffered Saline (PBS)

0,137 M Natriumchlorid (NaCl)

0,027 M Kaliumchlorid (KCl)

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

0,015 M Kaliumdihydrogenphosphat (KH_2PO_4)

PBS/Tween

PBS

0,05 % (v/v) Tween 20

Sudanrot-Färbelösung

0,5 % (m/v) Sudan III (Sudanrot) in Isopropanol

Suspension 15 Minuten lang gerührt

Nach Zugabe von 40 % Millipore®-Wasser Reifung über Nacht

Kurz vor Gebrauch filtriert (Faltenfilter)

Lösungen für die Präparation von Zellextrakten

Hypotoner Puffer

20 mM HEPES pH 7.4 (4-(2-Hydroxyethyl)-piperazin-1-ethansulfonsäure, $\text{C}_8\text{H}_{18}\text{N}_2\text{O}_4\text{S}$)

3 mM KCl

3 mM Magnesiumchlorid (MgCl_2)

Vor Gebrauch frisch zugeben: Complete (Proteasen-Inhibitor-Cocktail)

Membranlysepuffer

50 mM HEPES pH 7.4

0,1 mM EDTA-Na (Natriummethylenediamintetraacetat-dihydrat, $\text{C}_{10}\text{H}_{14}\text{N}_2\text{O}_8\text{Na}_2 \times 2 \text{H}_2\text{O}$)

10 % (m/v) Glycerol 85 %

1 % (v/v) Triton X100

Vor Gebrauch frisch zugeben: Complete (Proteasen-Inhibitor-Cocktail)

Modifizierter Lysepuffer

50 mM Tris/HCl pH 7.4 (Tris(hydroxymethyl)-aminomethan, C₄H₁₁NO₃)

150 mM NaCl

1 % (v/v) Nonidet P-40 (Nonylphenyl-polyethylenglykol-Lösung)

0,25 % (m/v) Natriumdeoxycholat (C₂₄H₃₉NaO₄)

1 mM EDTA-Na

Vor dem Auffüllen auf das Endvolumen mit Salzsäure (HCl) pH 7.4 eingestellt.

Vor Gebrauch frisch zugeben: Complete (Proteasen-Inhibitor-Cocktail)

Lösungen zur Proteinquantifizierung

BCA Protein Assay

Reagenz A BCA™ Protein Assay Reagent A

Reagenz B 4 % (m/v) Kupfersulfat-pentahydrat (Cu₂SO₄ x 5 H₂O)

→ Reaktionslösung 50 Volumenteile Reagenz A und 1 Volumenteil Reagenz B
(unmittelbar vor Gebrauch hergestellt)

Lösungen für die SDS-PAGE

5-fach Gel-Ladepuffer (Auftragspuffer)

50 % (m/v) Glycerol 85 %

250 mM Tris/HCl pH 6.8

25 % (m/v) SDS (Natriumdodecylsulfat)

250 mM DTT (Dithiothreitol)

0,05 % (m/v) Bromphenolblau

Je nach Bedarf mit Millipore®-Wasser auf 1-fach bzw. 2-fach-Puffer eingestellt.

Sammelgelpuffer

0,5 M Tris/HCl, pH 6.8

0,4 % (m/v) SDS

Trenngelpuffer

1,5 M Tris/HCl, pH 8.8

0,4 % (m/v) SDS

Acrylamid 30 %/ Bisacrylamid 0,8 % (AA/Bis) als Fertiglösung von Roth (Rotiphorese 30)
100 % N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin (TEMED)
10 % (m/v) Ammoniumperoxodisulfat (APS)

Lämmli-Laufpuffer

25 mM Tris
250 mM Glycin
0,1 % (m/v) SDS

Geltrocknungspuffer

40 % (v/v) Methanol
10 % (m/v) Glycerol 85 %
7,5 % (v/v) Essigsäure

Lösungen für die Coomassie-Färbung

Färbelösung

0,4 % (m/v) Coumassie-Blau R 250
40 % (v/v) Ethanol (C₂H₅OH)
7 % (v/v) Essigsäure (C₂H₄O₂)

Fixier- und Entfärbelösung

25 % (v/v) Methanol (CH₃OH)
12,5 % (v/v) Essigsäure

Lösungen für die Silberfärbung (SilverSNAP® Stain Kit II)

Waschlösung: 10 % (v/v) Ethanol
Reduktionslösung: 50 µl *Sensitizer* in 25 ml Millipore-Wasser®
Färbelösung: 0,5 ml *Enhancer* in 25 ml Färbemittel (*Stain*)
Entwicklerlösung: 0,5 ml *Enhancer* in 25 ml Entwickler (*Developer*)
Stopplösung: 5 % (v/v) Essigsäure

Lösungen für den Western Blot

Transferpuffer

- 39 mM Glycin
- 48 mM Tris
- 0,037 % (m/v) SDS
- 20 % (v/v) Methanol

Blocklösung für die Immundetektion

- PBS/Tween, pH 7.4
- 5 % (m/v) Magermilchpulver

Lösungen für die Peroxidasedetektion

- SuperSignal[®] West Pico Chemiluminescent Substrate

Lösungen für die FPLC

Aufreinigung des SAM-6 Antigens

Puffer A

- 100 mM Tris
- 40 mM NaCl
- 2 mM EDTA-Na
- 1 % (v/v) Triton X100

Vor dem Auffüllen auf das Endvolumen mit Salzsäure (HCl) pH 7.4 eingestellt.

Puffer B

- 100 mM Tris
- 1 M NaCl
- 2 mM EDTA-Na
- 1 % (v/v) Triton X100

Vor dem Auffüllen auf das Endvolumen mit Salzsäure (HCl) pH 7.4 eingestellt.

Aufreinigung des SAM-6 Antikörpers

20 mM Phosphatpuffer, pH 5.9

Millipore®-Wasser vorlegen

Pro Liter Endvolumen 2,3 ml 85%ige Phosphorsäure (H₃PO₄) zugeben

Vor dem Auffüllen auf das Endvolumen mit Natronlauge (NaOH) pH 5.9 eingestellt.

20 mM Phosphatpuffer, pH 8.0

Millipore®-Wasser vorlegen

Pro Liter Endvolumen 2,3 ml 85%ige Phosphorsäure (H₃PO₄) zugeben

1 M NaCl darin lösen

Vor dem Auffüllen auf das Endvolumen mit Natronlauge (NaOH) pH 8.0 eingestellt.

Umpufferung im Rahmen der Fluoreszenzmarkierung

50 mM Carbonatpuffer, pH 9.2

Lösung A: 0,2 M Natriumcarbonat (Na₂CO₃)

Lösung B: 0,2 M Natriumhydrogencarbonat (NaHCO₃)

40 ml Lösung A plus 460 ml Lösung B

Ad 2 Liter mit Millipore®-Wasser

Reaktionspuffer für den enzymatischen Verdau mit Glykosidasen

PBS pH 7.4

1 % (v/v) Nonidet P-40

1 % (v/v) β-Mercaptoethanol

Lösungen für die isoelektrische Fokussierung

IEF-Denaturant

7,7 M ZOOM® Urea (Harnstoff, CH₄N₂O)

2,2 M ZOOM® Thiourea (Thioharnstoff, CH₄N₂S)

4,4 % (m/v) CHAPS (2-[(3-Cholamidopropyl)-dimethylammonio]-1-propansulfonat)

60 Minuten mit einem Mischbettionenaustauscher (Amberlite MB-50, Sigma) inkubiert

Überstand durch 0,2 µm PVDF-Membran filtriert

Anodenpuffer

8,4 g ZOOM® Urea

3,0 g ZOOM® Thiourea

3,3 ml Novex® IEF Anodenpuffer (50x)

7 ml Millipore®-Wasser

Mit 50x Anodenpuffer (Novex® IEF) auf pH 3.0 eingestellt

Ad 20 ml mit Millipore®-Wasser.

Vor Gebrauch mit Millipore®-Wasser 1:6 verdünnt

Kathodenpuffer

8,4 g ZOOM® Urea

3,0 g ZOOM® Thiourea

2,0 ml Novex® IEF Kathodenpuffer (10x), pH 3-10

Ad 20 ml mit Millipore®-Wasser

Lösungen für die Molekularbiologie

Tris-Borsäure-Puffer (TBE-Puffer)

45 mM Tris

45 mM Borsäure (H_3BO_3)

1 mM EDTA

1,5 % Agarose-Gel mit 1 µg/ml Ethidiumbromid

0,6 g Agarose

4 µl Ethidiumbromid-Lösung (10 mg/ml)

Ad 40 ml TBE-Puffer.

Lösungen für die FACS-Analyse

FACS-Puffer

PBS pH 7.4

0,05 % (m/v) Natriumazid (NaN_3)

Lösung durch 0,22 µm Nitrozellulosemembran filtriert

Lysepuffer für die Propidiumiodidfärbung

0,1 % (m/v) Natriumcitrat ($\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$)

0,1 % (v/v) Triton X100

Vor Gebrauch frisch zugeben: 50 µg/ml Propidiumiodid (Stammlösung 1 mg/ml)

100 µg/ml Ribonuklease A

Lösungen für die Immunhistochemie

Demaskierlösung

1 Volumenteil Demaskierlösung G

4 Volumenteile Millipore®-Wasser

Tris-NaCl

5 mM Tris

140 mM NaCl

Vor dem Auffüllen auf das Endvolumen mit Salzsäure (HCl) pH 7.4 eingestellt.

Blocklösung für die Immunperoxidase-Färbung der Zytospins

PBS, pH 7.4

4 % (m/v) Magermilchpulver

Blocklösung für die Immunperoxidase-Färbung der Paraffinschnitte

PBS, pH 7.4

0,5 % (v/v) BSA

DAB-Substratlösung

SigmaFAST™ DAB Tablets

Kurz vor Gebrauch in der vorgeschriebenen Menge Leitungswasser gelöst.

1.5 Patientenmaterial

Zur molekularbiologischen Untersuchung der Expression des SAM-6 Antigens wurde kryokonserviertes Patientenmaterial verwendet. Die klinischen Daten der Patienten sind in Tabelle 6 aufgeführt.

Tabelle 6: Klinische Daten der Gewebespende

Organ	Tumortyp	Tumorgrad*	Tumorstadium**	Alter	Geschlecht	Verwendetes Gewebe
Magen	Adenokarzinom	G3	T2N2MX	51	weiblich	Normal
Magen	Adenokarzinom	G2	T3N1MX	76	weiblich	Normal
Magen	Adenokarzinom	G3	T3N1MX	83	männlich	Tumor
Magen	Adenokarzinom	G4	T3N3M1	50	männlich	Tumor

*Die Bestimmung des Differenzierungsgrades (Tumorgrades) erfolgte nach Laurén [144].

**Die TNM-Einteilung (Tumorstadium) erfolgte nach der UICC-Klassifizierung (International Union Against Cancer) [145, 146].

1.6 Hard- und Software

Zur Analyse von DNA- und Aminosäuresequenzen wurde das Programm DNAMAN 5.2 (Lynnon BioSoft®, Quebec, Canada) eingesetzt, Homologievergleiche wurden mit Datenbanken des NCBI (National Center for Biotechnology Information, Heidelberg) und des EMBL (European Molecular Biology Laboratory, Bethesda, USA) durchgeführt.

Statistische Auswertungen und graphische Darstellungen erfolgten mit dem Programm EXCEL 2003, (Microsoft Corporation®, Redmond, USA). Abbildungen von Polyacrylamidgelen, Immunoblots und ethidiumbromidgefärbten Agarosegelen wurden mit Hilfe eines Scanners (HP psc1350, Hewlett Packard, Palo Alto, USA) im Durchlicht mit einer Auflösung von 300 dpi digitalisiert.

Immunhistochemische Abbildungen wurden mittels eines Olympus Mikroskops (Olympus Deutschland GmbH, Hamburg) und einer Sony Videokamera (Sony Corporation®, Tokio, Japan) über das Programm Image Access 3.02 (Image Access Computer GmbH, Wuppertal) erstellt.

FACS-Analysen wurden unter Verwendung der BD CellQuest Pro Software mit dem BD FACScan™ (BD Bioscience, San Jose, USA) durchgeführt. Die Auswertung der Daten

erfolgte mit der Software WinMDI 2.8 (Windows Multiple Document Interface, J. Trotter, The Scripps Institute, Flow Cytometry Core Facility, La Jolla, USA).

Immunfluoreszenz-Färbungen wurden mittels des konfokalen Systems aufgenommen, bestehend aus einem Leica UV-Mikroskop (Leica Microsystems AG, Wetzlar) und einem Innova[®] Ionen Laser-System (Coherent Inc., Santa Clara, USA).

Zur quantitativen Auswertung der Dot Blot-Analysen wurde die Graustufenintensität der detektierten Punkte mit dem Programm Adobe Photoshop Image VS 7.0 (Adobe Systems GmbH, München), ermittelt.

2 Methoden

2.1 Zellkultur

2.1.1 Kultivierung der Karzinomzelllinien

Die Anzucht der Tumorzelllinien erfolgte in RPMI 1640 Medium mit 10 % (v/v) FCS und den Supplementen L-Glutamin (20 mM) und Penicillin/Streptomycin (je 1 % (v/v)). Die Zellen wurden in Zellkulturflaschen bzw. Gewebekulturschalen bei 37 °C und einer CO₂-Konzentration von 7 % im Brutschrank herangezogen. Zur Subkultivierung wurden die adhärenen Zellen bei 70–80 % konfluentem Wachstum mit 5 ml Trypsin/EDTA-Lösung von den Zellkulturflaschen abgelöst, die Reaktion mit 10 ml Kulturmedium abgestoppt und die Zellen mit 400 x g für 5 min pelletiert. Das Zellpellet wurde in RPMI 1640 Medium mit Supplementen aufgenommen und entsprechend den in Tabelle 5 angegebenen Daten subkultiviert. Bevor die verschiedenen Zelllinien der Durchführung bestimmter Assays zugeführt wurden, wurden sie zweimal mit PBS oder mit RPMI 1640 gewaschen.

2.1.2 Kultivierung der nasalen Epithelzelllinie

Die Anzucht der normalen Epithelzelllinie erfolgte in Airway Epithelial Cell Growth Medium plus Supplement-Mix (12 ml) und Penicillin/Streptomycin (je 1 % (v/v)). Die Zellen wurden in Zellkulturflaschen bei 37 °C und einer CO₂-Konzentration von 7 % im Brutschrank herangezogen. Zur Subkultivierung wurden die adhärenen Zellen bei 70–80 % konfluentem Wachstum mit 5 ml Trypsin/EDTA-Lösung von den Zellkulturflaschen abgelöst, die Reaktion mit 5 ml Trypsin-Inhibitor (*Trypsin Neutralizing Solution from Soybean*) abgestoppt und die Zellen mit 400 x g für 5 min pelletiert. Das Zellpellet wurde in Kulturmedium mit Supplementen aufgenommen und entsprechend den in Tabelle 5 angegebenen Daten subkultiviert. Bevor die Zellen der Durchführung bestimmter Assays zugeführt wurden, wurden sie zweimal mit PBS oder mit Kulturmedium gewaschen.

2.1.3 Kultivierung von Hybridomzellen

Die Anzucht der den Antikörper SAM-6 produzierenden Hybridomzellen 108/98-31-38 erfolgte in serumfreiem HyQ[®] ADCF-MAb[™] Medium unter Zusatz von 1 % (v/v) Penicillin/Streptomycin. Die Zellen wurden in Zellkulturflaschen bei 37 °C und 7 % CO₂ im Brutschrank bis zu einer Zelldichte von 1 x 10⁸ Zellen pro Milliliter angezogen. Zur Subkultivierung wurden die Zellen in sterile Zentrifugenröhrchen überführt und bei 400 x g für

5 min pelletiert. Das Zellpellet wurde in Kulturmedium aufgenommen und $\frac{1}{5}$ der Hybridomzellen wurde für die weitere Kultivierung verwendet.

Die Kulturüberstände wurden gesammelt und die Konzentration an IgM-Antikörpern nephelometrisch bestimmt. Die Messungen wurden in einem Speziallabor der Neurologischen Klinik der Universität Würzburg durchgeführt. Die antikörperhaltigen Kulturüberstände wurden bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C gelagert. Die Hybridomzellen blieben im Durchschnitt 8 bis 10 Wochen in Kultur, bis die Antikörperproduktion geringer wurde.

2.1.4 Kryokonservierung eukaryotischer Zellen

Die einzufrierenden Zellen wurden abzentrifugiert und in kaltem Kulturmedium auf eine Konzentration von 5×10^6 Zellen/ml eingestellt. Zur Zellsuspension wurden nochmals 10 % (v/v) gekühltes FCS gegeben und, auf Eis und unter langsamen Tröpfeln 10 % DMSO (m/v) dazugegeben. Die Zellen wurden auf Kryoröhrchen verteilt (1 ml/Röhrchen; Nalgene 2 ml) und bei -80 °C eingefroren. Nach 2 Wochen wurden die eingefrorenen Zellen in einen Tank mit flüssigem Stickstoff überführt und bis zu ihrer erneuten Verwendung dort gelagert.

2.1.5 Auftauen eukaryotischer Zellen

Die Zellen wurden aus dem Stickstofftank entnommen und kurz im Wasserbad bei 37 °C aufgetaut. Die Zellsuspension wurde sofort nach dem Auftauen mit 10 ml Kulturmedium versetzt und 5 min bei $400 \times g$ zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt und das Zellpellet nach Resuspension in frischem Kulturmedium in eine Kulturflasche überführt. Frisch aufgetaute Zellen wurden mindestens eine Woche lang kultiviert und mehrmals subkultiviert bevor sie in einem Test verwendet wurden.

2.1.6 Zellzahlbestimmung

Die Bestimmung der Zelldichte erfolgte mikroskopisch mittels einer Neubauer-Zählkammer. Dazu wurde ein Aliquot der Zellsuspension im Verhältnis 1:10 mit einer 0,5%igen Lösung des Vitalfarbstoffes Trypanblau gemischt und in die Zählkammer pipettiert. Die Verdünnung wurde so gewählt, daß sich mindestens 12 und maximal 50 Zellen in einem Großquadranten befanden. Während lebende Zellen den Farbstoff nicht aufnehmen und unter dem Mikroskop hell erscheinen, sind tote Zellen nach Aufnahme des Farbstoffs tiefblau gefärbt. Unter dem Mikroskop (400-fache Vergrößerung) wurde die Lebendzellzahl in vier großen Quadranten ausgezählt und aus diesen der Mittelwert gebildet. Der Mittelwert wurde mit dem

Kammerfaktor 10^4 (Umrechnungsfaktor vom Volumen der Zählkammer pro Großquadrat (0,1 μl) auf 1 ml Suspensionsvolumen) sowie mit dem Verdünnungsfaktor 10^1 multipliziert. Der erhaltene Wert stellt die Anzahl an lebenden Zellen pro ml Zellsuspension dar. Die Gesamtzellzahl wurde nach folgender Formel berechnet:

Formel 1:

$$\text{Zellzahl} = \text{Mittelwert} \times \text{Kammerfaktor} \times \text{Verdünnungsfaktor} \times \text{Ausgangsvolumen [ml]}.$$

2.2 Zellbiologische Methoden

2.2.1 Transfektion von Tumorzellen mit siRNA

Zur Validierung des SAM-6 Targets wurde die Methode der RNA Interferenz gewählt. Hierbei induziert doppelsträngige RNA, die aus 21-23 Nukleotiden besteht, den Abbau einer definierten Ziel-mRNA, woraus eine Herabregulierung der Proteinexpression resultiert. Die Oligonukleotid-Bruchstücke werden in die Zelle eingeschleust und interagieren dort mit dem sog. RISC (*RNA Induced Silencing Complex*). Daraufhin zerschneidet der Komplex die mRNA, die dem Antisense-Strang des eingeschleusten Bruchstücks komplementär ist. Es kommt zum Abbau der Ziel-RNA und letztendlich zur Hemmung der Proteinexpression des Zielmoleküls [147].

Adhärente Tumorzellen (BXPC-3) wurden mittels Lipofektion mit siRNA (*Small Interfering RNA*) transfiziert. Einen Tag vor der Transfektion wurden in einer 24er Zellkulturplatte je Ansatz $4,5 \times 10^4$ Zellen in 1 ml Kulturmedium ausgesät und über Nacht bei 37 °C und 7 % CO_2 inkubiert. Nach Erreichen einer Konfluenz von ca. 50 % wurden die Zellen mit siLentFect™ gemäß den Angaben des Herstellers transfiziert. Kurz vor dem Transfektionsvorgang wurde das verbrauchte Kulturmedium vorsichtig abgesaugt und mit frischem RPMI 1640 (plus Supplementen) ersetzt, wobei je Ansatz 0,4 ml frisches Medium zu den Zellen gegeben wurde. Im Anschluß wurde für jede Probe 100 μl der Transfektionsmischung hergestellt. Die Mischung setzte sich aus 49 μl serumfreien OptiMEM Medium, 1 μl siLentFect™ und 50 μl einer geeigneten Verdünnung von siRNA in OptiMEM zusammen und wurde in drei Schritten hergestellt: Zuerst wurde eine 2 μM Stammlösung der jeweiligen siRNA mit dem gleichen Volumen des serumfreien Mediums OptiMEM versetzt, mit der Pipette gut gemischt und 5 Minuten bei Raumtemperatur stehen gelassen. Als zweites wurden pro Probe 1 μl des Transfektionsreagens siLentFect™ in 49 μl des serumfreien OptiMEM Mediums gemischt und ebenfalls fünf Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Im dritten Schritt wurden die beiden Mischungen vereint, vorsichtig gemischt und

für 20 Minuten bei Raumtemperatur stehen gelassen. Danach wurden die Transfektionsmischung zu den Zellen pipettiert, durch vorsichtiges wippen gemischt und über einen Zeitraum von ein bis drei Tagen im Brutschrank bei 37 °C und 7 % CO₂ inkubiert. Die jeweilige siRNA lag in einer Endkonzentration von 20-30 nM vor (siehe Tabelle 7). Einen Tag nach der Transfektion wurde bei jedem Ansatz das Medium gewechselt, um transfektionsbedingte Nebeneffekte zu minimieren. Zusätzlich wurden Kontrollen durchgeführt: Nicht-spezifische Effekte auf die Genexpression der Zellen, die durch den Eintritt der siRNA verursacht werden können, wurden mit *Silencer*TM Negative Control siRNA kontrolliert. Hier handelt es sich um eine siRNA, die RISC nicht aktiviert. Als weitere Kontrollen wurden bei jedem Versuch unbehandelte Zellen und mock-transfizierte Zellen mit angesetzt. Bei der Mock-Transfektion wurden alle Bestandteile außer siRNA zu den Zellen gegeben, um zytotoxische Effekte durch das Transfektionsreagenz auszuschließen. Unbehandelte Zellen wurden ohne siRNA und ohne Transfektionsreagenz kultiviert. Um die Aufnahme der siRNA zu verfolgen, wurde *Silencer*TM CyTM3-konjugierte GAPDH siRNA benutzt und über konfokale Mikroskopie sichtbar gemacht. Die Auswirkungen der Transfektion auf die Expression der Zielmoleküle an der Zelloberfläche wurden über einen Zeitraum von drei Tagen mittels FACS-Analyse untersucht (siehe 2.5.1.1).

Small Interfering RNA (siRNA)

Die für die Transfektion verwendeten siRNAs wurden über Ambion oder Dharmacon bezogen. Dort werden über Datenbanken validierte siRNAs angeboten, die eine Herabregulierung des Zielproteins garantieren.

Tabelle 7: Konzentrationen der für die Transfektion verwendeten Oligonukleotide

siRNA gerichtet gegen die Expression von	Endkonzentration je siRNA [nM]
Human HSPA5 (GRP78)*	25
Human LDLR*	25
Human TRA1 (GP96)	20
Kontroll-siRNA	
Human GAPDH, Cy3	30
Negativ-Kontrolle	20-30

*Pool bestehend aus 4 validierten siRNAs

2.2.2 MTT-Proliferationstest

Der Einfluß des Antikörpers auf die Proliferation verschiedener Zelllinien bzw. verschieden transfizierter Zellen wurde mit Hilfe eines kolorimetrischen Tests, dem MTT-Proliferationstest, untersucht [148, 149]. Hier handelt es sich um einen quantitativen Test, der lebende Zellen durch ihre mitochondriale Stoffwechselaktivität nachweist und somit auf die Überlebensrate der mit Antikörper SAM-6 behandelten Zellen bzw. auf antiproliferative Effekte des SAM-6 Antikörpers schließen läßt.

Vitale Zellen wandeln in einer NADH-abhängigen Reaktion gelbes Methyltetrazoliumsalz (MTT, 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid) zu einem violetten Formazanfarbstoff um, wobei das Ausmaß der Farbvertiefung quantitativ mittels Spektrometrie erfaßt wird. Farbintensität und Vitalität sind einander direkt proportional, da die enzymatische Reduktion des Tetrazoliums (MTT-Reagenz) nur über aktive Dehydrogenasen (Reduktasen) stoffwechselaktiver Mitochondrien ablaufen kann. Somit weist der Test ausschließlich lebende, proliferierende Zellen nach.

Zur Durchführung des Testes wurden die zu untersuchenden Zellen auf eine Zelldichte von 1×10^6 Zellen pro ml Zellsuspension eingestellt. Für jede Inkubationszeit wurde eine 96er Lochplatte mit einer Zellzahl von 5×10^4 Zellen pro Loch angesetzt, was je $50 \mu\text{l}$ der eingestellten Zellsuspension pro Vertiefung entspricht. Der zu testende Antikörper SAM-6 und die entsprechende Isotypkontrolle Chrompure IgM wurden auf eine Konzentration von $200 \mu\text{g/ml}$ eingestellt. Als weitere Kontrollen dienten normales Kulturmedium, um das Wachstum der Zellen unter normalen Bedingungen zu beobachten, und verbrauchtes Kulturmedium, um sicherzustellen, dass ein eventuell beobachteter Hemmeffekt nicht aus Mangel an Nährstoffen auftrat. Von den entsprechenden Lösungen werden $50 \mu\text{l}$ zu den Zellen gegeben, so dass die Antikörper in einer Endkonzentration von $100 \mu\text{g/ml}$ vorlagen. Jeder Ansatz wurde in 4-Fachbestimmungen durchgeführt. Die Platten wurden für 24 oder 48 Stunden bei $37 \text{ }^\circ\text{C}$ und 7 \% CO_2 im Brutschrank inkubiert. Pro Loch wurden $50 \mu\text{l}$ einer MTT-Lösung ($5 \text{ g MTT pro ml PBS}$) zugegeben und erneut für 30 Minuten im Brutschrank inkubiert. Danach wurden die Zellkulturplatten 10 Minuten bei $1490 \times \text{g}$ zentrifugiert und der Überstand vorsichtig aus den einzelnen Löchern abgesaugt. Zellen, die nun kristallin ausgefallenes violettes Formazan enthielten, blieben am Plattenboden haften und wurden in $150 \mu\text{l}$ DMSO (Dimethylsulfoxid) vorsichtig lysiert, der Farbstoff freigesetzt und solubilisiert. Die Farbintensität der entstandenen Lösung wurde im ELISA-Microplate-Reader bestimmt. Als Nullwert (Hintergrundkontrolle) diente ein Ansatz, der die jeweiligen Lösungen und Medium jedoch keine Zellen enthielt. Die Absorption wurde bei einer Meßwellenlänge von 540 nm und der Referenzwellenlänge von 690 nm gemessen. Die Differenz der beiden Absorptionen ($A_{540-690}$) spiegelte die antikörperinduzierte Stimulation oder Hemmung des

Zellwachstums wider. Der prozentuale Anteil apoptotischer Zellen wurde nach folgender Formel bestimmt:

Formel 2:

$$\text{Anteil apoptot. Zellen [\%]} = 1 - \frac{A_{540-690} \text{ nach Inkubation mit Antikörper}}{A_{540-690} \text{ nach Inkubation in Kulturmedium}} \times 100 \text{ \%}.$$

2.2.3 Apoptose-Test (Cell Death Detection ELISA^{PLUS})

Das Ausmaß der Apoptose-Induktion des SAM-6 Antikörpers auf Tumorzelllinien bzw. auf transfizierte Tumorzellen wurde mit Hilfe des Cell Death Detection ELISA^{PLUS} analysiert. Dieser Test basiert auf dem Prinzip eines quantitativen Sandwich-Enzym-Immunoassays, bei dem peroxidasekonjugierte murine monoklonale Antikörper eingesetzt werden. Diese Antikörper sind gegen Histon- bzw. DNA-Komponenten von Mono- und Oligonukleosomen gerichtet, die beim Vorgang der Apoptose entstehen. Nach enzymatischer Umsetzung eines farblosen Substrates kann anhand der Farbtintensität des Reaktionsproduktes die Menge der vorhandenen Nukleosomen und damit die relative Anzahl apoptotischer Zellen photometrisch bestimmt werden.

Hierzu wurde für jede Inkubationszeit eine 96-Loch Zellkulturplatte angesetzt und in jedes Loch 100 µl mit 1×10^4 Zellen pipettiert. Die Zellen wurden anschließend mit SAM-6 Antikörper oder der Isotyp-Kontrolle Chrompure IgM versetzt und für 3 und 24 Stunden im Brutschrank bei 37 °C und 7 % CO₂ inkubiert. Die Verdünnungen für die jeweiligen Antikörper lagen in einer Konzentration von jeweils 200 µg/ml vor, woraus sich nach Zugabe von jeweils 100 µl eine Endkonzentration von 100 µg/ml pro Loch ergab. Um als weitere Kontrolle normales Zellwachstum zu demonstrieren, wurden Zellen mit der gleichen Menge an frischem Kulturmedium versetzt. Jeder Ansatz lag in doppelter Ausführung vor. Die weitere Durchführung des Versuchs erfolgte nach den Angaben des Herstellers (Handbuch: Cell Death Detection ELISA^{PLUS}, Roche Diagnostics) unter Verwendung der mitgelieferten Reagenzien und Pufferlösungen.

Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden die Zellen 10 min bei 200 x g zentrifugiert, der Überstand abgesaugt und 200 µl des Lysepuffers hinzugegeben, wodurch in den folgenden 30 min bei Raumtemperatur die Lyse der Zellen erfolgte. Nach erneutem Zentrifugieren wurden jeweils 20 µl des Überstandes in streptavidinbeschichtete Mikrotiterplatten übertragen, bevor 80 µl des Immunreagenz ($1/_{20}$ Anti-DNA-POD, $1/_{20}$ Anti-Histon-Biotin, $18/_{20}$ Inkubationspuffer) zupipettiert wurden. Zusätzlich wurden eine im Test-Kit enthaltene Positivkontrolle und ein Leerprobe (Blank) mitgeführt. Nachdem die Platten 2 Stunden auf

dem vertikalen Rüttler bei ca. 250 μm durchmischt worden waren, wurden nach dreimaligem Waschen mit Inkubationspuffer (250 μl /Loch) 100 μl Substrat (1 ABTS-Tablette in 5 ml Substratpuffer) in jedes Loch pipettiert und nochmals durchmischt. Es entwickelte sich eine intensiv grüne Farbe, deren Stärkegrad auf die Intensität der antikörperinduzierten Apoptose schließen ließ. Die Farbentwicklung erfolgte über 15 Minuten bei Raumtemperatur und wurde durch Zugabe von 100 μl Stopplösung beendet. Die Platte wurde sofort bei einer Meßwellenlänge von 405 nm gegen die Referenzwellenlänge von 490 nm im *ELISA-Microplate-Reader* vermessen und der prozentuale Anteil apoptotischer Zellen nach folgender Formel bestimmt:

Formel 3:

$$\text{Anteil apoptot. Zellen [\%]} = 1 - \frac{A_{405-490} \text{ nach Inkubation mit Antikörper}}{A_{405-490} \text{ nach Inkubation in Kulturmedium}} \times 100 \%$$

2.2.4 Cytochrom C-ELISA

Um den Mechanismus der durch den Antikörper SAM-6-induzierten Apoptose näher zu charakterisieren, wurde die SAM-6-abhängige, mitochondriale Freisetzung von Cytochrom C ins Zytoplasma untersucht. Mitochondrien gelten als zentrale Regulationsstelle des intrinsischen Signalwegs der Apoptose-Induktion [150]. Die Freisetzung von Cytochrom C ins Zytoplasma initiiert die Bildung des sog. Apoptosoms, wodurch eine Caspasenkaskade aktiviert wird, die letztendlich zur Apoptose der Zelle führt.

Hierbei wurde ein Cytochrom C ELISA Kit verwendet, wobei der ELISA auf der Sandwich-Technik basiert. Als Primärantikörper befand sich bereits vorbeschichtet ein monoklonaler Antikörper spezifisch gegen Cytochrom C auf der ELISA-Platte. Der im Kit bereitgestellte Sekundärantikörper war ebenfalls spezifisch gegen Cytochrom C gerichtet und mit einem Enzym für die Substratumsetzung markiert. Standard und Proben wurden unter Verwendung der mitgelieferten Reagenzien und Lösungen wie vom Hersteller empfohlen vorbereitet (Handbuch: *Cytochrom C ELISA*, Calbiochem) und in die vorbeschichtete Platte pipettiert. Bei Cytochrom C-haltigen Proben kam es zur Bindung von Primär- und Sekundärantikörper und somit zur Umsetzung des Farbsubstrats.

Im Rahmen der Probenvorbereitung wurden $1,5 \times 10^6$ Tumorzellen (23123/87 oder BXPC-3) mit 100 $\mu\text{g/ml}$ SAM-6 Antikörper oder Kontroll-IgM (Chrompure IgM) über einen Zeitraum von 1 bis 12 Stunden im Brutschrank bei 37 °C und 7 % CO₂ inkubiert. Nach der jeweiligen Inkubationszeit wurden die Zellen mit Trypsin/EDTA von der Zellkulturplatte gelöst, dreimal mit kaltem PBS gewaschen und anschließend mit Lysepuffer resuspendiert. Nach 1-stündiger Inkubation auf dem Rüttler wurden die Proben im Verhältnis 1:10 mit Calibrator

Diluent RD5P verdünnt und 100 µl der verdünnten Probelösung in die vorbeschichtete Platte pipettiert. Nach weiteren zwei Stunden Inkubationszeit wurden nicht gebundene Bestandteile mit je 200 µl Waschpuffer entfernt und nach Zugabe von 100 µl des Cytochrom C-Konjugats für weitere zwei Stunden inkubiert. Anschließend wurde die frisch hergestellte Substratlösung (1:1 Mischung aus Farbreagenz A und B) mit je 100 µl pro Vertiefung dazugegeben und nochmals 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Die Farbreaktion wurde mit 100 µl Stopplösung beendet und die Platte bei 415 nm photometrisch vermessen. Die Intensität der Farbe spiegelte die Menge an freigesetzten Cytochrom C wider.

2.2.5 Test auf Caspasen-Aktivierung

Um zu analysieren, ob die Caspasen 6 und/oder 9 bei der SAM-6-induzierten Apoptose aktiviert werden, wurden kolorimetrische Aktivitätstests verwendet. Hierbei kamen Chromophore zum Einsatz, die an für die jeweiligen Caspasen spezifische Peptidsequenzen gekoppelt wurden. Spalteten freigesetzte Caspasen die Sequenz ab, kam es zu einer aktivitätsabhängigen Farbvertiefung, die photometrisch quantifiziert wurde.

Die im Folgenden beschriebenen Tests wurden gemäß den Angaben des Herstellers (Handbuch: *Caspase 9* bzw. *Caspase 6 Assay Kit, Colorimetric*, Calbiochem) unter Verwendung der mitgelieferten Puffer und Reagenzien durchgeführt. Beide Tests wurden nach dem gleichem Schema durchgeführt und unterschieden sich lediglich in der für die jeweilige Caspase spezifische Substratlösung.

3×10^6 Tumorzellen wurden mit unterschiedlichen Konzentrationen an SAM-6 Antikörper bzw. Kontroll-IgM (Chrompure IgM) versetzt und inkubiert. Jede Konzentration wurde für mehrere Zeiten angesetzt. Als Negativ-Kontrolle dienten jeweils nicht stimulierte Zellen in Kulturmedium. Nach der jeweiligen Inkubationszeit wurden 2×10^6 Zellen mit 50 µl Lysepuffer versetzt. Nach 10-minütiger Inkubation wurden die lysierten Zellen bei $10.000 \times g$ eine Minute lang kurz abzentrifugiert. Der Überstand, der dem zytosolischen Extrakt entspricht, wurde sofort abgenommen und im frischen Eppendorfgesäß bis zur weiteren Verwendung auf Eis gestellt. Das Zellpellet wurde verworfen. Mittels der BCA-Methode wurde der Proteingehalt jedes Extraktes bestimmt (siehe 2.3.2) und mit Lysepuffer ein Gehalt von jeweils 200 µg Protein pro 100 µl Extrakt eingestellt. Je 50 µl der verdünnten Proben wurden auf eine 96-Loch-Platte verteilt und jeweils 50 µl 2x-Reaktionspuffer, der 10 mM DTT enthielt, zupipettiert. Als Hintergrundkontrolle (*Background, BG*) diente eine Probe aus Lyse- und 2x-Reaktionspuffer (1:1). Jede Probe der Mikrotiterplatte wurde mit 5 µl der im jeweiligen Kit enthaltenen 4 mM Substratlösung versetzt. Die Platte wurde für zwei Stunden im Brutschrank bei 37 °C und 7 % CO₂ inkubiert und anschließend im ELISA-

Reader bei 415 nm photometrisch vermessen. Die Intensität der Farbentwicklung korrelierte mit der Höhe der Enzymaktivität.

Caspase 9 (Initiatorcaspase)

Zur Bestimmung der SAM-6-induzierten Aktivität von Caspase 9 wurde ein kolorimetrischer Caspase 9 Assay verwendet. Die Initiatorcaspase spaltet spezifisch die Aminosäuresequenz LEHD, die in der Substratlösung gekoppelt an p-Nitroanilin (LEHD-pNA) vorlag. Nach der Spaltung lag freies p-Nitroanilin vor, das bei 415 nm photometrisch vermessen wurde.

Caspase 6 (Effektorcaspase)

Um die SAM-6-abhängige Aktivität von Caspase 6, einer Effektorcaspase zu untersuchen, wurde ein kolorimetrischer Caspase 6 Assay durchgeführt. Caspase 6 spaltet spezifisch die Aminosäuresequenz VEID, die in der Substratlösung gekoppelt an p-Nitroanilin (VEID-pNA) vorlag. Nach der Spaltung freigesetztes p-Nitroanilin wurde bei 415 nm photometrisch quantifiziert.

2.2.6 Färbung mit Sudanrot

Um antikörperabhängige Lipideinlagerungen genauer zu charakterisieren, wurden intrazelluläre Lipide mit Sudanrot (Sudan III) sichtbar gemacht. Der Azofarbstoff löst sich in Fetten und fetten Ölen (Neutralfetten) und färbt diese dabei rötlich. Hierzu wurden $1,5 \times 10^5$ Karzinomzellen (BXPC-3) auf Objektträger aufgebracht und unter Standardbedingungen kultiviert. Die Zellen wurden für 48 Stunden mit SAM-6 (50 µg/ml) oder Anti GRP78 (ET-21, 50 µg/ml) bzw. deren Isotypkontrollen inkubiert. Als Negativkontrolle diente ein Ansatz, der nur Zellen mit Kulturmedium enthielt. Nach der Inkubationszeit wurden die Objektträger zweimal mit PBS gewaschen und 5 Minuten lang mit 60 % (v/v) Isopropanol fixiert. Bereits am Vortag wurde eine Sudan III-Färbelösung hergestellt, mit der die Zellen nach der Fixierung 40 Minuten lang inkubiert wurden. Anschließend wurde mit Millipore®-Wasser gewaschen und für 6 Minuten mit Mayers Hämalaun gegengefärbt. Im letzten Schritt wurden die Objektträger 10 Minuten lang gewässert und mit Glycerolgelatine eingedeckt.

2.2.7 Ectodomain Shedding transmembranärer Proteine

Ectodomain Shedding beschreibt ein Phänomen, bei dem die extrazelluläre Domäne membrangebundener Proteine enzymatisch von der Zelloberfläche abgespalten und in die perizelluläre Umgebung oder Körperfluids abgegeben wird. Die freigesetzten Ectodomänen

weisen im Vergleich zu deren verankerten Proteinform meist veränderte biologische Eigenschaften auf [151, 152].

Die Zelloberfläche kann als dynamische Plattform betrachtet werden, die konstant und kontinuierlich das Repertoire an exprimierten Proteinen verändern kann [153]. Der Mechanismus des *Ectodomain Shedding* ermöglicht der Zelle, in kürzester Zeit auf Veränderungen in deren zellulären Umgebung zu reagieren und den Bedarf an regulatorischen Proteinen und Rezeptoren (z.B. Wachstumsfaktoren und Adhäsionsmoleküle) auf der Zelloberfläche anzupassen oder gleichzeitig lösliche interzelluläre Regulatoren (z.B. Zytokine) freizusetzen [154]. Vor allem unter pathophysiologischen Umständen werden endogene Reize freigesetzt, die durch die Aktivierung der verantwortlichen Enzyme den Vorgang der Abspaltung induzieren und gleichzeitig mit der Entstehung von Tumoren und Metastasen in Verbindung gebracht werden [154]. Deshalb war auch im Rahmen dieser Arbeit interessant, ob sich das Zielantigen des SAM-6 Antikörpers durch den Einsatz verschiedener *Shedding*-Reagenzien von der Oberfläche der Tumorzellen abspalten lässt (Tabelle 8).

Tabelle 8: *Shedding*-Induktoren

Induktor	Endkonzentration
Wasserstoffperoxid (H ₂ O ₂ ; Merck, Darmstadt)	1 x 10 ⁻³ M
12-Phorbol-13-myristat in DMSO (PMA; Sigma, Taufkirchen)	1 x 10 ⁻⁸ M
Lipopolysaccharid (LPS, <i>E. coli</i> ; Sigma, Taufkirchen)	1 µg/ml

Pro Ansatz wurden 5 x 10⁴ Zellen (BXPC-3) pro 2 ml Kulturmedium (plus Supplemente) ausgesät und bis zur 80%igen Konfluenz bei 37 °C und 7 % CO₂ inkubiert. Das verbrauchte Kulturmedium wurde vorsichtig durch serumfreies Kulturmedium (RPMI 1640, 1 % (v/v) Glutamin, 1 % (v/v) Penicillin/Streptomycin) ersetzt und die Zellen nach Zugabe der folgenden *Shedding*-Reagenzien 2 und 24 Stunden lang bei 37 °C inkubiert:

Als Negativkontrolle dienten unbehandelte Zellen bzw. Zellen, die mit 0,07 % (v/v) DMSO inkubiert wurden. Die Viabilität der Zellen wurde nach Ende der jeweiligen Behandlung nach Färbung mit Trypanblau unter dem Lichtmikroskop beurteilt. Der Einfluss der Induktoren auf die Antigendichte des Zielmoleküls auf der Zelloberfläche wurde mit Hilfe der FACS-Analyse (siehe 2.5.1.1) detektiert. Um gleichzeitig die Freisetzung des Zielmoleküls in den extrazellulären Raum zu untersuchen, wurden die jeweiligen Zellüberstände über die Dot-Blot-Analyse und anschließender Immundetektion über die Intensität der detektierbaren Punkte quantitativ ausgewertet (siehe 2.3.7).

2.3 Proteinbiochemische Methoden

2.3.1 Präparation von Membranproteinen aus Tumorzellen

2.3.1.1 Fraktionierte Zentrifugation (Differentialzentrifugation)

Die Karzinomzelllinien 23132/87 und BXPC-3 wurden auf je 20 Gewebekulturplatten (150 mm) bis zur Konfluenz angezogen. Die Zellen wurden zweimal mit kaltem PBS gewaschen, anschließend mit einem Zellschaber von den Platten gelöst und in Zentrifugenröhrchen überführt. Die Zellen wurden bei 425 x g für 5 min pelletiert und in 20 ml hypotonem Puffer resuspendiert. Die Zellsuspension wurde für 15 min auf Eis inkubiert, um die Zellen durch den in der Suspension vorherrschenden osmotischen Druck aufquellen zu lassen. Das Aufbrechen der Zellen erfolgte im Sonifikator durch Ultraschall für 5 min in 0,7 Sekundenintervallen und maximaler Intensität. Anschließend wurde die Zellsuspension bei 10.000 x g für 15 min zentrifugiert, um die Zellkerne aus dem Lysat zu entfernen. Das Zellpellet wurde verworfen und der erhaltene Überstand in 4 ml Ultrazentrifugenröhrchen (Beckmann) überführt. Membrangebundene Proteine wurden nun durch Ultrazentrifugation bei 100.000 x g für 45 min in einem SW55-Rotor (Beckmann) von den löslichen Proteinen abgetrennt. Der lösliche Überstand wurde verworfen, das Membranpellet zweimal mit 5 ml hypotonen Puffer gewaschen und anschließend bei RT getrocknet. Zur endgültigen Extraktion der Membranproteine, wurden die mikrosomalen Pellets jeweils in 1 ml Membranlysepuffer oder in modifiziertem Lysepuffer resuspendiert. Nicht gelöste Bestandteile wurden für 10 min bei 10.000 x g abzentrifugiert und der Membranextrakt bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C gelagert. Alle Arbeits- und Zentrifugationsschritte wurden bei 4 °C oder auf Eis durchgeführt.

2.3.1.2 ProteoExtract™ Native Membrane Protein Extraction Kit

Um native (funktionell aktive) Membranproteine bzw. membranassoziierte Proteine selektiv anreichern zu können, wurde das *ProteoExtract™ Native Membrane Protein Extraction Kit* (im Folgenden als *ProteoExtract™-Methode* bezeichnet) verwendet. Die zweistufige Extraktion der Membranproteine wurde gemäß den Angaben des Herstellers (Handbuch: ProteoExtract™ Native Membrane Protein Extraction Kit, Calbiochem) durchgeführt. Das Kit beinhaltete alle nötigen Reagenzien, einschließlich Waschpuffer und Protease-Inhibitoren. Für die Extraktion wurden die Karzinomzelllinien 23132/87 oder BXPC-3 auf 20 Gewebekulturplatten (150 mm) bis zur Konfluenz angezogen. Die Zellen wurden einmal mit kaltem PBS gewaschen, mit einem Zellschaber von den Platten gelöst und anschließend in einem Zentrifugenröhrchen bei 300 x g für 10 min pelletiert. Das Zellpellet wurde zweimal

in jeweils 4 ml eiskaltem Waschpuffer resuspendiert und jeweils bei 300 x g für 10 min wieder abzentrifugiert. Die Überstände wurden vollständig abgenommen und verworfen. Die gewaschenen Zellen (Pellet 1) wurden mit der Pipette vorsichtig in 4 ml eiskaltem Extraktionspuffer I, dem kurz zuvor 20 µl des Protease-Inhibitor-Cocktails zugegeben wurde, resuspendiert und auf dem vertikalen Rüttler inkubiert. Nach 10 Minuten wurde unlösliches Material bei 16.000 x g 15 Minuten lang abzentrifugiert. Der Überstand, der die lösliche Proteinfraction enthielt wurde sorgfältig abgetrennt und ein Aliquot zu Kontrollzwecken bei -20 °C eingelagert. Das Pellet (Pellet 2) wurde sofort in 2 ml eiskaltem Extraktionspuffer II (plus 10 µl Protease-Inhibitor-Cocktail) resuspendiert und weitere 30 Minuten auf dem vertikalen Rüttler inkubiert. Unlösliches Material wurde durch eine 15-minütige Zentrifugation bei 16.000 x g abzentrifugiert und nach Abnahme des Überstandes verworfen. Der Überstand beinhaltete nun die Membranfraktion, angereichert mit integralen und membranassoziierten Proteinen, und wurde bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C gelagert. Alle Arbeits- und Zentrifugationsschritte wurden bei 4 °C oder auf Eis durchgeführt.

2.3.2 Bestimmung der Proteinkonzentration mittels Bicinchoninsäure (BCA)

Zur Quantifizierung von Proteinkonzentrationen wurde stets die BCA-Methode gewählt, um Störungen durch bei der Membranextraktion verwendete Detergenzien zu vermeiden [155]. Die BCA-Methode hat anderen Proteinbestimmungen gegenüber den Vorteil, daß sich bei dieser Methode auch in Gegenwart von Detergenzien (bis zu 5 %) der Proteingehalt zuverlässig quantifizieren lässt. Der Nachweis beruht auf der Bildung eines violettfarbenen Chelatkomplexes aus zwei Molekülen Bicinchoninsäure (2,2'-Bichinolin-4,4'-dicarbonsäure, BCA) und einem Molekül einwertigem Kupfer. Der Komplexbildung geht die Reduktion des zweiwertigen (Cu^{2+}) zu einwertigem (Cu^{1+}) Kupfer voraus, welches im alkalischen Milieu in Gegenwart von Peptidbindungen und cystein-, tyrosin- oder thryptophanhaltigen Peptiden entsteht [156]. Das Absorptionsmaximum des Farbkomplexes liegt bei 562 nm.

Bei jeder Bestimmung wurde eine aus mindestens fünf Werten bestehende Standardkurve angefertigt, wobei Lösungen mit verschiedenen Konzentrationen an Rinderserumalbumin (BSA) im entsprechenden Arbeitspuffer (Lysepuffer oder Membranlysepuffer) als Proteinstandards dienten. In einer 1 ml Küvette wurde 1 Volumenteil der Proben- oder Kalibrierlösungen bzw. des Arbeitspuffer (Leerwert) mit 20 Volumenteilen der Reaktionslösung versetzt und vorsichtig gemischt. Die Mischung wurde 30 min bei 37 °C inkubiert und nach dem Abkühlen die Absorption bei 562 nm gegen die Leerprobe (Nullabgleich) bestimmt. Mit Hilfe der ermittelten Kalibriergeraden wurde der Proteingehalt der jeweiligen Lösung über lineare Regression errechnet. Die einzelnen Werte wurden dabei mindestens doppelt bestimmt. Die Auswertung der Kurve erfolgte mittels eines auf EXCEL

basierenden Analyseprogramms. Die Reaktionslösung setzte sich aus 50 Teilen einer alkalischen BCA-Lösung (Reagenz A) und 1 Teil einer 4%igen Kupfersulfatlösung (Reagenz B) zusammen und wurde kurz vor Gebrauch frisch hergestellt.

2.3.3 Präzipitation von Proteinen für die Gelelektrophorese

Zum Ausfällen von Proteinen aus einer Lösung wurde 1 Volumenteil der Lösung mit 2½ Volumenteilen Aceton versetzt und über Nacht bei -20 °C ausgefällt. Das Präzipitat wurde bei 4 °C und 10.000 x g 20 min lang abzentrifugiert. Das Pellet wurde bei Raumtemperatur getrocknet, für in Auftragspuffer gelöst und die Proteine wie unter 2.3.4 beschrieben aufgetrennt.

2.3.4 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die elektrophoretische Auftrennung von Proteinen und Lipoproteinen erfolgte durch vertikale Flachgelelektrophorese auf 1,0 mm dicken Acrylamidgelen. Um die Trennung der Proteine unabhängig vom Ladungszustand zu gestalten, wurde den Proben und Gelen Natriumdodecylsulfat (*Sodium Dodecyl Sulfate*, SDS) zugesetzt. SDS verleiht den Proteinen eine gleichmäßige negative Ladung, sodass deren Wanderungsgeschwindigkeit und somit die Trennung von der Ladung unabhängig und ausschließlich nach der Molekülgröße erfolgte. Die SDS-PAGE wurde nach der von Laemmli veröffentlichten Methode durchgeführt [157]. Je nach gewünschter Auftrennung wurden 8 bzw. 10%ige (v/v) Acrylamidgele gemäß der von Sambrook et al. beschriebenen Zusammensetzung hergestellt [158]. Die aufzutrennenden Proteinlösungen wurden je nach vorliegender Konzentration im 5xGel-Ladepuffer aufgenommen und die Proben 5 Minuten lang bei 95 °C erhitzt. Dabei wurden die Proteine denaturiert, mit SDS beladen, und durch DTT vorhandene Disulfidbrücken reduziert. Nachdem die Gele in die mit Laufpuffer gefüllte Elektrophoresekammer eingespannt worden waren, wurden je 20 µl der vorbereiteten Proben in die Geltaschen pipettiert (zwischen 8 und 20 µg Gesamtproteingehalt pro Geltasche). Um das Molekulargewicht der getrennten Proteine einordnen zu können, wurden in eine Tasche 5 µl des Proteinmarkers peqGOLD II (Trennbereich: 10 bis 200 kD) aufgetragen. Die Proteine wurden bei einer konstanten Stromstärke von 20 mA pro Gel für ca. 1,5 h von einander getrennt und anschließend mittels Coomassie-Färbung oder Western Blot detektiert.

2.3.5 Färben von Polyacrylamidgelen

2.3.5.1 Coomassie-Färbung

Um die aufgetrennten Proteine zu fixieren und sichtbar zu machen, wurde das Gel nach der Elektrophorese in einer Coomassie-Brilliant-Blau-Lösung (Färbelösung) für mindestens 20 Minuten angefärbt. Hierbei bindet der Farbstoff unspezifisch an kationische und hydrophobe Seitenketten der Proteine. Anschließend wurde mit Entfärbelösung soweit entfärbt, bis sich die gefärbten Proteinbanden deutlich vom entfärbten Hintergrund abhoben. In der Regel war die Entfärbung nach spätestens 1,5 Stunden abgeschlossen. Zum effizienteren Entfärben wurde die Lösung im Abstand von 15 min erneuert und ein bis zwei kleine Zellstofftücher dazugelegt. Die Nachweisgrenze dieser Färbemethode liegt bei 50-100 ng Protein pro Bande.

2.3.5.2 Silberfärbung

Alternativ zur Coomassie-Färbung wurden die elektrophoretisch aufgetrennten Proteine im Polyacrylamidgel über die Silberfärbung sichtbar gemacht. Die ebenfalls unspezifische Färbemethode ist etwa um das 10- bis 100-fache sensitiver als die Coomassie-Färbung (die Nachweisgrenze liegt hier bei 5-10 ng Protein pro Bande), eignet sich aber kaum zur Quantifizierung von Proteinen. Silber färbt Proteine mit unterschiedlicher Intensität an, wodurch die Reproduzierbarkeit beeinträchtigt und eine Quantifizierung der Proteine schwer möglich wird [159]. Der Grund sind Silber-Ionen (Ag^+), die sich nicht stöchiometrisch an Glutamat-, Aspartat- und Cysteinreste von Proteinen anlagern. Dort werden sie im Alkalischen mit Formaldehyd zu elementarem Silber (Ag^0) reduziert und färben so die Proteine im Gel schwarz.

Tabelle 9: Silberfärbung von Polyacrylamidgelen

Schritt	Reagenz	Inkubationszeit
Waschen	10 % (v/v) Ethanol	2 x 5 Minuten
Waschen	Millipore-Wasser®	2 x 5 Minuten
Reduktion	Sensitizer Working Solution (50 µl Sensitizer in 25 ml Millipore-Wasser®)	1 x 1 Minute
Waschen	Millipore-Wasser®	2 x 1 Minute
Färben	Stain Working Solution (0,5 ml Enhancer in 25 ml Färbelösung)	30 Minuten
Waschen	Millipore-Wasser®	2 x 20 Sekunden
Entwickeln	Developer Working Solution (0,5 ml Enhancer in 25 ml Entwicklerlösung)	2-3 Minuten
Stoppen der Reaktion	5 % (v/v) Essigsäure	1 x 10 Minuten

Vor der Färbung wurden die Gele zur Fixierung der Proteine für mindestens 30 Minuten in Fixierlösung inkubiert und anschließend mit dem SilverSNAP® Stain Kit II gemäß Anleitung und unter Verwendung der mitgelieferten Reagenzien gefärbt. Die nach der Fixierung durchgeführten Schritte sind in Tabelle 9 kurz aufgeführt. Nach der Entwicklung wurde das Gel unter mehrmaligem Wechsel der Waschlösung intensiv mit Millipore-Wasser® gewässert und anschließend getrocknet. Zum Trocknen wurde das Gel für einige Minuten in Geltrocknungspuffer inkubiert und zwischen zwei Zellophanpapieren (*Gel Drying Film*), die zuvor für einige Minuten in Geltrocknungspuffer getränkt worden waren, in den dafür vorgesehen Rahmen gespannt. Das Gel wurde über Nacht im Luftzug getrocknet.

2.3.6 Western Blot-Analyse

Die Proteine bzw. Lipoproteine wurden wie unter 2.3.4 beschrieben mittels SDS-PAGE aufgetrennt und anschließend auf eine Nitrozellulosemembran übertragen [160]. Der Transfer der aufgetrennten Proteine erfolgte in einer *Semi-Dry* Apparatur der Fa. Bio-Rad. Hierzu wurden Blotting-Papier und die Nitrozellulose auf die Größe des Gels zurechtgeschnitten und in Transferpuffer getränkt. Das Gel wurde vorsichtig von den Platten gelöst und ebenfalls einige Minuten in Transferpuffer inkubiert. Im Sandwich-Prinzip wurden drei Lagen Blotting-Papier, die Nitrozellulose, das Gel und nochmals drei Lagen Blotting-Papier blasenfrei auf die Apparatur geschichtet und die Apparatur mit dem Deckel verschlossen. Der Transfer erfolgte für die Dauer von einer Stunde unter einem angelegten Strom von 70 mA pro Nitrozellulosemembran (1 mA/cm²). Zur Kontrolle des Transfers wurde anschließend die Nitrozellulose kurz in Ponceau S-Lösung (Roth) angefärbt und wieder mit Wasser gewaschen. Neben Proteinen, die in größerer Menge vorhanden waren, wurde so die Position des Proteinmarkers und Auftragsspuren sichtbar und mit einem Bleistift oder Kugelschreiber leicht markiert. Die Membran wurde durch Spülen mit PBS/Tween wieder vollständig entfärbt. Die auf der Membran immobilisierten Proteine wurden im Anschluss durch spezifische Antikörper nachgewiesen (siehe Tabelle 10). Wurde der Blot nicht unmittelbar nach dem Transfer entwickelt (Immundetektion), wurde er zwischen zwei Filterpapieren bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C gelagert.

2.3.7 Dot Blot-Analyse

Für die Dot Blot-Analyse wurde eine Dot Blot-Apparatur von BioRad verwendet. Unterschiedliche Aliquote (0,1 bis 1,6 ml) der entsprechenden Zellüberstände wurden mit Hilfe eines Unterdrucksystems direkt auf einer Nitrozellulosemembran fixiert. Die auf der Membran immobilisierten Proteine wurden im Anschluss durch den Einsatz spezifischer

Antikörper mittels Chemolumineszenzdetektion nachgewiesen (Immunodetektion, siehe 2.3.8, Tabelle 10). Dies erlaubt einen schnellen Nachweis der Zielantigene aus proteinhaltigen Gemischen. Die quantitative Auswertung des Dot Blot erfolgte über die Intensität der Graustufe der erhaltenen Punkte, die mit Hilfe der Software Adobe Photoshop Image, VS 7.0, ermittelt wurde [161]. Dabei wurde die prozentuale Änderung des Antigengehalts auf die Intensität der unbehandelten Kontrollzellen bezogen.

2.3.8 Immundetektion immobilisierter Proteine

Die im Gel aufgetrennten Proteine bzw. Lipoproteine wurden nach dem Transfer auf eine Membran mittels spezifischer Antikörper nachgewiesen. Die mittels der Dot Blot-Methode transferierten Proteine wurden analog detektiert. Die eingesetzten Primär- und Sekundärantikörper und deren Verdünnungen sind in Tabelle 10 angegeben. Alle Antikörper wurden in einer Suspension aus 3 % (m/v) Magermilchpulver in PBS/Tween verdünnt.

Tabelle 10: Detektionsbedingungen bei der Western Blot und Dot Blot-Analyse

Primärantikörper	Konzentration des Primärantikörpers	Verdünnung des Sekundärantikörpers*
SAM-6	25 µg/ml	1:1000
Anti GRP78 (ET-21)	25 µg/ml	1:2000
Anti GRP78 (GL-19)	25 µg/ml	1:2000
Anti LDL-Rezeptor	1:200*	1:2000
Anti ApoB 100/48	1:10.000*	_**
Isotypkontrollen		
Chrompure IgM	25 µg/ml	1:1000
Rabbit Serum IgG	25 µg/ml	1:2000

*Die Verdünnung wurde gemäß Herstellerangaben gewählt

**Direkte Immundetektion mit HRP-konjugiertem Primärantikörper

Um unspezifische Bindungsstellen abzusättigen, wurde die Membran (Blot) für zwei Stunden bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 4 °C in 5 % (m/v) Magermilchpulver in PBS/Tween inkubiert. Anschließend erfolgte eine 1-stündige Inkubation mit dem Primärantikörper, der gegen das nachzuweisende Antigen gerichtet war. Überschüssige Antikörper wurden durch dreimaliges Waschen (je 8-10 min) mit PBS/Tween entfernt. Die Detektion des gebundenen Antikörpers erfolgte mit einem Sekundärantikörper, der mit dem Enzym Meerrettich-Peroxidase (*Horseradish Peroxidase*, HRP) konjugiert war und entsprechend der

Herkunftspezies des Primärantikörpers passend gewählt wurde. Inkubations- und Waschbedingungen waren identisch mit denen des Primärantikörpers. Die Detektion erfolgte durch eine Chemolumineszenzreaktion mit dem SuperSignal®West Pico Chemolumineszenzsubstraten von der Firma Pierce. Die beiden Komponenten des Detektions-Kits wurden im Verhältnis 1:1 gemischt (pro Blot je 2 ml), der Blot 3 min darin inkubiert und in eine Röntgenkassette gelegt. Um die entstehende Chemolumineszenz sichtbar zu machen, wurde ein Fuji Super RX Safelight-Film verwendet und abhängig vom zu detektierenden Antigen zwischen 30 sec und 15 min belichtet. Die Lichtemission wurde als Schwärzung auf dem Röntgenfilm sichtbar.

Um den gleichen Blot mit einem anderen primären Antikörper detektieren zu können, d.h. ein anderes Antigen nachweisen zu können, wurde der Blot in Restore™Western Blot Stripping Buffer der Firma Pierce für 30 min bei 37 °C geschüttelt (*Stripping*), gewaschen und die oben beschriebenen Schritte inklusive erneutem Blockieren wiederholt (*Reprobing*).

2.3.9 Reinigung von Proteinen

Die Reinigung von Proteingemischen wurde mit Hilfe einer FPLC (*Fast Protein Liquid Chromatography*) Anlage durchgeführt. Im Rahmen der FPLC wurden verschiedene chromatographische Systeme verwendet, mit deren Hilfe komplexe Proteinmischungen nach Größe (Größenausschlußchromatographie oder Gelfiltrationschromatographie), Ladung (Ionenaustauschchromatographie), hydrophoben Eigenschaften (Hydrophobe Interaktionschromatographie) oder Affinitäten zu spezifischen Liganden (Affinitätschromatographie) getrennt werden. Dabei wurde die jeweilige chromatographische Säule mit Puffer äquilibriert und anschließend das zu trennende Proteingemisch über eine Probenschleife oder mittels einer Pumpe auf die Säule gegeben. Die Proteine trennten sich ihren physikalischen Eigenschaften entsprechend auf und wurden nach der Elution mit Hilfe eines Fraktionssammlers aufgefangen. Die Detektion der einzelnen Fraktionen fand über eine UV-Meßzelle bei einer Absorption von 280 nm statt und wurde mit Hilfe eines Schreibers aufgezeichnet.

2.3.9.1 Aufreinigung des SAM-6 Antigens

Im ersten Reinigungsschritt wurden ProteoExtrakt™-Membranextrakte der Karzinomzelllinie 23123/87 (siehe 2.3.1.2) über eine Superdex™ 200 Gelfiltrationssäule mit Hilfe des FPLC-Systems aufgetrennt.

Bei der Gelfiltration (Größenausschlußchromatographie) wurden die Proteine nach ihrem unterschiedlichem Molekulargewicht getrennt. Die Elution erfolgte isokratisch, d.h. mit nur

einem Puffer und ohne Gradienten. Als Gelmatrix wurden kugelförmige Dextranpolymere verwendet, die eine definierte Porengröße aufwiesen (siehe Tabelle 11). Kleinere Proteine diffundierten in die Poren der Polymere, wodurch sich deren Trennstrecke und somit die Durchflußgeschwindigkeit durch die Matrix verlangsamt. Große Proteine wanderten an den Poren vorbei und passierten das Gel ohne Verzögerung.

Tabelle 11: Verwendete Gelfiltrationsmatrizes und deren Eigenschaften

Säule	Polymer/Copolymer	Anwendungsbereich
Sephadex™ G25	Dextran/Epichlorhydrin	Entfernen von Salzen und Proteinen kleiner 5 kD
Superdex™ 200	Dextran/Epichlorhydrin	Auftrennen von Proteinen von 10 bis 600 kD

Vor dem Auftrag wurde die Gelfiltrationssäule mit 400 ml Puffer A äquilibriert. Die Proben wurden mit Extraktionspuffer II auf einen Gehalt von 1 mg/ml eingestellt und zum Entfernen unlöslicher Bestandteile durch einen 0,45 µm Membranfilter filtriert. Anschließend wurden 10 ml des Membranextrakts (10 mg Protein) über die Probenschleife bei einer Flußrate von 1 ml/min auf die Säule aufgetragen. Eluiert wurde bei einer Flußrate von 2 ml/min und das Eluat in Fraktionen von je 2 ml aufgefangen. 300 µl jeder Fraktion wurden wie unter 2.3.3 beschrieben mit Aceton ausgefällt und in Auftragspuffer aufgenommen. Fraktionen, die das gesuchte Antigen enthielten wurden nach der SDS-PAGE mittels der Western Blot-Analyse detektiert (siehe 2.3.8). Die Proben wurden in flüssigen Stickstoff schockgefroren und bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C gelagert.

Die Fraktionen, die nach der Gelfiltration das gesuchte Antigen enthielten, wurden in einem zweiten Schritt mittels Anionenaustauschchromatographie nach ihren Ladungseigenschaften erneut fraktioniert und aufkonzentriert. Hierzu wurde Sepharose Q XL verwendet, eine Matrix bestehend aus quervernetzter Agarose und quartären Ammoniumgruppen. Damit das zu isolierende Protein an den Anionenaustauscher binden konnte, wurde der pH-Wert des Auftragspuffers (Puffer A) so gewählt, daß er oberhalb des isoelektrischen Punktes des gesuchten Proteins (IEP GRP78/BIP: 5.0) [162] lag. Die Bindung an die Matrix erfolgte über elektrostatische Interaktionen.

Die antigenhaltigen Fraktionen der einzelnen Gelfiltrationen wurden vereinigt und über einen 0,45 µm Membranfilter gegeben. Vor dem Auftrag wurde die Säule mit dem 10-fachen Säulenvolumen mit Puffer A äquilibriert und die Probelösung über eine Pumpe bei einer Flußrate von 2 ml/min aufgetragen. Um nicht gebundene Bestandteile zu entfernen, wurde nach dem Probenauftrag mit Puffer A gewaschen, bis eine konstante Basislinie erschien. Die

Elution der gebundenen Proteine erfolgte durch die Zugabe von Natriumchlorid. Die Natrium- und Chloridionen verhinderten elektrostatische Wechselwirkungen zwischen Protein und Matrix, und verdrängten die Proteine von der Matrix. Mit Hilfe eines Stufengradienten wurde die Natriumchloridkonzentration während der Elution schrittweise erhöht, indem dem Auftragspuffer der entsprechende Anteil an Puffer B über eine Pumpe beigemischt wurde (0-80 %). Das Eluat wurde in 2 ml Fraktionen gesammelt, der Gehalt bestimmt und für die anschließende Gelelektrophorese bzw. die Western Blot-Analyse je 300 µl mit Aceton ausgefällt. Fraktionen, die das gesuchte Antigen enthielten wurden in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C gelagert.

2.3.9.2 Reinigung des SAM-6 Antikörpers aus Kulturüberständen

Der SAM-6 Antikörper wurde für anstehende Versuche aus Kulturüberständen (siehe 2.1.3) mit Hilfe des FPLC-Systems aufgereinigt. Vor der Reinigung wurden jeweils 500 ml Kulturüberstand 1:1 mit Millipore®-Wasser versetzt und mit verdünnter Salzsäure der pH-Wert auf 5.9 eingestellt. Die Probenlösung wurde filtriert und bis zum Auftrag auf Eis gelagert.

Zur Reinigung wurde eine Säule aus Sepharose SP FF verwendet, bestehend aus quervernetzter Agarose kovalent gekoppelt mit negativ geladenen Sulfopropylgruppen. Der pH-Wert des Auftragspuffers wurde so gewählt, daß das Protein der Wahl an die Matrix bindet, und lag hier beim Einsatz einer Säule mit den Eigenschaften eines starken Kationenaustauschers unterhalb des isoelektrischen Punktes des Antikörpers (siehe Isoelektrische Fokussierung, 2.3.13). Die Säule wurde zu Beginn der Reinigung mit Phosphatpuffer A (20 mM, pH 5.9) äquilibriert. Anschließend wurde der gekühlte Kulturüberstand über eine weitere Pumpe mit einer Flussrate von 2 ml/min auf die Säule aufgetragen. Nach dem Auftrag des Überstandes wurde die Säule bei einer Flussrate von 2 ml/min mit Phosphatpuffer bis zur Basislinienkonstanz gewaschen, anschließend der an die Säule gebundene IgM-Antikörper durch Beimischen von 75 % Phosphatpuffer B (20 mM, 1 M NaCl, pH 8.0) eluiert und das Eluat in Fraktionen von 1 ml gesammelt. Der Gehalt an SAM-6 Antikörper in den einzelnen Fraktionen wurde nephelometrisch bestimmt und die Reinheit und Intaktheit des gereinigten Antikörpers über SDS-PAGE und Western Blot-Analyse überprüft. Im letzten Schritt wurde der gereinigte SAM-6 Antikörper über Sephadex™ G25 in isotonische Kochsalzlösung umgepuffert und für den Einsatz in der Zellkultur sterilfiltriert.

2.3.10 Massenspektrometrische Analyse von Proteinen

Mit der Massenspektrometrie ist es möglich, Proteinmengen im Femtomolbereich zu sequenzieren bzw. aufgrund des Masse/Ladungsverhältnisses der dabei auftretenden Peptidfragmente das sequenzierte Protein einem bekannten Protein zu zuordnen [163]. Möglich wird dies durch das matrix-unterstützte Laserdesorptionsverfahren (*Matrix Assisted Laser Desorption Ionization*, MALDI).

Zur Identifizierung des SAM-6 Antigens wurden die gereinigten Fraktionen mit Aceton ausgefällt und in einer Konzentration von mindestens 0,4 µg/ml in Auftragspuffer gelöst. Dann wurden zwischen 8 und 20 µg Protein pro Geltasche auf ein Gel aufgetragen und elektrophoretisch getrennt. Nach der SDS-PAGE wurden die Banden der getrennten Proteine mittels Coomassie-Färbung sichtbar gemacht. Die mit Hilfe des Western Blot identifizierte Bande des gesuchten Antigens wurde vorsichtig aus dem Coomassie-Gel ausgeschnitten und zur Sequenzierung eingereicht. Die Identifikation der Proteinbande wurde von der Firma Toplab GmbH (Martinsried) mittels Massenspektrometrie mit einem Voyager DE STR MALDI-MS Instrument (Applied Biosystems) durchgeführt. Vor der massenspektrometrischen Analyse wurde die proteinhaltige Probe mit Iodacetamid reduziert und alkyliert, anschließend mit Trypsin verdaut und die Peptidmischung über eine ZipTip C18-Säule entsalzt. Die Peptidfragmente des verdauten Proteins wurden anschließend nach Ladung und Masse im Massenspektrometer analysiert und das Masse/Ladungsverhältnis gegen die Intensität des Signals in einem Spektrogramm aufgezeichnet. Jedes detektierbare Peptidfragment besaß ein charakteristisches Masse/Ladungsverhältnis, wodurch es mit Hilfe von Datenbanken mit den Sequenzen bereits bekannter Proteine abgeglichen und zugeordnet werden konnte (Profound and Mascot versus NCBI). Treffer, die mit einer Wahrscheinlichkeit von 1,0 zugeordnet werden konnten, wurden nochmals über BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*, www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST) auf Homologien untersucht.

2.3.11 Enzymatischer Verdau von Membranextrakten

Zur Untersuchung des Glykosilierungsmusters von Tumorzellen und dessen Rolle bei der Bindung mit dem SAM-6 Antikörper wurden Membranextrakte der Tumorzelllinie BXPC-3 (2.3.1) verwendet. Um eine vollständige Deglykosilierung von N- und O-verknüpften Glykosiden zu erreichen, wurde die Reaktion unter reduktiven Bedingungen durchgeführt. Zuerst wurden die Membranproteine nach Zugabe von SDS und β-Mercaptoethanol für 3 min bei 95 °C denaturiert. Hierbei lagen beide Substanzen in einer Endkonzentration von 1 % vor. Anschließend wurde ein Aliquot der denaturierten Proteinmischung mit

Reaktionspuffer auf eine Proteinkonzentration von 0,5 µg/µl verdünnt. Aliquote von 100 µl der nun vorliegenden Proteinlösung wurden entweder mit 10 U N-Glykosidase F oder 5 mU O-Glykosidase versetzt und anschließend über Nacht (16 Stunden) bei 37 °C inkubiert. Als Kontrolle wurde ein 100 µl Aliquot ohne Enzyme inkubiert. Nach dem Verdau wurden die Membranextrakte über SDS-PAGE aufgetrennt und mittels Western Blot-Analyse uder Einfluss der Deglykosilierung auf die Bindung des SAM-6 Antikörpers untersucht.

2.3.12 Enzymatischer Verdau von LDL

Um die Bindung zwischen LDL und dem SAM-6 Antikörper näher zu charakterisieren, wurde LDL (Sigma) mit N- und O-Glykosidasen versetzt. Um eine vollständige Deglykosilierung von N- und O-verknüpften Glykosiden zu erreichen, wurde die Reaktion ebenfalls unter reduktiven Bedingungen wie bereits unter 2.3.11 beschrieben durchgeführt. Nach dem Verdau wurde das Lipoprotein über SDS-PAGE aufgetrennt und mittels Western Blot-Analyse der Einfluss auf die Bindung des SAM-6 Antikörpers untersucht.

2.3.13 Isoelektrische Fokussierung des SAM-6 Antikörpers

Um den Antikörper SAM-6 näher zu charakterisieren zu können, wurde eine isoelektrische Fokussierung (IEF) durchgeführt. Bei der isoelektrischen Fokussierung werden Proteine über einen pH-Gradienten nach deren isoelektrischen Punkt (IEP) aufgetrennt. Somit wird auch umgekehrt die Bestimmung des IEP eines Proteins möglich. Die IEF wurde im ZOOM[®] IEF Fractionator der Firma Invitrogen unter reduktiven Bedingungen durchgeführt. Der Versuch wurde gemäß Herstellerangaben (Handbuch: ZOOM[®] IEF Fractionator, Invitrogen) unter Verwendung der mitgelieferten Reagenzien durchgeführt.

Vor der Fraktionierung wurden 200 µg SAM-6 Antikörper reduziert und alkyliert. Hierzu wurden 100 µl der Antikörperlösung nach Zugabe von Proteaseinhibitoren mit 150 µl IEF-Denaturant und 2,5 µl 2 M DTT versetzt und nach Alkalisieren mit 2,5 µl 1,5 M Tris-Lösung bei pH 8-9 für 30 min bei Raumtemperatur reduziert. Zur Alkylierung wurden anschließend 1,5 µl Dimethylacrylamid (DMA, Sigma) dazu pipettiert und für weitere 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Um überschüssiges DMA abzufangen, wurden nach der Inkubationszeit nochmals 2,5 µl 2 M DTT zugegeben und ein letztes Mal für 5 min inkubiert. Vor dem Probenauftrag wurden nochmals 3,15 µl IEF-Denaturant, 35 µl 2 M DTT, 35 µl Ampholyt-Mischung (ZOOM[®] Carrier Ampholytes, pH 3-10) und eine Spur Bromphenolblau zu der reduzierten und alkylierten Probe gegeben. Zwischenzeitlich wurde die Fraktionierkammer (ZOOM[®] IEF Fractionator) nach Vorschrift des Herstellers zusammengesetzt und das Anoden- bzw. Kathodenreservoir mit den entsprechenden

Puffern gefüllt. Der Aufbau des Fraktionierers wurde so gewählt, dass die Trennung von Proteinen in einem pH-Bereich von 3 bis 10 möglich war. Der Fraktionierer setzte sich aus 6 Kammern zusammen, die durch dünne Membranen (ZOOM® Disks), die einen definierten pH-Bereich aufwiesen, getrennt waren. Die Kammern wurden luftblasenfrei mit jeweils 650 µl der vorbereiteten Probe gefüllt, verschlossen und unter folgenden Bedingungen fraktioniert:

Dauer [min]	Spannung [V]
20	100
80	200
80	600

Die fraktionierten Proben wurden entnommen und ein Aliquot über die Acetonfällung (siehe 2.3.3) aufkonzentriert. Das Präzipitat wurde in Gel-Ladepuffer gelöst, die Probe über SDS-PAGE (8 %) aufgetrennt und die Proteine mit Hilfe der Coomassie-Färbung sichtbar gemacht.

2.4 Molekularbiologische Methoden

2.4.1 Isolierung von Gesamt-RNA

Die Isolierung und Reinigung von Gesamt-RNA aus Geweben und Tumorzellen wurde mit TRIZOL® (Invitrogen) durchgeführt. Die Methode beruht auf der Guanidinthiocyanat-Phenol-Chloroform-Extraktion nach Chomczynski und Sacchi [164]. Guanidinthiocyanat bewirkt durch seine chaotropen Eigenschaften eine Denaturierung von Proteinen und Inaktivierung der RNA-Endonukleasen. Die anschließende Chloroform-Phenol-Extraktion dient der Abtrennung der Proteine aus dem Zellextrakt. Nukleinsäuren, die sich in der wässrigen Phase befinden, werden durch die anschließende Fällung mit Isopropanol und Ethanol aufkonzentriert.

Alle Kunststoffwaren, die für die RNA-Isolierung und Weiterverarbeitung benötigt wurden, wurden vor Gebrauch autoklaviert. Glas- und Metallwaren wurden mit 2 M Natronlauge, DEPC-Wasser (RNase freies Wasser) und Ethanol gereinigt.

2.4.1.1 RNA-Isolierung aus Magenwebe

Hierzu wurde mit einem Kryostat 100 kryokonserviertes Magengewebe in fünfzig 10 µm dicke Scheiben geschnitten, in 1 ml TRIZOL® aufgenommen und auf Eis gestellt. Zur

Homogenisierung des Gewebes wurde mit unterschiedlich starken Kanülen und einer 1 ml Spritze geschert, bis das Gewebe so homogen war, dass es problemlos durch eine G27-Kanüle aufgezogen werden konnte. Um Muskelgewebe und Fettgewebe aus dem Ansatz zu entfernen, wurden die Homogenate für 10 min bei 10.000 x g und 4 °C zentrifugiert. Das Zellpellet enthielt extrazelluläre Membranen, Polysaccharide und hochmolekulare DNA, während im Überstand die RNA zu finden war. Die Überstände wurden in frische Reaktionsgefäße überführt, nach Zugabe von 200 µl Chloroform für 15 sec kräftig gemischt und für 2 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die Ansätze wurden für 15 min bei 13.000 x g und 4 °C zentrifugiert. Nach der Zentrifugation hatte sich die Mischung in eine untere, rote Phenol-Chloroform-Phase und eine obere, farblose wässrige Phase separiert. Die wässrige Phase, die die wasserlösliche RNA enthielt, wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und die RNA mit 500 µl Isopropanol für 15 min bei RT gefällt. Die RNA wurde bei 13.000 x g für 20 min und 4 °C pelletiert. Das RNA-Pellet wurde mit 1 ml 75 % (v/v) Ethanol gewaschen, nochmals zentrifugiert (5 min, 10.000 x g, 4 °C) und an der Luft getrocknet. Die RNA wurde je nach Größe des Pellets in 30-50 µl DEPC-Wasser aufgenommen und für 10 min bei 60 °C vollständig gelöst. Anschließend wurde der Gehalt an RNA spektrometrisch bestimmt (siehe 2.4.2), die isolierte RNA aliquotiert und bis zur weiteren Verwendung bei -80 °C gelagert.

2.4.1.2 RNA-Isolierung aus Tumorzellen

Zur Vorbereitung wurden 1×10^7 Zellen zweimal mit eiskaltem PBS gewaschen und mit 1000 x g für 5 min pelletiert. Das Zellpellet wurde in 1 ml TRIZOL[®] aufgenommen und nach Lyse und Homogenisieren wie bereits beschrieben die RNA analog extrahiert. Die isolierte RNA wurde in 30-50 µl RNase-freiem Wasser gelöst, der Gehalt an RNA bestimmt (2.4.2) und bis zur weiteren Verwendung bei -80 °C gelagert.

2.4.2 Konzentrations- und Reinheitsbestimmung von Nukleinsäurelösungen

Die Mengen- und Reinheitsbestimmung der Nukleinsäurelösungen erfolgte durch Absorptionsmessung bei 260 und 280 nm. Hierzu wurden 10 µl der zu vermessenden Probe mit Tris-Puffer auf 1:1000 verdünnt und in einer Quarzküvette die Absorption bei 260 nm bestimmt. Für die Berechnung der Konzentration wurde eine Absorption von 1 bei einer Konzentration von 42 µg/µl RNA oder 50 µg/µl DNA zugrunde gelegt und der Verdünnungsfaktor berücksichtigt:

Formel 4:

$$\begin{aligned} \text{RNA } [\mu\text{g}/\mu\text{l}] &= A_{260} \times 42 \mu\text{g}/\mu\text{l} \times 100 \\ &\text{bzw.} \\ \text{DNA } [\mu\text{g}/\mu\text{l}] &= A_{260} \times 50 \mu\text{g}/\mu\text{l} \times 100. \end{aligned}$$

Zur Reinheitsbestimmung wurde der Quotient aus der Absorption bei 260 und 280 nm gebildet, der zwischen 1,6 und 1,8 liegen sollte. So konnten Verunreinigungen mit Proteinen ausgeschlossen werden, die bei 280 nm miterfaßt wurden.

2.4.3 Reverse Transkription von mRNA in cDNA

Bei der reversen Transkription wurde mRNA mit Hilfe eines Enzyms, der reversen Transkriptase, komplementiert. Jeweils 5 µg (1-5 µl) der isolierten RNA wurden mit 1 µl Oligodeoxythymidylsäure-Primer (1 µg/µl Oligo-dT15 Primer) auf ein Gesamtvolumen von 8 µl mit DEPC-Wasser aufgefüllt. Im ersten Schritt wurde die RNA für 10 min bei 65 °C denaturiert und anschließend im PCR-Cycler auf 4 °C abgekühlt. Dann wurden je Probe 17 µl Mastermix, bestehend aus 5,2 µl DEPC-Wasser, 5 µl 5-fachen Reverse-Transkriptase-Puffer (*First-Strand-Puffer*), 2,5 µl 10 mM dNTPs (Deoxynukleosidtriphosphate, je 250 µM dATP, dTTP, dCTP und dGTP), 2,5 µl 0,1 M DTT (250 mM Dithiothreitol), 0,8 µl RNase-Inhibitor (400 U) und 1 µl M-MLV Reverse Transkriptase (200 U, Super Script™ II), hinzu pipettiert. Als Negativkontrolle wurden parallel Proben ohne reverse Transkriptase angesetzt, um Kontamination mit DNA auszuschließen. Die Synthese der cDNA erfolgte für 60 min bei 42 °C und wurde anschließend durch 15-minütiges Erhitzen auf 70 °C gestoppt. Die cDNA wurde sofort weiterverarbeitet oder in Aliquoten bei –20 °C gelagert.

2.4.4 Polymerasekettenreaktion

Zur Amplifikation spezifischer DNA-Fragmente wurde eine Polymerasekettenreaktion (PCR, *Polymerase Chain Reaction*) durchgeführt. Hierzu wurden 1-5 µl der jeweiligen cDNA (4 µg) mit 20 µl PCR-Mastermix gemischt und mit nukleasefreiem Wasser auf ein Volumen von 25 µl aufgefüllt. Der PCR-Mastermix bestand aus 2,5 µl 10xTaq-Polymerase-Puffer (Ligasepuffer), 0,5 µl 10 mM dNTPs (je 250 µM), 2 µl 25 mM MgCl₂ (2 nM), je 1 µl 10 pM 3'-bzw. 5'-Primer-Oligonukleotid (0,2 pM) und 0,2 µl Taq-Polymerase (1 U). Als Negativkontrolle beinhaltete jede PCR eine Probe mit allen Bestandteilen außer der cDNA. Die Proben wurden in den vorgeheizten PCR-Cycler (94 °C, *Hot Start*) gegeben und die Amplifizierung unter folgenden Bedingungen gestartet:

30-40 Zyklen:	Dauer [sec]	Temperatur [°C]
Denaturierung	30	94
Annealing, je nach Primer	30	45-65
Elongation	30	72
Extension	240-420	72

Die Amplifikationsbedingungen für die verschiedenen PCR-Produkte sind in Tabelle 12 aufgeführt. Die entstandenen PCR-Produkte wurden nach der Agarosegelelektrophorese mit Ethidiumbromid detektiert (siehe 2.4.6).

Tabelle 12: Amplifikationsbedingungen

Produkt	Annealing-Temperatur [°C]	Extensionszeit [sec]	Replikationszyklen	Größe des Endprodukts [bp]
GAPDH	64,0	30	30	380
GRP78/Fragment 1	56,6	30	40	780
GRP78/Fragment 2	56,6	30	40	610
GRP78/Fragment 3	56,6	30	40	570

2.4.5 Semiquantitative PCR mit GAPDH

Die Qualität der cDNA wurde über eine GAPDH-spezifische PCR kontrolliert. Die Bedingungen für die PCR sind unter 2.4.4 dargestellt.

Weiterhin wurde eine semiquantitative PCR mit GAPDH durchgeführt, die dazu diente, über das Expressionsmuster der GAPDH die Expression von GRP78 quantitativ abzuschätzen. Um hierfür die cDNA-Mengen der einzelnen Proben aufeinander einzustellen, wurde eine GAPDH-PCR mit unterschiedlichen Ausgangskonzentrationen an cDNA-Templates durchgeführt und über ein Agarosegel aufgetrennt. Die Intensitäten der DNA-Banden wurden visuell miteinander verglichen und durch Titration der eingesetzten cDNA-Mengen aufeinander abgestimmt. Die erhaltenen GAPDH-Banden wiesen nach erfolgreichem Mengenabgleich die gleichen Intensitäten auf. Mit den ermittelten Mengen an cDNA wurde eine PCR durchgeführt, die sowohl das Primerpaar für GAPDH als auch GRP78 (Fragment 2) enthielt. Für die Amplifikation galten die gleichen Bedingungen wie für die Einzel-PCR von GRP78. Die entstandenen PCR-Produkte wurden nach der Agarose-gelelektrophorese mit Ethidiumbromid detektiert und die Banden über eine DNA-Leiter identifiziert (siehe 2.4.6).

Über die Intensitäten der GAPDH-Banden wurden die Intensitäten der GRP78-Banden visuell miteinander verglichen und beurteilt.

2.4.6 Agarosegelelektrophorese

Für die Auftrennung von DNA-Fragmenten aus der PCR wurden 1,5%ige Agarosegele (m/v) verwendet. Hierzu wurde die Agarose in TBE-Puffer unter Kochen gelöst, nach kurzem Abkühlen die Ethidiumbromidlösung (10 mg/ml, Sigma) dazu pipettiert und das Gel in die vorbereitete Form gegossen. Nach dem Erstarren wurde das Gel in die Elektrophorese-Apparatur gelegt und mit TBE-Puffer (Laufpuffer) überschichtet. Die DNA-Proben wurden mit $\frac{1}{6}$ des Probenvolumens mit 6-fachem DNA-Ladepuffer (*6xLoading Dye Solution*) versetzt und je 6 μ l in die Taschen des Agarosegels pipettiert. Als Marker wurde eine 100 bp DNA-Leiter (*Gene RulerTM*, Trennbereich 100-1000 bp) verwendet. Die Auftrennung erfolgte bei 150 mA für ca. 20 min. Das Gel wurde auf einem UV-Transilluminator im UV-Licht bei 254 nm betrachtet und über eine Videoauswerteeinheit der Firma MWG (Ebersberg) dokumentiert. RNA- bzw. DNA-haltige Banden wurden durch die Fluoreszenzaktivität interkalierenden Ethidiumbromids identifiziert.

2.4.7 DNA-Sequenzierung

Für die Sequenzierung von GRP78 wurde RNA aus Tumorzellen isoliert und revers transkribiert wie unter 2.4.1 und 2.4.3 beschrieben. Die PCR-Fragmente wurden direkt und unter Verwendung des *QIAquick PCR Purification Kits* gemäß den Angaben des Herstellers verarbeitet. Hierzu wurden 20 μ l der PCR-Fragmente in 100 μ l *Binding Buffer* aufgenommen, auf eine kleine Säule (im Kit enthalten) pipettiert und für eine Minute bei 13.000 upm abzentrifugiert. Der Durchfluss wurde verworfen und der Vorgang nach Zugabe von 700 μ l Waschpuffer wiederholt. Nach dem letzten Zentrifugierschritt wurde die Säule auf ein neues Reaktionsgefäß gesteckt und die DNA-Fragmente mit 50 μ l Wasser (*Aqua Injectabilia*) kurz gelöst und eluiert.

Für die Sequenzierungsamplifikation wurde jeweils einer der unter Kapitel II-1.1 beschriebenen Primer für GRP78 verwendet und die Proben mit Hilfe des *BigDye[®] Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kits* aufbereitet. 7 μ l der gereinigten DNA wurden mit 1 μ l Primer (10 pM) und 2 μ l Sequenziermischung vermengt und im PCR-Cycler mit 50 Zyklen unter folgenden Bedingungen amplifiziert:

	Dauer [sec]	Temperatur [°C]
	120	64,0
Denaturierung	20	56,6
Annealing	20	56,6
Extension	120	56,6

Nach der Amplifikation wurden überschüssige Oligonukleotide und freien dNTPs über Sephadex G-50 aus dem Reaktionsgemisch entfernt. Hierzu wurde eine mit gestopfte 200 µl Pipettenspitze bis zum oberen Rand mit Säulenmaterial beladen und 3 min bei 3000 upm zentrifugiert. Nach Auftragen der Probe wurde nochmals zentrifugiert und die DNA nach der Elution in Sequenzierpuffer aufgenommen. Bis zur Analyse im Sequenzierautomaten wurden die Proben bei 4 °C gelagert. Die Sequenzierung erfolgte mit dem Sequenzierautomaten der Firma Applied Biosystems.

Die Amplifikation wurde mit jedem Primer durchgeführt und wie oben beschrieben sequenziert. Um Fehler zu beseitigen, die bei der Amplifikation mit der Taq-Polymerase bzw. der Sequenzierung entstehen können, wurde überlappend in beide Leserichtungen sequenziert und die Sequenzen der PCR-Fragmente mit Hilfe der DNAMAN Software für Windows (Version 5.2) untereinander verglichen (Konsensus-Sequenz). Die weitere Analyse der Sequenzdaten für GRP78 erfolgte durch den Vergleich der gelieferten Daten mit den Daten der NCBI-Datenbank. Durch Umschreiben der DNA-Sequenzen in Aminosäuresequenzen wurde auf stille Mutationen und Aminosäureaustauschmutationen untersucht.

2.5 Immunfluoreszenz

2.5.1 FACS-Analyse

Die FACS-Analyse (*Fluorescence Activated Cell Sorting/Scanning*) stellt eine wichtige Methode zur Charakterisierung von Zellen dar. Mit dieser Methode können nicht nur morphologische Eigenschaften wie Größe und Granularität, sondern auch die Expression von Oberflächenproteinen (Antigenen) nach spezifischer Immunfärbung bestimmt werden. Dabei werden spezifische Antikörper (Primärantikörper) an Antigene gebunden, die wiederum durch fluoreszenzfarbstoffgekoppelte Sekundärantikörper detektiert werden können [165]. Die Färbung kann neben spezifischer fluorochromgekoppelter Antikörper auch über DNA-bindende Fluoreszenzfarbstoffe (z.B. Propidiumiodid) erfolgen [166].

Das Durchflusszytometer besteht aus einem Flüssigkeits- und einem optischen System. Die Suspension mit den zu analysierenden Zellen wird unter Druck in eine Kapillare geleitet. Dadurch entsteht ein fokussierter Tropfenstrahl, wobei jeder Tropfen nur eine einzige Zelle enthält. Der Tropfenstrahl wird mit konstanter Geschwindigkeit an einem Laser vorbeigeführt. Trifft Licht auf eine Zelle, erhält man durch deren Lichtbeugung und -streuung neben der Zellzahl auch Informationen über Zellgröße und Binnenstruktur (Granularität des Zytoplasmas) der Zelle. Hierbei gibt die Vorwärtsstreuung (*Forwardscatter*, FSC), die Lichtstreuung entlang der Achse des einfallenden Laserstrahls, Auskunft über die Zellgröße, und die Seitwärtsstreuung (*Sidewardscatter*, SSC), die in einem Winkel von 90° zum einfallenden Laserstrahl gemessen wird, Auskunft über die Granularität der Zelle.

Gleichzeitig werden durch den monochromatischen Laserstrahl die Elektronen des Fluoreszenzfarbstoffes angeregt, die unter Abgabe von Energie (Licht) wieder auf ihr ursprüngliches Energieniveau zurückfallen. Die Emission wird über die Auswahl spezieller Sperrfilter sichtbar gemacht. Seine Intensität ist direkt proportional zur Menge des gebundenen Antikörpers und somit proportional zur Menge des Oberflächenantigens auf der Zelle. Die Parameter der gemessenen Ergebnisse können entweder einzeln im Histogramm oder gegeneinander im Dot Plot aufgetragen werden.

Bei der Messung mit dem FACScan von Beckton Dickinson werden die Proben mit einem Argon-Ionen-Laser angeregt, der Licht mit einer Wellenlänge von 488 nm erzeugt. Um das emittierte Fluoreszenzlicht zu detektieren, stehen drei Fluoreszenz- und zwei Streuungsdetektoren (Kanäle) mit fest eingestellten Filtersets (Sperrfilter) zur Verfügung, die die Transmission bei einer definierten Wellenlänge ermöglichen (Tabelle 13).

Tabelle 13: Detektoren und Filtersets des BD FACScan

Detektor	Filter	Fluoreszenzfarbstoff
SSC	488/25 nm	-
FSC	488/10 nm	-
FL-1	530/30 nm	FITC
FL-2	575/26 nm	Propidiumiodid
FL-3	670/14 nm	Propidiumiodid

2.5.1.1 Nachweis der Antigenexpression auf der Zelloberfläche durch indirekte Immunfluoreszenz

Adhärente Zellen wurden durch Trypsin/EDTA von den Kulturflaschen bzw. den Zellkulturplatten gelöst. Die Reaktion wurde mit Kulturmedium (plus Supplementen) abgestoppt, die Zellen durch Zentrifugation bei 400 x g für 5 min pelletiert, in einer definierten Menge Komplettmedium resuspendiert und zur Rekonstitution der Zellmembranen 30 bis 60 min auf Eis gestellt. Anschließend wurden 2×10^5 Zellen in ein 5-ml FACS-Röhrchen überführt und zweimal mit FACS-Puffer gewaschen. Die suspendierten Zellen wurden jeweils bei 4 °C und 350 x g für 5 min pelletiert. Danach wurden die Zellen in 200 µl einer Lösung mit Primärantikörper bzw. der entsprechenden Isotypkontrolle resuspendiert und für 15 bis 30 min auf Eis inkubiert. Die verwendeten Primärantikörper, deren Konzentrationen und Inkubationszeiten sind in Tabelle 14 dargestellt. Die Isotyp-Kontrollen wurden in der gleichen Konzentration angesetzt. Nach der Inkubation mit dem Primärantikörper wurden die Zellen abzentrifugiert, der Überstand verworfen und die Zellpellets mit 500 µl kalten FACS-Puffer gewaschen. Im Anschluss folgte lichtgeschützt eine 15-minütige Inkubation mit FITC-gekoppeltem Zweitantikörper (Fluoresceinisothiocyanat), der je nach Herkunftsspezies des Primärantikörpers entsprechend gewählt wurde. Deren Verdünnung richtete sich nach den Angaben des Herstellers und ist in ebenfalls Tabelle 14 aufgelistet. Am Ende der Inkubationszeit mit dem Sekundärantikörper wurden die Zellen erneut mit FACS-Puffer gewaschen und die Zellen am Ende in 200 µl kalten FACS-Puffer aufgenommen. Bis zur Messung wurden die Zellen unter Lichtausschluss auf Eis aufbewahrt. Die Messung erfolgte mit dem FACScan der Firma Becton Dickinson und wurde anschließend mit der Software WinMDI (Version 2.8) ausgewertet.

Tabelle 14: Antikörper für die FACS-Analyse

Primärantikörper	Konzentration des Primärantikörpers*	Verdünnung des Sekundärantikörpers****	Herkunft
SAM-6	100 µg/ml	1:50	Mensch
Anti CD55	20 µg/ml	1:100	Maus
Anti GRP78 (ET-21, AS 71-91)	100 µg/ml	1:20	Kaninchen
Anti GRP78 (GL-19, AS 636-654)	100 µg/ml	1:20	Kaninchen
Anti LDL-Rezeptor	100 µg/ml	1:20	Kaninchen

Tabelle 14: Antikörper für die FACS-Analyse

Isotypkontrollen			
Chrompure IgM, Mensch	100 µg/ml	1:50	Mensch
Serum IgG, Maus	20 µg/ml	1:100	Maus
Serum IgG, Kaninchen	100 µg/ml	1:20	Kaninchen

*Alle Verdünnungen der Antikörper wurden in FACS-Puffer hergestellt.

**Die Verdünnung wurde orientierend nach Herstellerangaben gewählt.

Für die Antikörper-Bindungstudien wurden FITC-markierte Sekundärantikörper eingesetzt. FITC besitzt eine Anregungswellenlänge von 488 nm und wurde über einen Detektions-Bandpassfilter von 530 nm detektiert. Somit konnte Die Bindung der eingesetzten Antikörper wurde über die Intensität der Emission des gekoppelten FITC auf FL-1 (Kanal 1, grüne Fluoreszenz) ermittelt. Die Darstellung des Kanals 1 erfolgte logarithmisch. Pro Probe wurden bei einer Zählrate von 500 bis 800 Zellen mindestens 10.000 Zellen gemessen. Die Zählung erfolgte ohne weitere Einschränkung. Die Daten wurden unter Verwendung der BD CellQuest Pro Software mit dem BD FACScan vermessen und mit der Software WinMDI, Version 2.8, ausgewertet. Zur Quantifizierung wurde die Anzahl positiver Zellen bzw. die Antigendichte im Histogramm dargestellt. Dabei wurde die jeweilige Zellzahl gegen die gemessene Fluoreszenzintensität aufgetragen. Der Anteil an positiven Zellen wurde durch direkten Vergleich der Proben mit der entsprechenden Negativkontrolle (Isotypkontrolle) ermittelt. Der Anteil an positiven Zellen wurde hier als Nullwert gesetzt. Die Antigendichte wurde aus der Fluoreszenzverschiebung gegen die der Negativkontrolle ermittelt.

2.5.1.2 Nachweis hypodiploider DNA durch direkte Immunfluoreszenz nach Propidiumiodid-Färbung

Die SAM-6-induzierte Apoptose von Tumorzellen wurde durch die Detektion hypodiploider DNA mittels Durchflußzytometrie untersucht [167, 168]. Zellen, die sich in der G1-Phase des Zellzyklus befinden, weisen einen einfach diploiden Chromosomensatz (2n) auf. Nach der Mitose in der G2-Phase liegt ein doppelt diploider Chromosomensatz (4n) vor [166]. Während des Vorgangs der Apoptose bauen verschiedene Enzyme die DNA ab. Es entstehen DNA-Fragmente, die kleiner als 2n (hypodiploid) sind. Sie sind spezifisch für den apoptotischen Vorgang und nach Anfärben mit Propidiumiodid und anschließender Analyse im Durchflußzytometer als SubG1-Fraktion messbar. Der Fluoreszenzfarbstoff Propidium-

iodid interkaliert mit doppelsträngiger DNA und spiegelt bei dessen Detektion den Gehalt an DNA und die Größe der DNA-Fragmente wider.

Zur Durchführung des Versuchs wurden 2×10^5 Tumorzellen (BXPC-3) in einer 6er Zellkulturplatte ausgesät und mit dem Antikörper SAM-6 oder der Isotypkontrolle ChromPure IgM unter Standardbedingungen inkubiert. Die beiden Antikörper wurden in einer Konzentration von 10 µg/ml in einem Endvolumen von je 2 ml Medium eingesetzt. Die Inkubation erstreckte sich über einen Zeitraum von fünf Tagen. Nach jeweils 24 Stunden wurde das Ausmaß der Apoptose bestimmt. Hierzu wurde der Zellkulturüberstand in ein Zentrifugenröhrchen überführt, die adhärenen Zellen mit Trypsin abgelöst und mit dem Überstand vereinigt. Anschließend wurde für 5 min bei 350 x g zentrifugiert und der Überstand verworfen. Die Zellen wurden in je 500 µl kalten FACS-Puffer resuspendiert, in ein FACS-Röhrchen überführt und der Vorgang nochmals wiederholt. Das Zellpellet wurde in 700 µl frisch hergestellten, hypotonen propidiumiodidhaltigen Lysepuffer resuspendiert. Die lysierten Zellen wurden innerhalb von fünf Minuten direkt mit dem BD FACScan gemessen. Für den Nachweis des DNA-Farbstoffs Propidiumiodid wurde ein Detektions-Langpassfilter von 670 nm (FL-3) gewählt. Die Anzahl der hypodiploiden DNA-Fragmente und damit verbunden das Ausmaß an Apoptose wurde somit im Fluoreszenzkanal 3 (FL-3, rote Fluoreszenz) bestimmt. Dabei wurden 30.000 Ereignisse ohne weitere Einschränkungen gemessen und linear gegen die entsprechenden Fluoreszenzintensitäten in Form eines Histogramms dargestellt (WinMDI 2.8 Software).

2.5.2 Fluoreszenzmikroskopie

Die Fluoreszenzmikroskopie ermöglicht die Analyse von Zellen, die auf einer festen Matrix fixiert direkt mit Fluoreszenzfarbstoffen markiert wurden. Die Färbung kann sowohl über spezifische, fluorochromgekoppelte Antikörper erfolgen als auch über DNA-bindende Farbstoffe, welche den Zellkern anfärben. In Abhängigkeit der Emissionsspektren der verwendeten Farbstoffe ist es möglich, eine Zelle gleichzeitig mit verschiedenen Fluoreszenzfarbstoffen zu analysieren. Nach Anregung der Farbstoffe durch eine Lichtquelle wird die Emission eines Fluoreszenzfarbstoffes über die Auswahl spezieller Sperrfilter sichtbar gemacht. Antigene auf Tumorzellen, an die fluorochromgekoppelte Antikörper gebunden sind, können hierbei durch das Fluoreszenzsignal erkannt und deren Lokalisation auf der Zelle bestimmt werden.

Zur Analyse wurde ein konfokales System bestehend aus einem Fluoreszenzmikroskop (Leica DMRE/UV) und einem Lasersystem (Innova[®] Coherent Inc.) verwendet, das mit einem Argon-Ionen-Laser (488 nm) und einem Violett-Laser (405 nm) ausgestattet war. Für den

Nachweis des Farbstoffes FITC wurde eine Anregungswellenlänge von 460-490 nm und ein Detektions-Bandpassfilter von 510-530 nm verwendet. CyTM3 und Orange 548 wurden bei einer Wellenlänge von 548 nm angeregt und bei einem Bandpassfilter von 565 nm detektiert. Für den Nachweis des DNA-Farbstoffs 7-Aminoactinomycin D (7-AAD) wurde eine Anregungswellenlänge von 488 nm und ein Detektions-Bandpassfilter von 670 nm, für PO-PROTM-1 eine Anregungswellenlänge von 405 nm und ein Detektions-Bandpassfilter von 440 nm benötigt.

2.5.2.1 Fluoreszenzmikroskopische Bestimmung der Zellviabilität

Bei dieser Methode wurde das *Vybrant[®] Apoptosis Assay Kit #13* verwendet. Es enthielt zwei gebrauchsfertige Fluoreszenzfarbstoffe (PO-PROTM-1, 7-AAD), mit deren Hilfe die Viabilität der Zellen bzw. die Apoptose-Induktion durch den SAM-6 Antikörper bestimmt werden konnte.

Während der Apoptose durchläuft die Zelle charakteristische morphologische und biochemische Veränderungen, die letztendlich zur Durchlässigkeit der Zytoplasmamembran führen können [169]. Der Farbstoff PO-PROTM-1 (violette Fluoreszenz) kann bereits in diesem Stadium in die apoptotische Zelle eindringen, der Farbstoff 7-AAD (rote Fluoreszenz) hingegen nicht. Apoptotische Zellen zeigen deshalb nur violette und keine rote Fluoreszenz. Sie können so von vitalen und nekrotischen Zellen unterschieden werden. Beide Fluoreszenzfarbstoffe können die Membran vitaler Zellen nicht passieren, nekrotische oder beschädigte Zellen nehmen dagegen beide Farbstoffe auf. Vitale Zellen zeigen somit keine Fluoreszenz, nekrotische Zellen die Fluoreszenz beider Farbstoffe.

In einer 24er-Zellkulturplatte wurden je Vertiefung $4,5 \times 10^4$ Zellen/ml Kulturmedium angesetzt. Nach Adhäsion der Zellen wurden sie mit SAM-6 Antikörper oder IgM Isotypkontrolle versetzt, wobei beide Antikörper in einer Endkonzentration von 50 µg/ml vorlagen. Als Negativkontrolle wurden Zellen ohne Antikörper kultiviert. Zusätzlich wurde je ein Ansatz mit Wasserstoffperoxid (30 nM) und Camptothecin (20 nM) versetzt, als weitere Kontrolle für apoptotische Zellen wurden Zellen 2 h bei 43 °C erhitzt und kultiviert. Um nekrotische Zellen zu erhalten, wurden einige Zellen 2 h bei 70 °C erhitzt und unter den üblichen Zellkulturbedingungen gehalten. Jede Probe wurde dreimal angesetzt und für 4, 24 und 48 Stunden kultiviert. Nach der jeweiligen Inkubationszeit wurden die Zellen mit Trypsin von der Kulturplatte gelöst, mit dem vorher abgenommen Kulturüberstand vereint und abzentrifugiert. Das Zellpellet wurde einmal mit kaltem PBS gewaschen und mit PBS auf eine Zellzahl von 1×10^6 eingestellt. Zu jeder Zellsuspension (1 ml) wurden 2,5 µl PO-PROTM-1 (Komponente A) und 1 µl 7-AAD (Komponente B) pipettiert und 30 min lang auf

Eis inkubiert. Danach wurden die Zellen auf Objektträger aufgebracht, nach dem Trocknen mit *Fluorescent Mounting Medium* eingedeckt und über konfokale Mikroskopie ausgewertet.

2.5.2.2 Endozytose fluoreszenzmarkierter Antikörper

Um die Bindung an bzw. die Aufnahme des SAM-6 Antikörpers in die Tumorzelle zu untersuchen, wurden direkt fluoreszenzmarkierter Antikörper verwendet. Hierzu wurde der Fluoreszenzfarbstoff FITC kovalent an den Antikörper gebunden. Die Markierung wurde gemäß den Angaben des Herstellers durchgeführt. Bei der Konjugation von Antikörper und Farbstoff handelte es sich um eine Kondensation zwischen aktivierten Carbonsäuregruppen des Antikörpers und der Aminosäuregruppe des Farbstoffs.

Um den Farbstoff FITC an den monoklonalen Antikörper SAM-6 bzw. die Isotypkontrolle ChromPure IgM kovalent zu koppeln, wurde der *Fluoro Taq FITC Conjugation Kit* verwendet. Um die Carbonsäuregruppen der Antikörper zu aktivieren (Deprotonierung im Alkalischen), wurden die beiden Antikörper zuerst mit Hilfe des FPLC-Systems über eine SephadexTM G25 Säule (HiPrepTM 26/10 Desalting) in 0,1 M Carbonatpuffer, pH 9,2, umgepuffert. Hierzu wurde die Säule bei einer Flussrate von 5 ml/min mit mindestens 265 ml (5-faches Säulenvolumen) Carbonatpuffer äquilibriert, die Antikörperlösung über die Probenschleife mit einer Flussrate von 1 ml/min aufgegeben und anschließend mit Carbonatpuffer bei 5 ml/min eluiert. Der erste erscheinende Peak entsprach der antikörperhaltigen Fraktion. Ausgangskonzentration der beiden Antikörper lag bei je 2,5 mg/ml und ergab nach dem Pufferaustausch eine finale Konzentration von ca. 1,7 mg/ml (Verdünnungsfaktor durch die Gelfiltration lag bei ca. 1,5). Als nächstes wurden 2 mg FITC in 2 ml Carbonatpuffer gelöst. Unverzöglich wurden 50 µl der FITC-Lösung tropfenweise zu 0,25 ml jeder Antikörperlösung gegeben und für 2 Stunden bei Raumtemperatur unter Lichtausschluss und leichtem Schütteln inkubiert. Nach der Inkubationszeit wurden die markierten Antikörper wiederum über Gelfiltration mit einer SephadexTM G25-Säule von überschüssigem FITC getrennt. Hierzu wurde die Säule mit PBS äquilibriert, die Probe aufgegeben und mit PBS eluiert. Der erste der beiden detektierbaren Peaks enthielt den konjugierten Antikörper und wurde in Fraktionen von je 1 ml gesammelt. Die restlichen Fraktionen wurden verworfen. Vor der Trennung der nächsten Antikörperkonjugat-Lösung wurde die Sephadex-Säule mindestens mit dem 10-fachen Säulenvolumen reäquilibriert, um freien Farbstoff von der Säule zu waschen. Der Proteingehalt wurde mittels der BCA-Methode bestimmt, wobei bovines Serumalbumin als Standard diente (siehe 2.3.2).

Im Anschluß wurden Pankreaskarzinomzellen (BXPC-3) mit Trypsin/EDTA von der Zellkulturflasche gelöst und nach Abstoppen der Reaktion in frischem Kulturmedium resuspendiert und für mindestens 30 min auf Eis ruhen gelassen. Ansätze mit je 1×10^6

Zellen wurden mit FITC-konjugiertem SAM-6 Antikörper oder FITC-konjugierter Isotypkontrolle (ChromPure IgM) über einen Zeitraum von 30, 60 und 120 min bei 37 °C inkubiert. Dabei lagen die Antikörper in einer Endkonzentration von 40 µg/ml vor. Nach der jeweiligen Inkubationszeit wurden die Zellen mit PBS gewaschen und in 1 ml PBS resuspendiert. 100 µl Aliquots wurden auf Objektträgern fixiert und nach dem Trocknen mit *Fluorescent Mounting Medium* eingedeckt. Die Analyse der Ergebnisse erfolgte mit dem Fluoreszenzmikroskop.

2.6 Immunhistochemische Methoden

2.6.1 Herstellung von Zytospinpräparaten

Die jeweilig verwendete Zelllinie wurde mit Trypsin/EDTA vom Boden der Zellkulturflasche abgelöst und zweimal mit RPMI 1640 Medium gewaschen. Die Zellen wurden auf eine Dichte von 1×10^6 Zellen pro 1 ml verdünnt und zur Rekonstitution der Zelloberfläche für mindestens 30 min auf Eis gestellt. Währenddessen wurden Objektträger in den Rotor der Zytospin-Zentrifuge eingespannt und 50-100 µl der Zellsuspension bei langsamer Beschleunigung zwei Minuten bei 350 upm aufzentrifugiert. Unter dem Mikroskop wurde die Zelldichte überprüft. Die Zytospin-Präparate wurden über Nacht bei Raumtemperatur getrocknet und entweder eingedeckt oder immunhistochemisch weiterverarbeitet.

2.6.2 Herstellung von Paraffinschnitten

Native Gewebeproben wurden mit 4 % (v/v) Formalin fixiert und anschließend maschinell entwässert (Tissue Tek VIP, Sakura). Danach wurde das Gewebe in flüssiges Paraffin überführt und mit Hilfe eines Histocenter-Gerätes (SHANDON) eingebettet. Nach Erhärten des Paraffins konnten die fixierten Gewebelöcke geschnitten werden. Hierzu wurden die Paraffinblöcke für ca. 30 min in einen Gefrierschrank (-20 °C) gelegt. Danach wurden mit dem Mikrotom 2 µm dicke Gewebeschnitte hergestellt, die zur Entspannung des Schnittes auf ein Wasserbad mit Raumtemperatur und anschließend zum Strecken des Schnittes auf ein 30 °C warmes Wasserbad gelegt wurden. Die gestreckten Gewebeschnitte wurden auf Super Frost Plus-Objektträger aufgezogen und zum Trocknen über Nacht bei 37 °C in den Brutschrank gestellt. Bis zu ihrer weiteren Verarbeitung wurden sie trocken und bei Raumtemperatur gelagert.

2.6.3 Immunperoxidase-Färbung

Immunperoxidase-Färbungen ermöglichen die farbliche Kennzeichnung zellulärer Strukturen, deren antigene Epitope spezifisch von Primärantikörpern erkannt werden. Mit Hilfe peroxidasekonjugierter Sekundärantikörper, welche gegen den Fc-Teil von Immunglobulinen gerichtet sind, stellen sich nach enzymatischer Substratumsetzung die von den Primärantikörpern gebundenen Gewebeareale braun dar.

2.6.3.1 Immunperoxidase-Färbung von Zytospinpräparaten

Die immunhistochemische Färbung der Zytospinpräparate erfolgte nach folgendem Färbeprotokoll:

Die trockenen Objektträger wurden 10 min in Aceton fixiert und trockneten anschließend 30 min an der Luft. Nach dreimaligem Waschen mit Tris-NaCl-Puffer wurden die Objektträger nochmals fünf Minuten in Tris-NaCl-Puffer inkubiert. Um unspezifische Proteinbindungen zu blockieren, wurde 30 min lang mit je 100 µl einer 4%igen Milchpulverlösung (m/v) in PBS in der feuchten Kammer inkubiert. Im Anschluss wurde erneut dreimal mit Tris-NaCl-Puffer gewaschen. Nun wurden 100 µl einer Lösung des jeweiligen Primärantikörpers aufpipettiert, wobei entsprechende Kontrollen mitgeführt wurden. Zusätzlich zur Expression des SAM-6 Antigens wurde die Expression von GRP78 auf der Zelloberfläche untersucht. Dafür wurde neben dem Antikörper SAM-6 ein Anti-human GRP78 Antikörper (ET-21) als Primärantikörper verwendet, der eine Aminosäuresequenz am N-terminalen Ende des Proteins erkannte. Um die Unversehrtheit der Membran zu zeigen, wurde ein Antikörper gegen den Oberflächenrezeptor CD55 als Positivkontrolle verwendet. Zur Kontrolle unspezifischer Bindungen wurde jeweils die entsprechende Isotypkontrolle in der gleichen Konzentration mitgeführt (Tabelle 15). Als weitere Negativkontrolle (Hintergrundkontrolle) wurde ein Objektträger mit 100 µl einer BSA-Lösung mitgeführt, die zum Verdünnen der Antikörperlösungen in einer Konzentration von 0,5 % BSA in PBS eingesetzt wurde. Nach 30-minütiger Inkubation der Antikörper wurde erneut dreimal mit Tris-NaCl-Puffer gewaschen, im nächsten Schritt 100 µl des jeweiligen peroxidasegekoppelten Sekundärantikörpers auf die Objektträger pipettiert und ebenfalls für 30 min inkubiert. Die Sekundärantikörper wurden je nach Ursprung und Isotyp des Primärantikörpers gewählt und vor Gebrauch 1:50 verdünnt. Sekundärantikörper, die gegen menschliche Antigene gerichtet waren, wurden dabei in einer Mischung aus PBS und 30 % (v/v) Kaninchenserum angesetzt, die, die gegen murine Antigene gerichtet waren in PBS mit 30 % (v/v) Humanserum. Die Konzentrationen und Verdünnungen aller verwendeten Antikörper sind in Tabelle 15 zusammengefasst. Nach der Inkubationszeit wurden die Objektträger für 10 min in PBS gelagert und währenddessen die Substratlösung vorbereitet. Hierzu wurde eine Tablette

3,3'-Diaminobenzidin (DAB) und eine Wasserstoffperoxid-Tablette (*SigmaFASTTM DAB Tablets*) in 5 ml Leitungswasser gelöst. Auf jeden Objektträger wurden 100 µl der chromogenen DAB-Substratlösung gegeben und 10 min lang bei Dunkelheit inkubiert. Nach kurzem Spülen mit destilliertem Wasser wurde mit Meyers Hämalaun gegengefärbt (5 min) und die Objektträger 10 min lang unter fließendem Wasser gewässert. Im letzten Schritt wurden die Objektträger zur Konservierung mit auf 60 °C erwärmter Glyceringelatine (Kaisers Glyceringelatine, Merck) eingedeckt.

Tabelle 15: Immunperoxidase-Färbung auf Zytospins

	Antikörper	Konzentration/Verdünnung
Primärantikörper	SAM-6, IgM, Mensch	50 µg/ml*
Isotypkontrolle	Chrompure IgM, Mensch	50 µg/ml*
Negativkontrolle	0,5 % BSA/PBS	(kein Antikörper enthalten)
Sekundärantikörper	Kaninchen anti Mensch, HRP-gekoppelt	1:50**
Primärantikörper	Anti GRP78, IgG, Kaninchen	50 µg/ml*
Isotypkontrolle	Serum IgG, Kaninchen	50 µg/ml*
Sekundärantikörper	Ziege anti Kaninchen, HRP-gekoppelt	1:50***
Primärantikörper/Positivkontrolle	Anti CD55, IgG, Maus	33 µg/ml*
Sekundärantikörper	Ziege anti Maus, HRP-gekoppelt	1:50***

*Verdünnt in 0,05 % BSA/PBS.

**Verdünnt in PBS und 30 % Kaninchenserum.

***Verdünnt in PBS und 30 % Humanserum.

2.6.3.2 Immunperoxidase-Färbung von Paraffinschnitten

Vor der immunhistochemischen Färbung wurden die Paraffinschnitte in einer Demaskierungslösung gekocht, da nach Formalinfixierung der Gewebe viele Antigene durch Quervernetzung der Proteine für die Antikörper nicht mehr zugänglich waren. Die Demaskierungslösung auf Glykolbasis wirkte dem entgegen und ermöglichte eine verbesserte Detektierbarkeit der Antigene. Vor der Behandlung mit Demaskierungslösung wurden die Schnitte entparaffiniert. Dazu wurden die Schnitte nacheinander in folgenden Lösemitteln inkubiert:

Inkubationszeit [min]	Lösemittel
2 x 5	100 % Xylol
2 x 5	100 % Ethanol
2 x 5	90 % (v/v) Ethanol
2 x 5	70 % (v/v) Ethanol

Danach wurden die Schnitte dreimal mit Millipore®-Wasser gewässert und anschließend für 20 min im Wasserbad in Demaskierungslösung G (1:4 in Aqua dest.) gekocht. Danach wurden die Objektträger für 5 min in Tris-NaCl-Puffer gestellt und anschließend 30 min mit 0,5 % (m/v) BSA in PBS die unspezifischen Bindungsstellen blockiert. Nun folgte die immunhistochemische Färbung nach dem gleichen Protokoll wie unter 2.6.3.1 beschrieben. Hier wurde die Expression SAM-6 Antigens auf Normal- und Tumorgewebe untersucht. Neben den üblichen Negativkontrollen (0,05 % (m/v) BSA/PBS) und Isotypkontrollen (Chrompure IgM) wurden hier als Positivkontrolle gegen humane Zytokeratine gerichtete Antikörper eingesetzt, wobei sich die Auswahl des jeweiligen Zytokeratins nach der Art des zu färbenden Gewebes richtete. Alle Verdünnungen der Primärantikörper wurden auch hier in 0,5 % (m/v) BSA/PBS angesetzt. Die enzymgekoppelten Zweitantikörper wurden wie bereits unter 2.6.3.1 beschrieben ausgewählt und verdünnt. Hier kam zusätzlich ein Sekundärantikörper zum Einsatz, der gegen Kaninchen-Antigene gerichtet war. Er wurde in einer Mischung aus PBS mit 30 % (v/v) Humanserum verdünnt. Im Unterschied zur Färbung von Zytospins, wurden bei den Paraffinschnitten die jeweiligen Primärantikörper 2,5 Stunden und die jeweiligen Sekundärantikörper 45 min inkubiert. Die Konzentrationen und Verdünnungen aller verwendeten Antikörper sind in Tabelle 16 zusammengefasst.

Tabelle 16: Immunperoxidase-Färbung auf Paraffinschnitten

	Antikörper	Konzentration/Verdünnung
Primärantikörper	SAM-6, IgM, Mensch	10, 25 und 50 µg/ml*
Isotypkontrolle	Chrompure IgM, Mensch	50 µg/ml*
Negativkontrolle	0,5 % BSA/PBS	(kein Antikörper enthalten)
Sekundärantikörper	Kaninchen anti Mensch, HRP-gekoppelt	1:50**
Primärantikörper	Anti GRP78, IgG, Kaninchen	10, 25 und 50 µg/ml*
Isotypkontrolle	Serum IgG, Kaninchen	50 µg/ml*
Sekundärantikörper	Ziege anti Kaninchen, HRP-gekoppelt	1:50***
Gewebe (Karzinomtyp)	Positivkontrollen	Konzentration/Verdünnung
Lunge (Plattenepithel) Ösophagus (Plattenepithel) Zervix (Plattenepithel)	Anti Human Zytokeratin 5/6 IgG, Maus	1:50*
Pankreas (Adeno)	Anti Human Zytokeratin 7 IgG, Maus	1:20*
Brust (Adeno) Dünndarm (Adeno) Leber (HCC) Lunge (Adeno) Magen (Adeno) Ovar (Adeno) Uterus (Adeno)	Anti Human Zytokeratin 8 IgG, Maus	1:20*
Niere (Adeno) Nebenniere (Endokrin) Blase (Urothel) Schilddrüse (Endokrin) Hoden (Keimzellen)	Anti Human Zytokeratin 18 IgG, Maus	1:10*
Kolon (Adeno)	Anti Human Zytokeratin AE1/AE3 IgG, Maus	1:50*
Prostata (Adeno)	Anti Human PSA IgG, Maus	1:20*
Alle Gewebearten und Karzinomtypen	Anti Human Ki67 IgG, Maus	1:100*
Sekundärantikörper	Kaninchen anti Maus, HRP-gekoppelt	1:50***

*Verdünnt in 0,05 % BSA/PBS.

**Verdünnt in PBS und 30 % Kaninchenserum.

***Verdünnt in PBS und 30 % Humanserum.

2.6.4 Enzymatischer Verdau von Oberflächenproteinen vitaler Zellen

Für die Abspaltung glykosidisch gebundener Membranproteine auf der Zelloberfläche, wurde die Tumorzelllinie BXPC-3 verwendet. Die Zellen wurden mittels Trypsin/EDTA von der Kulturflasche gelöst und anschließend zur Regeneration der Membranproteine für mindestens 30 min in RPMI 1640 Kulturmedium (plus Supplemente) auf Eis gestellt.

Die Zellen wurden einmal mit Dulbecco's PBS, pH 7.2 (Sigma, Taufkirchen) gewaschen, pelletiert und anschließend in drei Reaktionsgefäßen mit je 5×10^4 Zellen in 0,5 ml Dulbecco's PBS resuspendiert. Je ein Ansatz wurde mit 5 U/ml N-Glykosidase bzw. mit 20 mU/ml O-Glykosidase versetzt. Der dritte Ansatz diente als Negativkontrolle und enthielt unbehandelte Zellen in Dulbecco's PBS. Die Reaktionsgefäße wurden für 4 Stunden bei 37 °C inkubiert. Nach der Inkubation wurden die Zellen einmal mit Dulbecco's PBS gewaschen, zentrifugiert und wieder in 400 µl Dulbecco's PBS resuspendiert. Je 100 µl der jeweiligen Zellsuspension wurde wie unter 2.6.1 beschrieben auf Objektträger aufgebracht und die Zytospins nach dem Trocknen und Fixieren immunhistochemisch gefärbt. Die Färbung erfolgte wie unter 2.6.3 erläutert, wurde mikroskopisch ausgewertet und abschließend die Ergebnisse mit einer Photoanlage und einem Olympus Mikroskop dokumentiert.

III. Ergebnisse

1 Charakterisierung des SAM-6 Antikörpers

1.1 Der SAM-6 Antikörper

Bereits in der Vergangenheit ist es gelungen, erfolgreich funktionell aktive IgM-Antikörper aus Patienten zu isolieren. An dieser Stelle sei nochmals der SC-1 Antikörper zu nennen, dessen tumorspezifische Wirkungsweise innerhalb diagnostischer Studien und klinischer Anwendungen bei Magenkarzinompatienten erfolgreich eingesetzt werden konnte [64, 67]. Wie bereits in der Einleitung erläutert, handelt es sich auch bei dem SAM-6 Antikörper um einen humanen monoklonalen Antikörper der Immunglobulin-Klasse M, dessen tumorspezifische Eigenschaften im Verlauf der Arbeit näher charakterisiert werden. Er wurde aus den Lymphozyten eines an einem Magenkarzinom erkrankten Patienten isoliert. Durch die Keimbahnkodierung ist der SAM-6 Antikörper Bestandteil der innativen Immunantwort und stellt daher ein ideales diagnostisches und nebenwirkungsfreies therapeutisches Werkzeug gegen maligne transformierte Zellen dar [61, 70]. Die Möglichkeit, Tumorzellen rückstandslos durch apoptotische Prozesse auszuschalten, rückt als ideale und schonende Therapieform immer mehr in den Mittelpunkt neuer Anti-Tumorstrategien.

Für alle geschilderten Versuche wurde Antikörper SAM-6 verwendet, der aus gesammelten Kulturüberständen antikörperproduzierender Hybridomzellen isoliert wurde (Kapitel II-2.3.9.2). Um die chromatographischen Bedingungen für die Reinigung optimieren zu können, wurde der isoelektrische Punkt des Antikörpers über isoelektrische Fokussierung bestimmt (Kapitel II-2.3.13). Da die Fokussierung nur unter reduktiven Bedingungen möglich war, ordneten sich die schwere und die leichte Kette des Antikörpers in der pH-Zone entsprechend ihrem isoelektrischen Punkt an. Somit konnte ein Anhaltspunkt über den isoelektrischen Punkt des nativen Proteins gewonnen werden. Nach der Fraktionierung war die leichte Kette in einem pH-Bereich von 5.4 bis 6.2 zu finden, die schwere Kette zwischen pH 6.2 und 7.0.

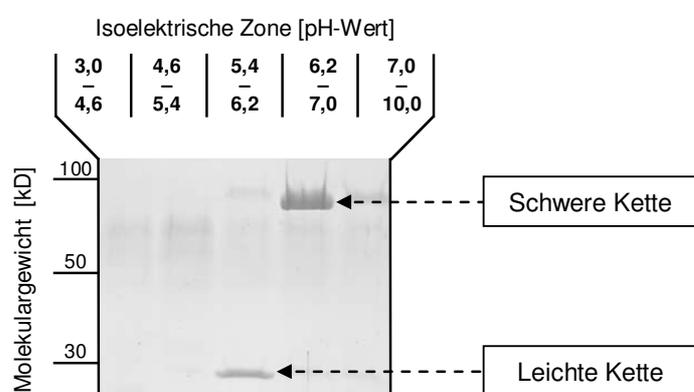


Abbildung 4:
Isoelektrische Fokussierung des Antikörpers SAM-6 unter reduktiven Bedingungen.

1.2 Funktionelle Analyse des SAM-6 Antikörpers

Der Antikörper SAM-6 wies gegenüber anderen, nach der Hybridomatechnologie isolierten humanen IgM-Antikörpern eine sehr hohe apoptotische Aktivität auf, die zudem spezifisch bei Tumorzellen zu beobachten war. In diesem Zusammenhang fiel auf, dass Zellen, die mit dem Antikörper in Kontakt kamen, ein Übermaß an Lipiden akkumulierten, was letztendlich zytotoxisch wirkte. Diese neue, durch den SAM-6 Antikörper-induzierte Art des Zelltods (*Lipoptosis*) wurde nachfolgend näher betrachtet.

1.2.1 Induktion tumorspezifischer Apoptose

Bei der Gewinnung der humanen Antikörper über die Hybridomatechnologie, richtete sich das Augenmerk im Speziellen auf Antikörper, die Einfluss auf die Proliferation von Tumorzellen ausübten. Konnte *in vitro* eine Proliferationshemmung der Tumorzellen durch den MTT-Test festgestellt werden, wurde sie anschließend mit Hilfe spezifischer Apoptose-Tests näher charakterisiert und eine eventuelle Induktion der Apoptose verifiziert.

In Abbildung 5 sind die Ergebnisse des Apoptose-Tests mittels Cell Death Detection ELISA^{PLUS} auf verschiedenen Zelllinien dargestellt. Hierbei ist deutlich zu erkennen, dass die Magenkarzinomzellen 23123/87, Pankreaskarzinomzellen BXPc-3 und Karzinomzellen des Nasenseptums RPMI 2650 unter dem Einfluss des Antikörpers SAM-6 eine eindeutig erhöhte Apoptoserate aufwiesen. Dieser Effekt konnte bereits nach 4-stündiger Inkubation mit dem Antikörper SAM-6 beobachtet werden und erreichte jeweils nach 48 Stunden einen Maximalwert. Dieser lag bei der Kolon- und Pankreaskarzinomzellen jeweils über 90 %, bei der nasalen Tumorzelllinie bei über 60 %. Im Gegensatz dazu konnte auf nasalen, normalen Epithelzellen (HNEPc) keine vermehrte Apoptose festgestellt werden. Der Gehalt an apoptotischen Zellen lag hier bei knapp 10 % und damit im selben Bereich wie der der Isotypkontrolle. So konnte bei den Tumorzellen nach Behandlung mit dem ChromPure IgM Isotypen keine Steigerung der Apoptoserate festgestellt werden. Um auszuschließen, dass ein beobachteter Effekt alleine auf einen Mangel an Nährstoffen zurückzuführen ist, wurde immer ein Ansatz mit der entsprechenden Menge an verbrauchtem Kulturüberstand mitgeführt, der keinen Antikörper enthielt. Diese Kontrollen zeigten jedoch keinen Effekt auf die Zellproliferation der untersuchten Zelllinien und wurden deshalb im Diagramm nicht dargestellt. Neben der proliferationshemmenden Eigenschaft des Antikörpers SAM-6, konnte somit auch seine apoptoseinduzierende Wirkung auf die Tumorzellen bestätigt werden.

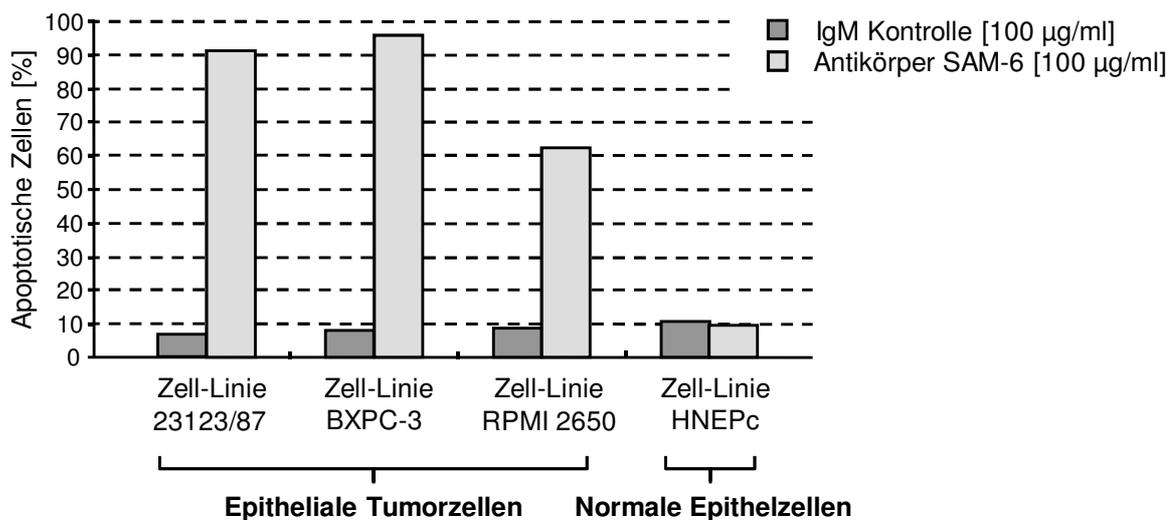


Abbildung 5: Analyse der Spezifität und Funktionalität des Antikörpers SAM-6 mit Hilfe eines Apoptose-Tests (Cell Death Detection ELISA^{PLUS}). Kolonkarzinomzellen (23123/87), Pankreaskarzinomzellen (BXPC-3), nasale Tumorzellen (RPMI 2650) und normale nasale Epithelzellen (HNEPc) wurden 48 Stunden lang mit SAM-6 AK bzw. der Isotypkontrolle inkubiert. Der Anteil an apoptotischen Zellen wurde UV-spektrometrisch bestimmt und der prozentuale Anteil an apoptotischen Zellen bezogen auf die unbehandelte Kontrolle berechnet.

Für die folgenden Testreihen wurden Pankreaskarzinomzellen (BXPC-3) verwendet. Bei dieser Zelllinie wurde der größte Hemm- und Apoptoseeffekt des SAM-6 Antikörpers auf die Tumorzellen beobachtet.

1.2.1.1 Bestimmung der Zellviabilität (Vybrant[®] Apoptosis Assay Kit #13)

Ergänzend wurde die apoptotische Wirkung des Antikörpers SAM-6 mittels Immunfluoreszenzfärbung sichtbar gemacht. Bei dieser Methode wurde das Vybrant[®] Apoptosis Assay Kit #13 (Invitrogen) verwendet, das die Fluoreszenzfarbstoffe PO-PROTM-1 Dye (violette Fluoreszenz) und 7-Aminoactinoycin D (7-AAD, rote Fluoreszenz) beinhaltet. Da beide Farbstoffe die Membran vitaler Zellen nicht durchdringen können, zeigen diese nach Behandlung mit den Farbstoffen keine Fluoreszenz. Nekrotische oder beschädigte Zellen hingegen sind für beide Farbstoffe durchlässig und weisen somit die Fluoreszenzen beider Farbstoffe auf. Während der Apoptose werden die Zellen für den Farbstoff PO-PROTM-1 durchlässig, für 7-AAD hingegen nicht. Die Zellen zeigen nur die violette, nicht aber die rote Fluoreszenz und können somit von vitalen und nekrotischen Zellen abgegrenzt werden. Abbildung 6A zeigt Zellen, die für 48 Stunden mit dem SAM-6 Antikörper inkubiert wurden. Nach dem Anfärben der Zellen mit beiden Farbstoffen, weisen die Zellen eine deutlich violette Fluoreszenz auf. Zellen, die zur Kontrolle mit dem Isotypen inkubiert wurden, wurden vom

Farbstoff PO-PROTM-1 nicht angefärbt (Abbildung 6B). Als weitere Kontrollen wurden bei unbehandelten Zellen durch 2-stündiges Erhitzen bei 43 °C Apoptose ausgelöst, bei anderen Nekrose durch 15-minütiges Erhitzen bei 70 °C. Nach 24-stündiger Inkubation unter Standardbedingungen wurden sie analog gefärbt (Abbildung 6C-D). Die apoptotischen Zellen nahmen überwiegend den Farbstoff PO-PROTM-1 auf und fluoreszierten violett. Bei nekrotischen Zellen hingegen waren die Fluoreszenzen beider Farbstoffe zu detektieren. Bei allen Ansätzen war zu beobachten, dass die Zellen unabhängig vom Vitalitätsgrad eine geringe rote Fluoreszenz zeigten, die sich als Eigenheit der Zelllinie BXPC-3 herausstellte.

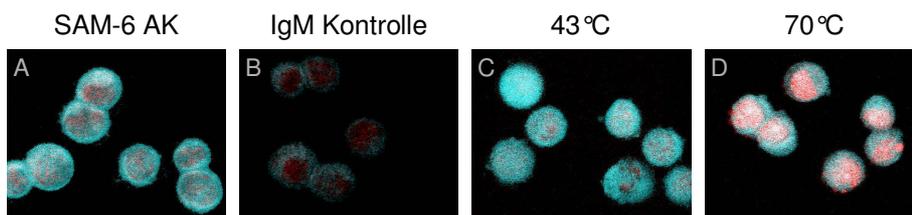


Abbildung 6: Darstellung SAM-6-induzierter Apoptose mit Hilfe des Vybrant® Apoptosis Assay Kit #13 und Immunfluoreszenz. Pankreaskarzinomzellen (BXPC-3) wurden 2 Tage mit SAM-6 AK bzw. Isotypkontrolle inkubiert, gemäß Vorschrift des Herstellers mit 7-AAD (rot) und PO-PROTM-1 (violett) angefärbt und mittels konfokaler Mikroskopie analysiert. **A**, Violette Fluoreszenz von Zellen die mit SAM-6 behandelt wurden. **B**, Isotyp-behandelte Zellen zeigten keine erhöhte Fluoreszenz. **C**, Hyperthermie-induzierte Apoptose (2h, 43 °C) wurde durch die violette Fluoreszenz sichtbar. **D**, Hyperthermie-induzierte Nekrose (2h, 70 °C) wurde durch violette und rote Fluoreszenz bestätigt.

1.2.1.2 Nachweis hypodiploider DNA

Die SAM-6-induzierte Apoptose konnte durch den Nachweis hypodiploider DNA-Fragmente mittels Propidiumiodid-Färbung und FACS-Analyse bestätigt werden. Pankreaskarzinomzellen BXPC-3 wurden über fünf Tage hinweg mit dem Antikörper SAM-6 bzw. der Isotypkontrolle inkubiert und nach jeweils 24 Stunden ausgewertet. Die Zellzyklusanalyse wurde in Zusammenarbeit mit Herrn Leo Rasche (eigene Arbeitsgruppe) durchgeführt. In Abbildung 7 ist das Ergebnis der Behandlung der Zellen mit dem SAM-6 Antikörper zusammenfassend dargestellt.

Ausgangspunkt ist das Histogramm des Zellzyklus vitaler Zellen (Tag 0, unbehandelte Zellen). Die Analyse vitaler Zellen mit intakter DNA ergab einen zweigipfeligen Peak, der die DNA-Verteilung der Zellpopulation in den Zellzyklusphasen G1 und G2 widerspiegelte. In der G1-Phase wiesen die Zellen einen einfach diploiden Chromosomensatz (2n) auf, in der G2-Phase besaßen sie einen doppelt diploiden Chromosomensatz (4n) [166]. Während der Apoptose degradierten Enzyme die DNA, wodurch DNA-Fragmente kleiner als 2n (SubG1) entstanden, die als zusätzlicher hypodiploider Peak erscheinen. Ab dem dritten Tag wurde die

Degradierung der DNA durch die Abnahme des DNA-Gehaltes in Form von Veränderungen der Peakhöhen im Histogramm sichtbar (Tag 3). Die entstandenen DNA-Fragmente waren am vierten Tag deutlich als SubG1-Peak detektierbar (Tag 4). Am fünften Inkubationstag ist der Anstieg der charakteristischen hypodiploiden DNA-Fragmente am deutlichsten ausgeprägt.

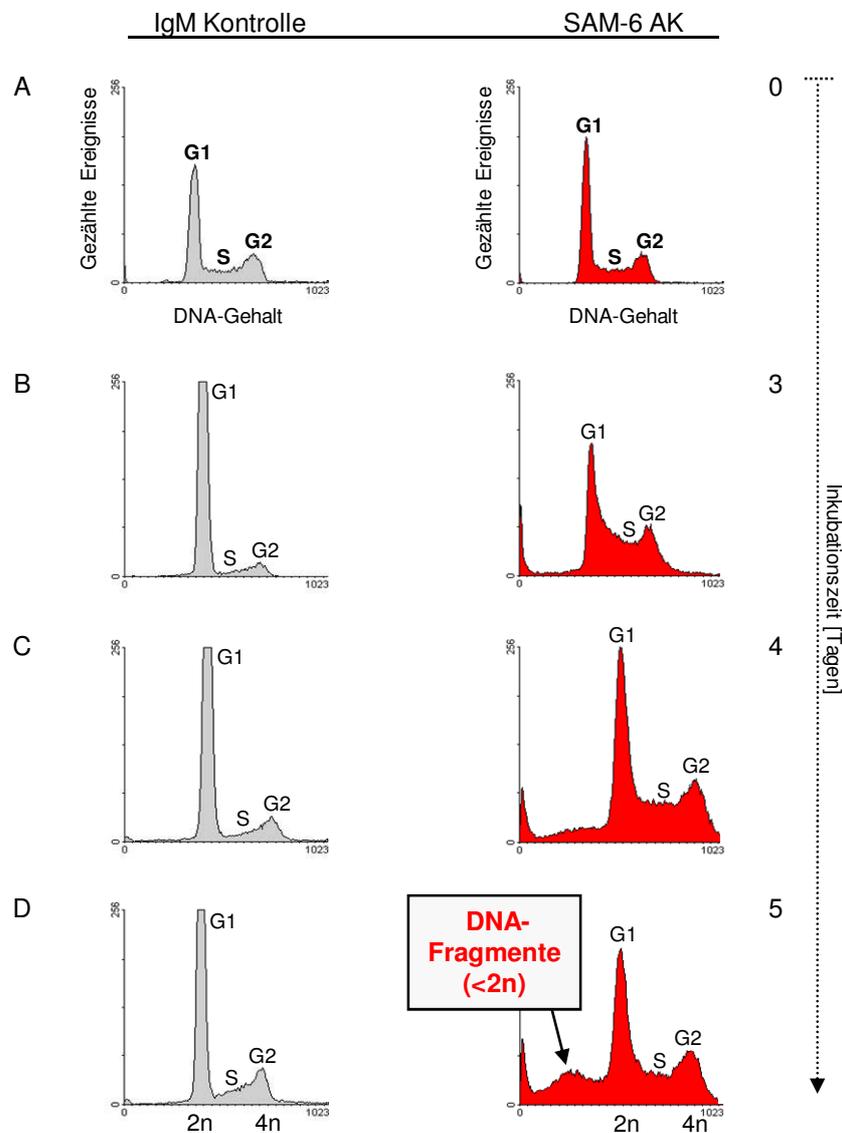


Abbildung 7: Histogramme der Zellzyklus-Analyse von Tumorzellen nach Behandlung mit dem SAM-6 Antikörper und hypotoner Propidiumiodid-Färbung. Die DNA von Pankreaskarzinomzellen (BXPC-3) wurde nach mehrtägiger Inkubation mit SAM-6 Antikörper bzw. der IgM Kontrolle mit Propidiumiodid sichtbar gemacht und der DNA-Gehalt durchflusszytometrisch bestimmt. **A**, unbehandelte Kontrollzellen. **B**, 3-tägige Inkubation mit SAM-6 Antikörper bzw. IgM Kontrolle. **C**, 4-tägige Inkubation mit SAM-6 bzw. Kontroll IgM. **D**, 5-tägige Inkubation mit SAM-6 bzw. Kontroll IgM. Die Behandlung der Zellen mit dem Antikörper SAM-6 endet in der Fragmentierung der DNA, die ein charakteristisches Merkmal der Apoptose darstellt. (G1/S/G2 Zellzyklusphasen, AK Antikörper)

1.2.2 Induktion tumorspezifischer, zelltoxischer Lipideinlagerungen

Tumorzellen, die mit dem SAM-6 Antikörper inkubiert wurden, akkumulierten im zelltoxischen Ausmaße Lipide, die die Ursache oder eine der Ursachen der SAM-6-induzierten Apoptose sein könnten. Um diese Form der Apoptose, die Lipoptose, genauer zu charakterisieren, wurde in den folgenden Experimenten analysiert, welche Lipide dabei eine Rolle spielen. In diesem Zusammenhang stellte sich auch die Frage, ob aus der zelltoxischen Anhäufung von Lipiden gleichzeitig ein für den Organismus günstiger Nebeneffekt auftritt und parallel unerwünschte und schädliche Lipide aus dem Kreislauf des Organismus entfernt werden können. Der SAM-6 Antikörper würde dadurch nicht nur für die Krebstherapie, sondern auch im Rahmen metabolischer Erkrankungen therapeutisch interessant.

Um die antikörperinduzierte Lipidanhäufung sichtbar zu machen, wurden die Zellen mit Sudanrot (Sudan III) angefärbt. Dabei löste sich der Azofarbstoff in Fetten und fetten Ölen, die sich im Zytoplasma ansammelten. Abbildung 8 zeigt Pankreaskarzinomzellen die für 48 Stunden mit dem Antikörper SAM-6 behandelt wurden. Hier waren die Lipide als rötliche, kettenartige Gebilde deutlich sichtbar. Im Gegensatz dazu war bei den Kontrollzellen, die mit der IgM Isotypkontrolle inkubiert wurden, kaum eine Einlagerung von Lipiden festzustellen.

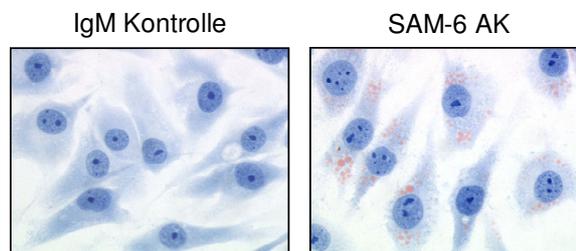


Abbildung 8: Färbung von eingelagerten Neutralfetten mit Sudanrot (Sudan III). Pankreaskarzinomzellen (BXPC-3) wurden für 48 Stunden mit SAM-6 Antikörper bzw. IgM Kontrolle inkubiert und anschließend einer Färbung mit Sudanrot unterzogen. In Zellen, die mit SAM-6 behandelt wurden, wurden rötlich gefärbte Fett-Tröpfchen sichtbar. Bei den Kontrollzellen konnte keine Lipidanhäufung detektiert werden.

Um weitere Informationen über die Zusammensetzung der eingelagerten Lipide zu gewinnen, wurde der Lipidgehalt der Zellen dünnschichtchromatographisch untersucht. Dabei wurden Pankreaskarzinomzellen wiederum für 48 Stunden mit SAM-6 bzw. der IgM Kontrolle inkubiert. Die intrazellulären Lipide wurden extrahiert, gleiche Mengen an Lipiden dünnschichtchromatographisch aufgetrennt und mit Hilfe des Kägi-Miescher-Sprühreagens (Anisaldehyd/Schwefelsäure in Eisessig) sichtbar gemacht. Die Dünnschichtchromatographie wurde in freundlicher Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Conzelmann,

Institut für Physiologische Chemie II, Universität Würzburg, durchgeführt. Das Ergebnis ist in Abbildung 9 dargestellt.

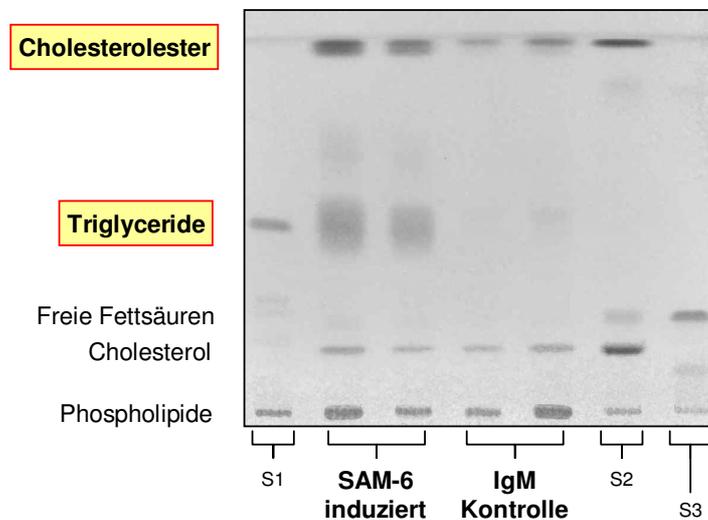


Abbildung 9: Dünnschichtchromatographische Analyse der Zusammensetzung der akkumulierten Lipide. Pankreaskarzinomzellen (BXPC-3) wurden in LDL-haltigem Medium mit dem Antikörper SAM-6 oder der IgM Kontrolle für 48 Stunden inkubiert. Nach der Ernte wurden die Zellen homogenisiert, die intrazellulären Lipide extrahiert und dünnschichtchromatographisch aufgetrennt. Zellen, die mit dem Antikörper SAM-6 behandelt wurden, zeigten im Vergleich zu der Kontrolle, einen erhöhten Gehalt an Cholesterolestern und Triglyceriden. (S1/S2/S3 Standardsubstanzen)

Zellen, die mit SAM-6 Antikörper behandelt wurden, wiesen im Vergleich zu den Kontrollzellen einen deutlich erhöhten Gehalt an Cholesterolestern auf. Wenn auch weniger deutlich, konnte gleichzeitig ein leicht erhöhter Gehalt an freiem Cholesterol beobachtet werden. Des Weiteren trat eine Anhäufung von Triglyceriden auf, die ebenfalls bei den Kontrollzellen nicht zu detektieren war.

Cholesterolester und Triglyceride werden in höheren Organismen hauptsächlich in Form von Lipoproteinen durch deren systemischen Kreislauf transportiert [170]. Deshalb wurde als nächstes die Interaktion des SAM-6 Antikörpers mit humanen Lipoproteinen analysiert. Hierzu wurden humanes HDL (*High Density Lipoprotein*), LDL (*Low Density Lipoprotein*) und VLDL (*Very Low Density Lipoprotein*) elektrophoretisch aufgetrennt und mittels der Western Blot-Analyse auf die Bindung mit dem SAM-6 Antikörper hin untersucht. Abbildung 10A belegt die eindeutig positive Reaktion des SAM-6 Antikörpers mit LDL und eine leicht positive Bindung an VLDL. Mit HDL konnte kein positives Signal detektiert werden. Das Ergebnis korrelierte gleichzeitig mit dem Ergebnis eines ELISA-Tests, der innerhalb der eigenen Arbeitsgruppe durchgeführt wurde. Bei diesem Test wurde eine ELISA-Platte mit humanen Lipoproteinen

vorbeschichtet und anschließend nach dem gleichen Prinzip mit einem HRP-konjugierten Zweitantikörper die positive Bindung des SAM-6 Antikörpers detektiert (Daten nicht dargestellt). Da die Bindung sowohl an LDL als auch an VLDL, nicht aber an HDL zu detektieren war, lag die Vermutung nahe, dass LDL und VLDL ein gemeinsames Merkmal aufwiesen, das letztendlich an der Bindung des SAM-6 Antikörpers beteiligt sein musste. Beide Lipoproteine beinhalten als charakteristisches Merkmal das Apolipoprotein B 100 (ApoB 100), wobei dies in LDL einen weitaus höheren Anteil einnimmt [170]. Mit Hilfe des Western Blot wurden die drei genannten Lipoproteine mittels Anti ApoB 100 auf dieses gemeinsame Strukturmerkmal hin analysiert. Die Gegenüberstellung der beiden Western Blots zeigt Abbildung 10.

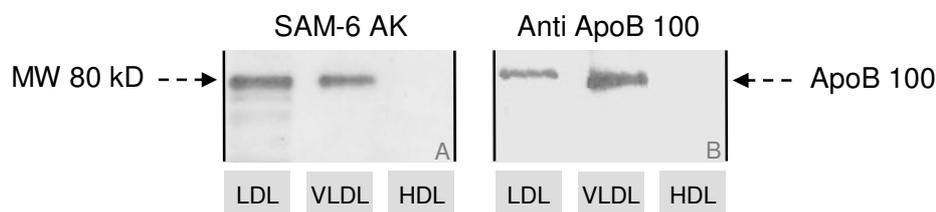


Abbildung 10: Western Blot Analyse des AK SAM-6 und des Anti ApoB 100 AK auf humanen Lipoproteinen. **A**, Der AK SAM-6 zeigte eine positive Reaktion mit LDL und VLDL, aber keine Bindung an HDL. **B**, Der Anti ApoB 100 AK zeigte ebenso eine Bindung an LDL und VLDL, nicht aber an HDL. Das vergleichbare Antigenmuster gab einen Hinweis darauf, dass ApoB 100 bei der Bindung des SAM-6 Antikörpers an LDL (VLDL) als eine Art Brückenmolekül beteiligt sein könnte. (LDL/VLDL/HDL Low/Very Low/High Density Lipoprotein, ApoB 100 Apolipoprotein B100, AK Antikörper)

Beide Antikörper binden an ein Molekül mit einem Molekulargewicht von ca. 80 kD. Dieses Ergebnis gibt lediglich einen Hinweis darauf, dass ApoB 100 bei der Bindung des SAM-6 Antikörpers an die Lipoproteine eine entscheidende Rolle spielen könnte. Dass es sich hierbei tatsächlich um ein Brückenmolekül beider Bindungspartner handelt, könnte z.B. im Rahmen einer Immunpräzipitation analysiert werden. Dies wurde jedoch im Rahmen dieser Arbeit nicht weiter untersucht.

Hingegen wurde ein anderer interessanter Aspekt verfolgt. Im Blutkreislauf höherer Organismen existiert LDL in nativer Form und liegt unter anderem gleichzeitig in modifizierter Form, wie z.B. in glykosilierter und v.a. in oxidiert Form, vor. Neben seiner stark atherogenen Eigenschaft, kann das auf diese Weise modifizierte LDL Immunantworten auslösen [171, 172]. Deshalb wurde untersucht, ob diese modifizierte Form des LDL durch den SAM-6 Antikörper detektiert werden kann und ob die Modifikation einen Einfluss auf die Bindung des SAM-6 Antikörpers ausübt. Diese Bindungsstudie wurde mittels der ELISA-Technik durchgeführt. Hierzu wurde eine ELISA-Platte mit frischem LDL, HDL, und oxidiertem LDL (oxLDL) vorbeschichtet und auf die Bindung mit dem SAM-6 Antikörper hin analysiert. Im Vergleich zur Isotypkontrolle fand mit

LDL eindeutig eine positive Bindung des Antikörpers statt. Mit HDL konnte erwartungsgemäß keine Bindung detektiert werden. Auffällig war, dass nach Oxidation des LDLs eine erhöhte Bindung des SAM-6 Antikörpers festgestellt werden konnte (

Abbildung 11A). Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass die Apoptose-Induktion durch den SAM-6 Antikörper mit dem Oxidationsgrad des LDLs korrelierte (

Abbildung 11B). Hierzu wurde LDL mit Cu^{2+} unterschiedlich lang oxidiert und Zellen in Anwesenheit des Antikörpers SAM-6 und der verschiedenen stark oxidierten Lipoproteine kultiviert. Im Anschluss wurde mittels des Cell Death Detection ELISA^{PLUS} auf den Grad der Apoptose-Induktion hin analysiert.

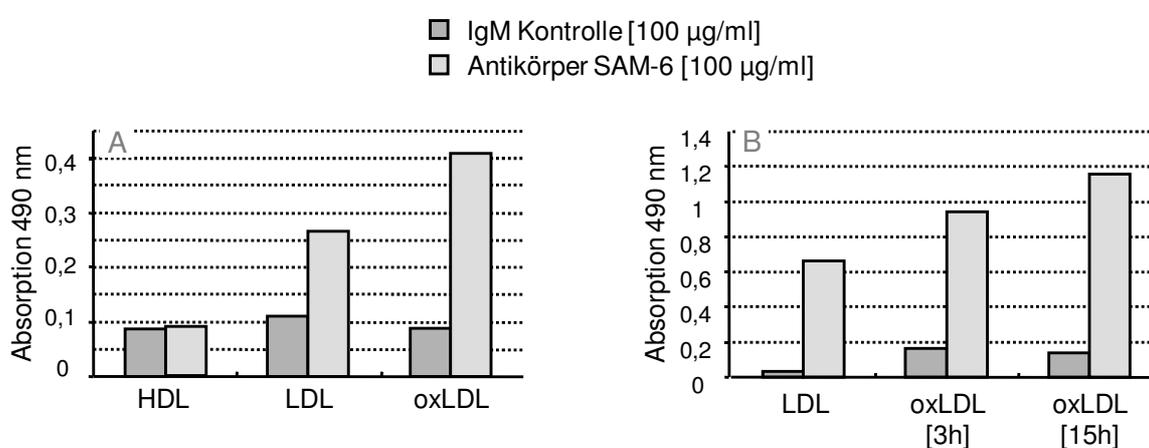


Abbildung 11: Bindung und Funktionalität des SAM-6 Antikörpers in Abhängigkeit humaner Lipoproteine. **A**, ELISA-Platten wurden mit den Lipoproteinen HDL, LDL und oxLDL vorbeschichtet und mit dem SAM-6 AK bzw. der IgM Kontrolle inkubiert. Der SAM-6 AK zeigte im Vergleich zur Isotypkontrolle eine Bindung an LDL, die nach Oxidation des LDL mit Cu^{2+} intensiviert wurde. Mit HDL konnte keine Bindung detektiert werden. **B**, Das Ausmaß der Apoptose-Induktion durch den Antikörper SAM-6 wurde in Gegenwart unterschiedlich stark oxidierten LDLs mittels des Cell Death Detection^{PLUS} ELISAs analysiert. Pankreaskarzinomzellen (BXPC-3) wurden in Gegenwart der oxidierten Lipoproteine mit SAM-6 AK oder der Isotypkontrolle für 48 Stunden inkubiert. Der Anteil an apoptotischen Zellen wurde UV-spektrometrisch bestimmt. (LDL/HDL Low/High Density Lipoprotein, oxLDL [3h/15h] LDL nach 3- und nach 15-stündiger Cu^{2+} -Oxidation, AK Antikörper)

1.2.3 Endozytose

Der SAM-6 Antikörper löst durch seine Bindung an die Oberfläche der Tumorzelle die Akkumulation von Lipiden und damit verbunden deren apoptotischen Zelltod aus. Wie bereits erläutert, bindet der SAM-6 Antikörper neben dem Antigen auf der Zelloberfläche gleichzeitig oxidiertes LDL und schleust es über einen noch nicht bekannten Mechanismus in die Zelle. Wie mehrfach in der Literatur beschrieben, werden Lipoproteine in der Regel über rezeptorvermittelte Endozytose in eine Zelle aufgenommen [170]. Um den Weg des SAM-6 Antikörpers

zu verfolgen, wurde der Antikörper und die Isotypkontrolle ChromPure IgM direkt mit Fluoreszein markiert, Pankreaskarzinomzellen für 30, 60 und 120 min inkubiert und die Aufnahme der FITC-konjugierten Antikörper über konfokale Mikroskopie verfolgt (Abbildung 12). Nach 30 min Inkubationszeit war die Anlagerung und somit die Bindung des SAM-6 Antikörpers an die Zellmembran zu beobachten (A). Nach ca. 60 min konzentrierte sich der Antikörper an einer Stelle der Membran, was sich im sog. *Capping* des Antikörpers äußerte (B). Eine weitere Stunde später war der SAM-6 Antikörper komplett internalisiert und befand sich nun in der Zelle (C). Im Gegensatz hierzu konnte bei der FITC-konjugierten Isotypkontrolle kaum eine Bindung und keine Internalisierung festgestellt werden.

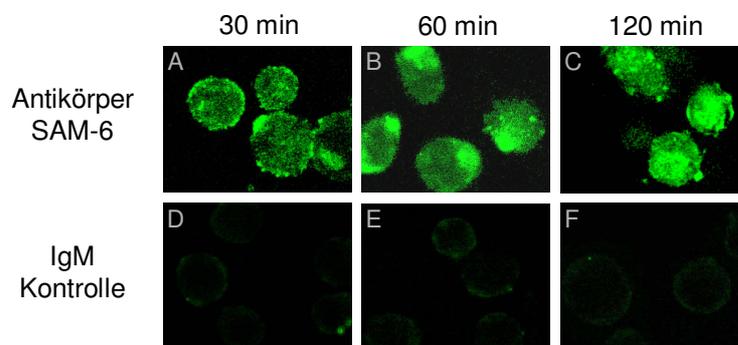


Abbildung 12: Immunfluoreszenzstudie zur Endozytose des SAM-6 Antikörpers. Pankreaskarzinomzellen (BXPC-3) wurden mit FITC-markiertem SAM-6 Antikörper bzw. Kontroll IgM inkubiert. Nach jeweils 30, 60 und 120 min wurden die Zellen auf Objektträgern fixiert und mit Hilfe der konfokalen Mikroskopie betrachtet. **A**, Der SAM-6 AK band innerhalb von 30 min an die Zelloberfläche. **B**, Nach 60 min fand eine Konzentrierung des SAM-6 AK auf der Zellmembran statt (*Capping*). **C**, Internalisierung des SAM-6 AK nach 120 min. **D-F**, Bei der Isotypkontrolle konnte keine Bindung oder Internalisierung beobachtet werden.

Diesen Beobachtungen zufolge könnte der SAM-6 Antikörper nach seiner Bindung an die Tumorzelle in der Lage sein, bereits an den Antikörper gebundenes, oxidiertes LDL indirekt in die Zelle einzuschleusen und so für einen vermehrten Transport des Lipoproteins ins Zellinnere sorgen.

1.2.4 Signalweg der SAM-6-induzierten Apoptose

Bei der SAM-6-induzierten Apoptose spielt neben der Bindung und Endozytose des Antikörpers gleichzeitig ein pathophysiologisch veränderter Lipidhaushalt der Zelle bzw. ihrer Umgebung eine entscheidende Rolle. Die erhöhte Verfügbarkeit an oxLDL scheint den Apoptose-Effekt des Antikörpers zu intensivieren. Um Hinweise zu erhalten, welche Signalwege dabei aktiviert

werden oder über welchen Weg die apoptotische Kaskade in Gang gesetzt wird, wurden die klassischen Signalwege der Apoptose, der intrinsische und der extrinsische Signalweg, genauer betrachtet. Bei der extrinsischen Signaltransduktion handelt es sich um eine rezeptorvermittelte Initiation der Apoptose, bei der intrinsischen Signaltransduktion hingegen setzt die durch unspezifische Noxen induzierte Freisetzung von Cytochrom C aus den Mitochondrien die Caspasenkaskade in Gang [173, 174].

1.2.4.1 Aktivierung Cytochrom C-abhängiger, mitochondrialer apoptotischer Ereignisse

Bei der SAM-6-induzierten Apoptose wurde zunächst direkt die Freisetzung von Cytochrom C aus den Mitochondrien analysiert. Die mitochondriale Freisetzung von Cytochrom C ins Zytosol geht der Aktivierung von Caspasen und der DNA-Fragmentierung voraus und gilt als charakteristisches Merkmal für die mitochondriale Dysfunktion in der frühen Phase der Apoptose. Dieser intrinsische Apoptoseweg wird in der Regel über exogene, schädliche Einflüsse, wie z.B. UV-Strahlung oder Chemotherapeutika, ausgelöst [174].

Für den Test wurden Pankreaskarzinomzellen für unterschiedlich lange Zeiträume mit dem SAM-6 Antikörper oder der Isotypkontrolle inkubiert. Mit Hilfe eines Sandwich-ELISA (Cytochrom C ELISA, Calbiochem) wurde aus den Zelllysaten der Gehalt an freigesetztem, mitochondrialem Cytochrom C bestimmt.

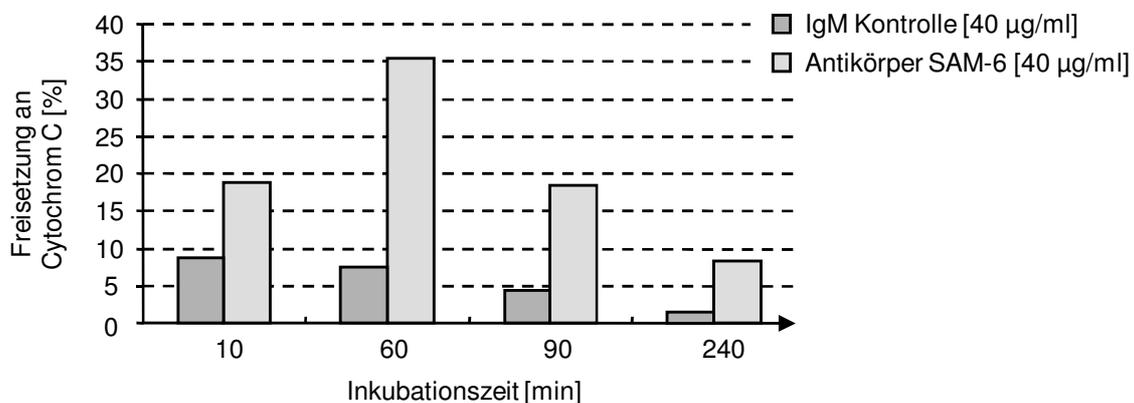


Abbildung 13: Analyse der SAM-6-induzierten Apoptose durch Messung der Cytochrom C-Freisetzung. Pankreaskarzinomzellen (BXPC-3) wurden bis zu 4 Stunden mit SAM-6 Antikörper oder IgM Kontrolle der gleichen Konzentration inkubiert. Am Ende der jeweiligen Inkubationszeit wurde die Freisetzung an Cytochrom C mit Hilfe eines ELISA quantifiziert. Die Tumorzellen wiesen verglichen mit den Kontrollzellen bereits nach 10 min einen deutlich erhöhten Gehalt an Cytochrom C auf, der nach 60 min sein Maximum erreichte. Hier lag die Cytochrom C-Freisetzung SAM-6 behandelter Zellen um 5-mal höher als die der Kontrollzellen. Innerhalb der nächsten drei Stunden fiel die Freisetzung des Cytochrom C auf die Höhe der Kontrollzellen zurück.

Abbildung 13 zeigt die zeitabhängige Freisetzung von Cytochrom C aus den Mitochondrien. Bereits nach 10 min war im Vergleich zur Isotypkontrolle ein deutlicher Anstieg an Cytochrom C um mehr als 18 % zu verzeichnen. Nach 60-minütiger Inkubation konnte ein Maximalwert von 35 % ermittelt werden, der den Wert der Kontrollzellen um ein 5-Faches übertraf. Nach weiteren 30 min fiel die Freisetzung an Cytochrom C wieder auf knapp 18 % ab und sank nach weiteren 3 Stunden bis auf 8 %. Bei einer Inkubationszeit von mehr als 4 Stunden konnten verglichen mit den Werten der Isotypkontrolle keine erhöhten Werte an Cytochrom C mehr detektiert werden. Die Daten wurden im Diagramm nicht dargestellt.

1.2.4.2 Aktivierung caspasenabhängiger Apoptosewege

Im nächsten Schritt lag das Augenmerk auf der Aktivierung von Caspase 9, die in der Regel über den intrinsischen Weg infolge der Cytochrom C-Freisetzung in einem ATP-abhängigen Prozess aktiviert wird.

Für den Test wurde ein kolorimetrischer Caspase 9 Assay Kit von Calbiochem verwendet. Bei Pankreaskarzinomzellen wurden über verschieden lange Zeiträume hinweg mit dem Antikörper SAM-6 Apoptose induziert bzw. die Zellen mit der Isotypkontrolle analog inkubiert. Anschließend wurden die Zelllysate auf die Freisetzung bzw. Aktivierung von Caspase 9 getestet, die sich in der Farbvertiefung des zugegebenen Farbsubstrats äußerte.

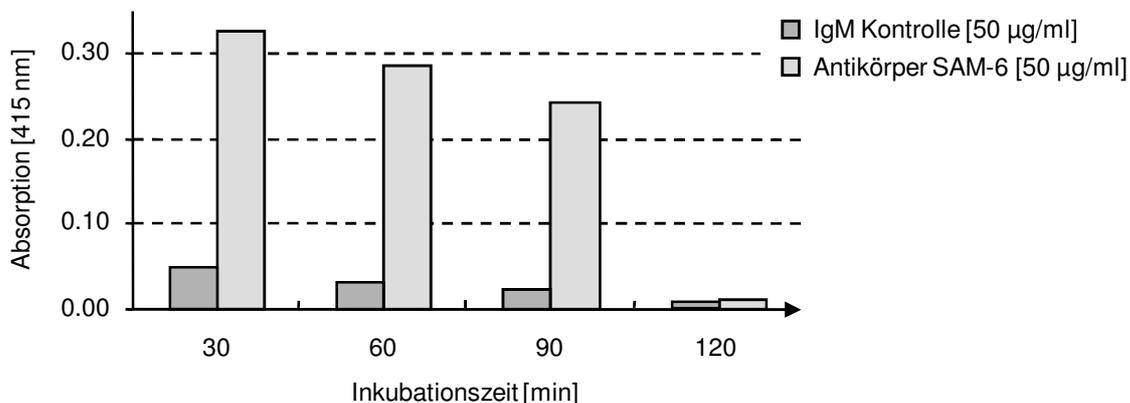


Abbildung 14: Analyse der SAM-6-induzierten Apoptose durch Messung der Caspase 9-Aktivität. Pankreaskarzinomzellen (BXPC-3) wurden bis zu 2 Stunden mit SAM-6 Antikörper oder IgM Kontrolle der gleichen Konzentration inkubiert. Am Ende der jeweiligen Inkubationszeit wurde die Aktivität der Caspase 9 mit Hilfe eines Caspase 9-Tests quantifiziert. Die Tumorzellen wiesen verglichen mit den Kontrollzellen nach 30 min eine deutlich erhöhte und gleichzeitig maximale Aktivität an Caspase 9 auf. Nach 60 und 90 min konnte eine ähnlich hohe Aktivität gemessen werden. Bei einer Inkubationsdauer von ≥ 2 Stunden fiel die Aktivität auf das Niveau der Aktivität der Kontrollzellen zurück.

Abbildung 14 ist zu entnehmen, dass im Gegensatz zur Isotypkontrolle, bereits nach 30-minütiger Inkubation mit dem SAM-6 Antikörper eine deutlich erhöhte Aktivität an Caspase 9 zu detektieren war, die zu diesem Zeitpunkt zugleich ihren Maximalwert erreichte. Nach 60- und 90-minütiger Inkubation konnte eine ähnlich hohe Aktivität an Caspase 9 detektiert werden, die nach längerer Inkubation (≥ 2 h) auf das Niveau der Kontrollzellen zurückfiel.

Caspase 9 gehört zu den Initiatorcaspasen und kann weitere Caspasen aktivieren, die sog. Effektorcaspasen. Stellvertretend für eine terminale Effektorcaspase wurde Caspase 6 gewählt, deren Aktivierung analog über die Umsetzung eines spezifischen Farbsubstrats analysiert wurde. Da es sich um eine Caspase handelt, deren Aktivität in der späten apoptotischen Phase zu erwarten ist, wurden die Zellen über einen Zeitraum von 1 bis 48 Stunden mit dem SAM-6 Antikörper inkubiert. Vergleicht man die Ergebnisse mit den Werten der Isotypkontrolle, war nach 3 Stunden ein erster deutlicher und gleichzeitig maximaler Anstieg der Caspase 6-Aktivität zu verzeichnen. Danach war ein Rückgang der Caspasen-Aktivität zu erkennen, der Gehalt an aktiver Caspase 6 blieb aber bis zu 45 Stunden stabil und über dem Gehalt der Kontrollzellen (Abbildung 15).

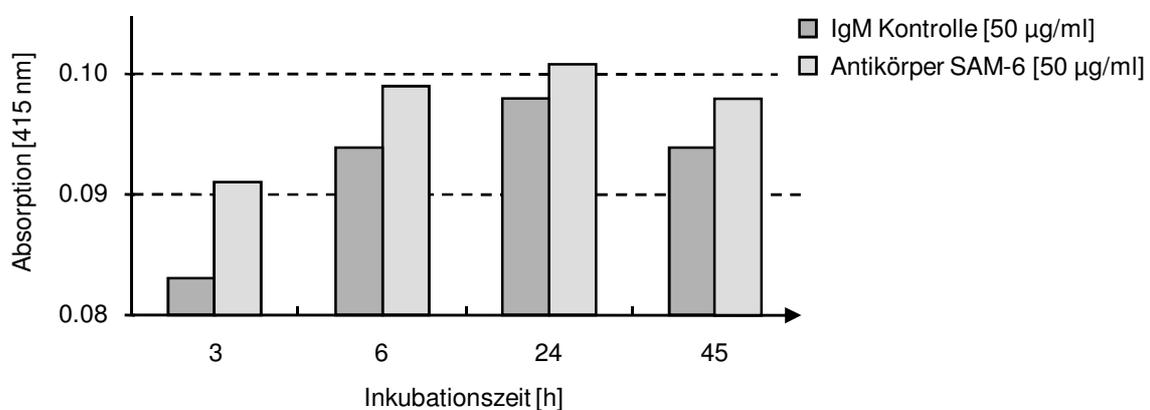


Abbildung 15: Analyse der SAM-6-induzierten Apoptose durch Messung der Caspase 6-Aktivität. Pankreaskarzinomzellen (BXPC-3) wurden bis zu 48 Stunden mit SAM-6 Antikörper oder der IgM Kontrolle der gleichen Konzentration inkubiert. Am Ende der jeweiligen Inkubationszeit wurde die Aktivität der Caspase 6 mit Hilfe eines Caspase 6-Tests detektiert. Die Tumorzellen wiesen verglichen mit den Kontrollzellen nach 3 Stunden eine erhöhte und gleichzeitig maximale Aktivität an Caspase 6 auf. Danach war ein leichter Rückgang der Caspase 6-Aktivität zu verzeichnen, sie blieb aber bis zu 45 Stunden über dem Niveau der Kontrollzellen.

Der Signalweg der SAM-6-induzierten Apoptose wurde innerhalb der eigenen Arbeitsgruppe von Angela Dreykluft (2005) im Rahmen einer Bachelor-Arbeit auf die Beteiligung weiterer Caspasen hin untersucht. Hier konnten die erläuterten Ergebnisse bestätigt und die zusätzliche Involvierung der Initiatorcaspase 8 und der Effektorcaspase 3, nicht aber der Caspase 2, festgestellt werden. Zusammenfassend dargestellt löst die rezeptorvermittelte Endozytose des SAM-6/LDL-Komplexes die Freisetzung von Cytochrom C aus den Mitochondrien und somit die Aktivierung der Caspasen 8 und 9 aus. Die beiden Initiatorcaspasen führen zur Aktivierung der Caspasen 3 und 6, die als terminale Caspasen letztendlich den apoptotischen Zelltod einleiten. Die SAM-6-induzierte Apoptose verläuft somit über einen spezifischen Signalweg, der Gemeinsamkeiten mit dem intrinsischen Signalweg aufweist, jedoch über externe pro-apoptotische Liganden angeregt wird (Abbildung 16).

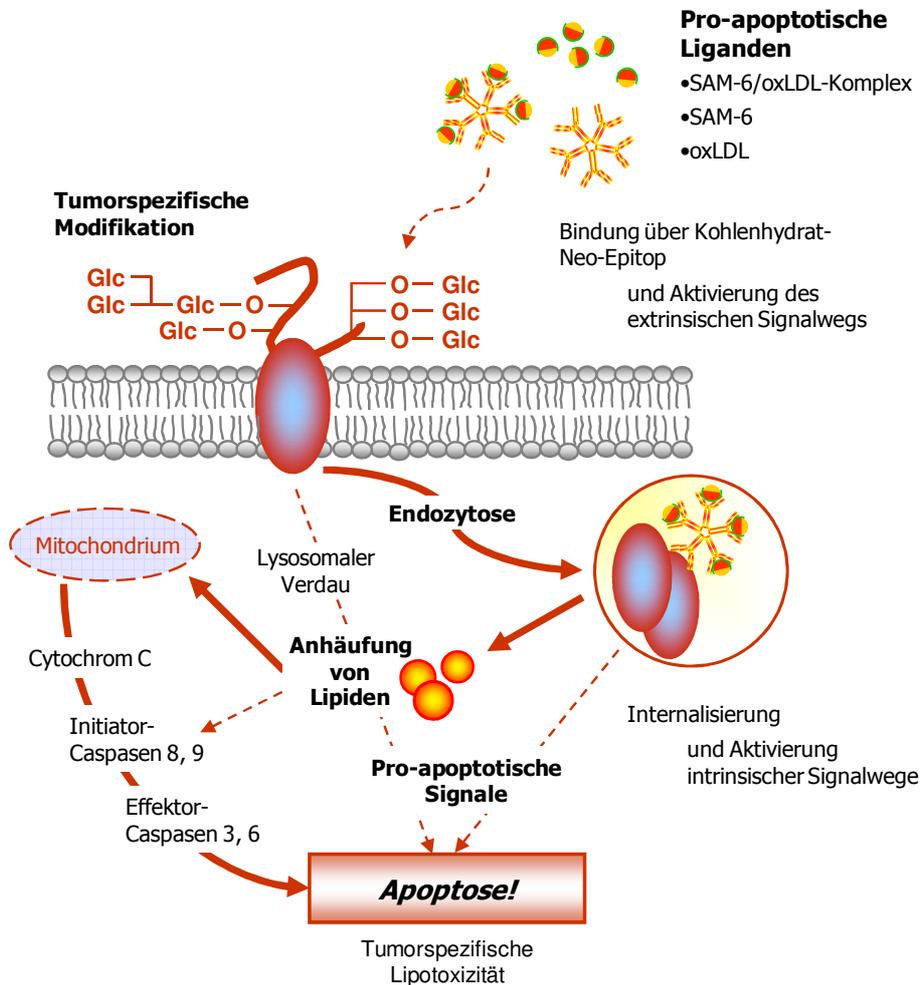


Abbildung 16: Die SAM-6-induzierte Apoptose. Ein Komplex bestehend aus dem SAM-6 Antikörper und oxLDL bindet an das SAM-6 Antigen und wird dort über rezeptorvermittelte Endozytose in die Tumorzelle aufgenommen. Es kommt zu einer Anhäufung von Lipiden, die die mitochondriale Freisetzung von Cytochrom C bewirken. Cytochrom C aktiviert die Caspasen 8 und 9, die am Ende der Caspasenkaskade die Effektorcaspasen 3 und 6 in Gang setzen, die den apoptotischen Zelltod einleiten.

2 Expression des SAM-6 Antigens

Im Rahmen der Charakterisierung des humanen monoklonalen SAM-6 Antikörpers war neben der Analyse seiner potentiellen Funktion die Klärung seiner Spezifität bzw. der spezifischen Expression seines Antigens von Bedeutung.

2.1 Tumorspezifität

2.1.1 Immunhistochemische Färbung auf Tumor- und Normalgewebe

Vergangene Arbeiten zeigten, dass der Antikörper SAM-6 ausschließlich mit Tumorzellen, nicht aber mit normalen Epithel- oder fibroblastischen Zellen reagierte [143]. Somit lag die Existenz eines Antigens nahe, welches spezifisch auf Tumorgeweben, nicht aber auf Normalgeweben exprimiert wird. Die Expression des SAM-6 Antigens wurde innerhalb der Arbeitsgruppe bereits für eine kleine Anzahl von Karzinomen beschrieben [143]. Um die tumorspezifische Expression des SAM-6 Antigens auf Geweben umfassend zu belegen, wurde die bereits bestehende immunhistochemische Studie erweitert und dabei ein breiteres Spektrum an Normalgewebe bzw. epithelalem Tumorgewebe auf die Reaktion mit dem SAM-6 Antikörper hin untersucht. Je nach Karzinomtyp wurden zwischen 4 und 37 verschiedene Fälle untersucht. Eine Zusammenfassung der Ergebnisse der immunhistochemischen Studie zeigt Tabelle 17:

Tabelle 17: Reaktivität des SAM-6 Antikörpers auf Tumorgewebe und auf normalem Gewebe

Tumor- gewebe	Karzinomtyp	SAM-6 +/-	Normal- gewebe	Zelltyp	SAM-6 +
Ösophagus	Plattenepithel	8/-	Magen	glandular	-
	Adeno (Barrett)	4/-	Kolon	epithelial	-
Magen	Adeno (diffus)	6/2	Lunge	glandular	-
	Adeno (intestinal)	10/3	Ösophagus	epithelial	-
Kolon	Adeno	5/1	Pankreas	glandular	-
Pankreas	Adeno (duktal)	18/-	Leber	glandular	-
Lunge	Adeno	36/-	Niere	epithelial	-
	Plattenepithel	37/1	Prostata	glandular	-
Brust	Invasiv (duktal)	11/-	Testis	germinal	-
	Invasiv (lobular)	5/2	Brust	glandular	-
Ovar	Adeno	11/-	Uterus	epithelial	-
Zervix	Adeno	11/3	Ovar	glandular	-
	Plattenepithel	5/2	Dünndarm	epithelial	-
Uterus	Adeno	6/3	Blase	epithelial	-
Prostata	Adeno	11/2			

Die Paraffinschnitte von Normal- und Tumorgewebe wurden entparaffiniert und mit dem SAM-6 Antikörper bzw. den Kontrollen immunhistochemisch gefärbt. Zur histologischen Begutachtung der Gewebemorphologie wurde von jedem Gewebe zusätzlich eine HE-Färbung (Hämatoxylin-Eosin) angefertigt. Die untersuchten Fälle zeigten mehrheitlich eine deutliche tumorspezifische Reaktion des Antikörpers SAM-6, wobei auf dem Gewebe, das die Tumoren umgab, in keinem der Fälle eine Färbung zu detektieren war. Um die Tumorspezifität des Antikörpers bzw. die tumorspezifische Expression seines Antigens zu untermauern, wurden zusätzlich eine Reihe von Normalgeweben immunhistochemisch untersucht und dabei von jedem Gewebe drei unabhängige Färbungen durchgeführt. Die untersuchten Normalgewebe zeigten keine Reaktion mit dem SAM-6 Antikörper. Das Expressionsmuster des SAM-6 Antigens auf Tumoren nach der Immunperoxidase-Färbung ist in **Abbildung 17** exemplarisch dargestellt.

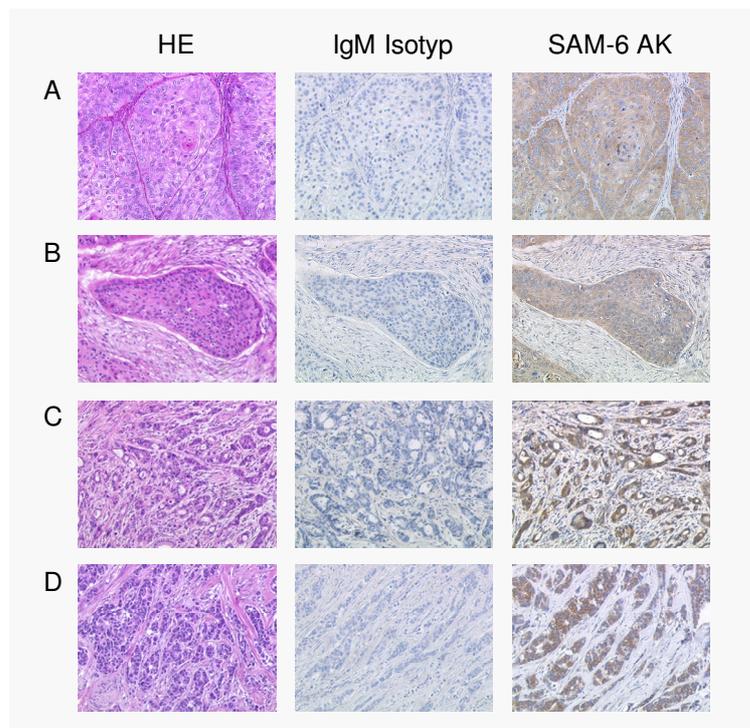


Abbildung 17: Immunhistochemische Färbung zur Analyse der Tumorspezifität des Antikörpers SAM-6 auf verschiedenen Tumoren. Paraffinschnitte von Tumorgewebe wurden mit Hämatoxylin-Eosin (HE), ChromPure IgM als Isotypkontrolle sowie SAM-6 Antikörper in der gleichen Konzentration gefärbt. **A**, Plattenepithelkarzinom der Zervix. **B**, Plattenepithelkarzinom des Ösophagus. **C**, Adenokarzinom des Pankreas. **D**, Invasiv lobuläres Karzinom der Brust. (Original Vergrößerung $\times 100$ bzw. $\times 200$)

Eine deutlich positive Färbung zeigte das zervikale (A) und das ösophageale (B) Plattenepithelkarzinom. Auch Adenokarzinome des Pankreas (C) wiesen eine spezifische Reaktion mit dem SAM-6 Antikörper auf, wenn auch hier die Färbung weniger intensiv ausgeprägt auftrat. Als letztes eindeutig positives Beispiel sei die Färbung des invasiv lobulären Karzinoms der Brust aufgeführt (D), bei der wiederum die deutliche Braunfärbung der Tumorzellen mit dem Antikörper SAM-6 zu erkennen ist. Die Färbungen mit der jeweiligen Isotypkontrolle zeigten in keinem der Fälle ein positives Ergebnis.

Zur Veranschaulichung zeigt Abbildung 19 negative Färbungen des SAM-6 Antikörpers auf normalem Ösophagus- (E) und Pankreasgewebe (F). Zusätzlich sind hier gewebespezifische Positivkontrollen (Anti human Zytokeratin 5/6 bzw. 7) dargestellt, die zu jedem Gewebe mitgeführt wurden (siehe Kapitel II, Tabelle 16). Im Falle der Tumorgewebe (A-D) wurden auf die Darstellung der Positivkontrollen verzichtet.

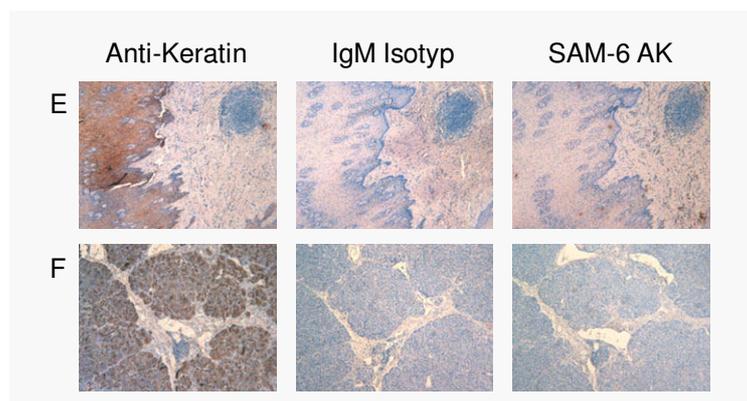


Abbildung 18: Immunhistochemische Färbung zur Analyse der Tumorspezifität des Antikörpers SAM-6 auf Normalgewebe. Paraffinschnitte von Normalgeweben wurden mit gewebespezifischer Positivkontrolle (Anti Keratin), ChromPure IgM als Negativkontrolle, sowie SAM-6 Antikörper in der gleicher Konzentration gefärbt. **E**, Normales Ösophagusgewebe. **F**, Normales Pankreasgewebe. (Original Vergrößerung x100 bzw. x200)

Der SAM-6 Antikörper zeigte eine breite Kreuzreaktion mit den unterschiedlichsten Karzinomtypen, jedoch nicht mit gesundem Gewebe. Gleichzeitig wird ersichtlich, dass es sich bei dem SAM-6 Antigen um ein membranständiges Molekül handelt, dessen tumorspezifische Expression mittels einer erweiterten immunhistochemischen Studie eindeutig bestätigt werden konnte.

2.1.2 FACS-Analyse auf Tumorepithel- und normalen Epithelzellen

Ein weiteres Indiz dafür, dass das Antigen spezifisch auf Tumorzellen nicht jedoch auf gesunden Zellen exprimiert wird, konnte durch einen Vergleich des Bindungsverhaltens des SAM-6 Antikörpers auf gesunden bzw. auf Tumorzellen mittels FACS-Analyse gewonnen werden. Um Zellen gleichen Ursprungs vergleichen zu können, wurden für diesen Versuch nasale Tumorzellen (RPMI 2650) und normale nasale Epithelzellen (HNEPc) verwendet. Wie das Histogramm in Abbildung 19 wiedergibt, konnte bei der Tumorzelllinie eine Verschiebung der Fluoreszenzintensität und damit eindeutig eine Bindung des SAM-6 Antikörpers detektiert werden. Hingegen zeigt das Histogramm der normalen Epithelzelle, bezogen auf die Isotypkontrolle, keine Bindung des Antikörpers. Hier war keine Fluoreszenzverschiebung zu verzeichnen.

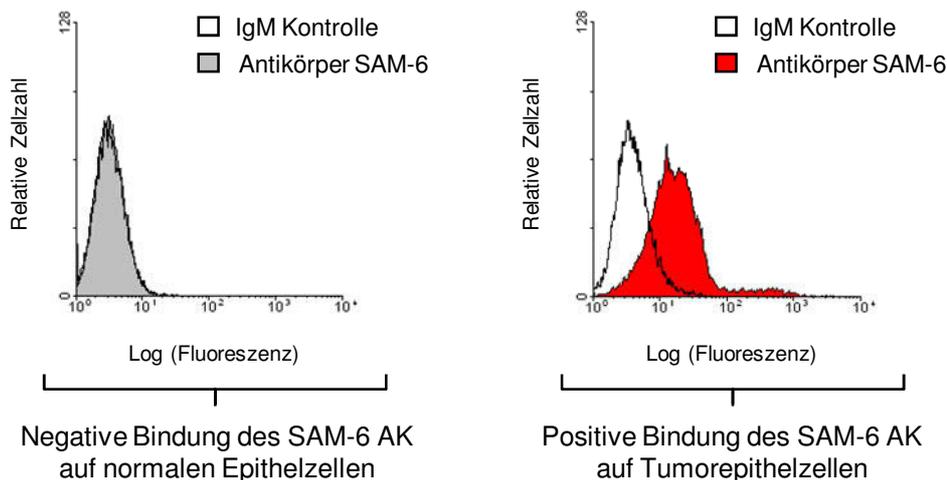


Abbildung 19: Durchflusszytometrische Analyse der Expression des SAM-6 Antigens auf der Oberfläche verschiedener Zelllinien. Die epithelialen Zelllinien HNEPc (Plattenepithel der Nase) und RPMI 2650 (Plattenepithelkarzinom der Nase) wurden mit 100 µg/ml SAM-6 AK bzw. der Isotypkontrolle ChromPure IgM inkubiert und nach anschließender Inkubation mit FITC-gekoppelten Sekundärantikörper mit der FACS-Analyse die Bindung der Antikörper beurteilt.

3 Isolierung und Identifizierung des SAM-6 Antigens

3.1 Western Blot-Analyse auf Tumorzellmembranextrakten

Bereits bei der immunhistochemischen Untersuchung wurde beobachtet, dass überwiegend Membranen und nicht Zytoplasma oder Kerne positiv mit dem Antikörper reagierten. Zusätzlich konnte mit Hilfe der FACS-Analyse die tatsächliche Lokalisation des SAM-6 Antigens auf der Zelloberfläche bestätigt werden. Daher stellte die Extraktion der Membranproteine der Tumorzellen die Basis zur Identifizierung des potentiellen SAM-6 Antigens dar.

Zu Beginn der vorliegenden Arbeit wurde für den SAM-6 Antikörper in der Literatur bereits ein ca. 140 kD großes Protein als potentielles Antigen auf den Tumorzellen postuliert, das nach Western Blot-Analyse von Membranextrakten mit dem SAM-6 Antikörper detektiert werden konnte [143]. Das Protein wurde nach massenspektrometrischer Analyse als nukleäre DNA-Helikase identifiziert (Akzessionsnummer: CAA71668.1), wobei 30 % der vermessenen Peptidfragmente mit einer Wahrscheinlichkeit von $p=1,0$ diesem Protein zugeordnet werden konnten. DNA-Helikasen spielen vor allem bei der Replikation des Genoms eine Rolle, indem sie durch das Entwinden von Einzelsträngen die Verdopplung der DNA initiieren und sind demzufolge im Zellkern lokalisiert. Das Protein mit einem Molekulargewicht von 140 kD erwies sich daher als Verunreinigung aus Kernbestandteilen, die aus einer nicht optimalen Membranpräparation resultierte. Eine solche Verunreinigung kann durch zu forsches Homogenisieren des Gesamtzellextraktes während der Membranpräparation entstehen, wobei Zellkerne und Organellen unbeabsichtigt aufbrechen und dabei ihre Bestandteile freisetzen, die anschließend über Mischmizellen in die Membranfraktion gelangen.

Daher wurde zunächst auf die Herstellung einer optimalen Membranfraktion Wert gelegt, um eine spezifische Extraktion von Membranproteinen zu erreichen und gleichzeitig die Solubilisation unspezifischer Proteine zu reduzieren. Die Membranproteine, die nur zu einem sehr geringen Anteil in einer Zelle zu finden sind, sollten in möglichst reiner und konzentrierter Form aufbereitet werden.

3.2 Optimierung der Membranpräparation

Mit Hilfe der beschriebenen Differentialzentrifugation (fraktionierte Zentrifugation, siehe Kapitel II-2.3.1.1) wurden aus Karzinomzellen (23132/87 und BXP-3) mikrosomale Membranpellets angefertigt, die zur Extraktion der gewünschten Membranproteine mit

verschiedenen Extraktionspuffern (Membranlysepuffer oder modifizierter Lysepuffer) versetzt wurden. Die Extraktionspuffer unterschieden sich entweder in ihrer Salzkonzentration und/oder in ihrer Zusammensetzung an Detergenz. So sollte eine saubere und spezifische Extraktion der gewünschten Membranproteine aus der Membranfraktion erreicht werden und gleichzeitig die Solubilisierung unspezifischer Proteine verhindert werden.

Da Triton X100 als nicht-ionisches Detergenz für die Bildung großer Mizellen bekannt ist, wurde neben den ursprünglich verwendeten Triton X100-haltigen Extraktionspuffern auch die Detergenzien Octylthioglucopyranosid (OTG), Nonidet P-40 (NP-40), Cholsäure oder deren Kombinationen getestet, um die Extraktion der Membranproteine aus dem mikrosomalen Pellet zu verbessern. Die verschiedenen Membranextrakte wurden mittels der Western Blot-Analyse auf die Reaktion mit dem SAM-6 Antikörper getestet. Zu Kontrollzwecken wurde jeweils ein zweiter Blot nach Inkubation mit der IgM Kontrolle (ChromPure IgM) entwickelt. Trotz des Einsatzes der unterschiedlichsten Extraktionspuffer konnte kein ausschlaggebender Unterschied im Extraktionsverhalten der Proteine beobachtet werden. Lediglich die anfangs erwähnte Verunreinigung (140 kD) konnte nicht mehr detektiert und somit eliminiert werden. Abbildung 20 zeigt auszugsweise die Ergebnisse der Western Blot-Analyse mit dem SAM-6 Antikörper auf Membranextrakten der Tumorzelllinien BXPC-3 und 23123/87 nach fraktionierter Zentrifugation und Extraktion mit Triton X100.

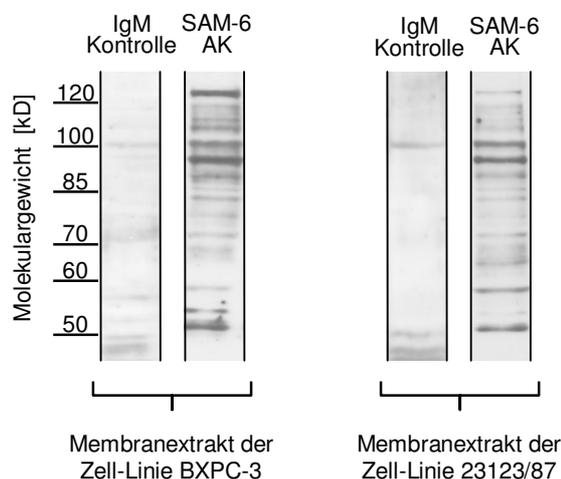


Abbildung 20: Western Blot-Analyse mit dem SAM-6 Antikörper (SAM-6 AK) auf Membranextrakten der Tumorzelllinien BXPC-3 und 23123/87. Membranproteine wurden nach fraktionierter Zentrifugation mit Triton X100-haltigem Puffer (Membranlysepuffer) extrahiert und nach elektrophoretischer Auftrennung auf eine Nitrozellulosemembran transferiert. Die Detektion der Proteinbanden erfolgte nach Inkubation mit dem SAM-6 AK bzw. humanem Chrompure IgM (IgM Kontrolle) und peroxidasegekoppeltem Sekundärantikörper (Maus Anti human IgM) mittels Chemolumineszenz.

In den Extrakten der Zelllinie 23123/87 und BXPC-3 konnten mehrere Proteinbanden detektiert werden. Signale bei 50 und 60 kD wurden als unspezifisch betrachtet, da sie mittels Massenspektrometrie als Bestandteile humaner Keratine identifiziert wurden (Keratin 1, NP006112, 30 % Übereinstimmung der analysierten Massen) und bei der Western Blot-Analyse mit dem Isotypen ChromPure IgM eine positive Reaktion zeigten. Daraufhin wurden zwei deutliche Banden im Bereich von 90 und 100 kD genauer betrachtet und massenspektrometrisch analysiert. Ersteres Protein wurde als nukleärer Zellbestandteil, das heterogene Ribonukleoprotein U, Isoform B (NP004492, 90 kD), identifiziert, wobei 37 % der analysierten Peptidfragmente mit einer Wahrscheinlichkeit von $p=1,0$ übereinstimmten. Letzteres konnte dem Endoplasmin oder Hitzeschockprotein GP96-Vorläufer (*Glucose Regulated Protein Precursor*, AAK74072, 90 kD) zugeordnet werden. Das Protein gehört zur Familie der 90 kD Hitzeschockproteine und ist in der Literatur für seine löslichen Eigenschaften bekannt [175]. Demnach ist hier wiederum auf eine nicht ausreichende Trennung bzw. Verschleppung einzelner löslicher Fraktionsbestandteile während der Membranpräparation zurückzuschließen. Zusätzlich deutet das Ergebnis des Western Blots auf ein oligoreaktives Verhalten des SAM-6 Antikörpers hin, der demnach kein einzelnes spezifisches Antigen, sondern Träger spezifischer Muster zu erkennen scheint.

Neben den erwähnten Proteinbanden wurden zusätzlich Banden im Bereich von 70, 80 und 120 kD detektiert, die bis dahin nicht näher betrachtet wurden. Obige Versuche verdeutlichten, dass ein erneuter Identifizierungsversuch des SAM-6 Antigens die weitere Optimierung der Membranpräparation, inklusive einer eindeutigen Aussage des Western Blots, voraussetzte. Nachdem die Methode der Differentialzentrifugation keine spezifische und ausreichend reine Extraktion der Membranproteine gewährleisten konnte, wurden die Membranproteine mit Hilfe des *ProteoExtract™ Native Membrane Protein Extraction Kit* (ProteoExtract™-Methode) in nativer Form extrahiert. Auf schnelle und schonende Weise konnten so in einer zweistufigen Extraktion integrale Membranproteine bzw. membranständige und membranassoziierte Antigene sauber und spezifisch solubilisiert und in deutlich angereicherter Form aus den Tumorzellen gewonnen werden. Nach der Extraktion mit der ProteoExtract™-Methode wurde in der ProteoExtract™-Membranfraktion im Western Blot mit dem SAM-6 Antikörper eine deutliche Bande mit einem Molekulargewicht von 82 kD detektiert werden.

Interessanterweise konnten die bereits analysierten Proteine im Bereich von 90 und 100 kD nach der Extraktion mit der ProteoExtract™-Methode nicht mehr in der Membranfraktion detektiert werden. Die Identität des Endoplasmins wurde nach der Aufreinigung löslicher Fraktionen, die über die ProteoExtract™-Methode gewonnen wurden, bestätigt (in freundlicher Zusammenarbeit mit Dr. Werner Schmitz, Arbeitsgruppe Prof. E. Conzelmann, Institut für

Physiologische Chemie II, Universität Würzburg). Lösliche und zytoplasmatische Bestandteile (lösliche Fraktion) wurden demnach klar abgetrennt und die damit verbundenen unspezifischen Signale in der Membranfraktion vermieden bzw. auf Signale reduziert, die auf isotypische Eigenschaften zurückzuführen sind. Da diese schnelle und schonende Methode der Membranextraktion keine Sonifikation verlangte, wurde gleichzeitig die Gefahr zytoblastischer Verunreinigungen reduziert. Abbildung 21 zeigt zusammenfassend die Ergebnisse der Optimierung der Membranpräparationen auf 23123/87 Kolonkarzinomzellen.

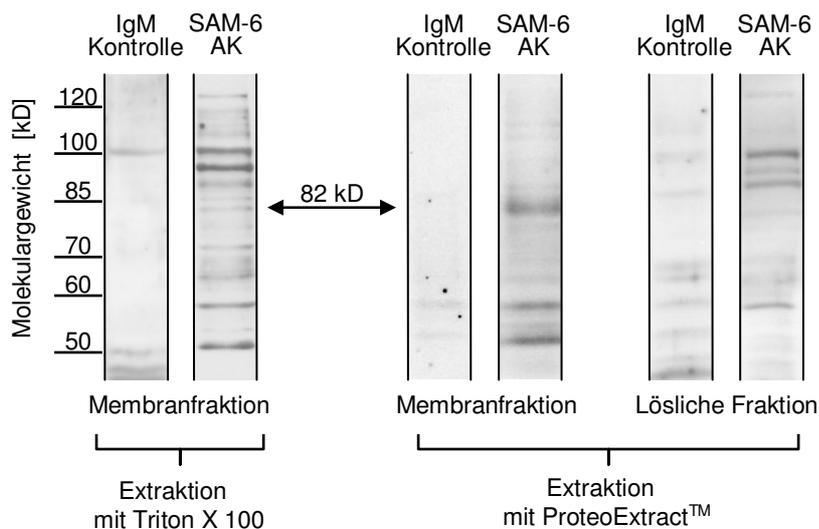


Abbildung 21: Western Blot-Analyse mit AK SAM-6 auf Membranproteinextrakten der Zelllinie 23123/87. Nach Optimierung der Membranpräparation mittels der ProteoExtract™-Methode war eine klare Abtrennung löslicher Proteine von Membranproteinen und membranassoziierten Proteinen zu erkennen. Hingegen waren in der Membranfraktion, die nach fraktionierter Zentrifugation und Triton X100-Extraktion hergestellt wurde, viele lösliche Proteine in der Membranfraktion zu detektieren.

Da bei dieser Methode neben der Anreicherung des gewünschten Antigens (ca. 82 kD) auch die zytoplasmatischen und zytoblastischen Verunreinigungen reduziert werden konnten, wurde das Antigen ausschließlich aus Membranextrakten isoliert, die mit Hilfe des *ProteoExtract™* *Native Membrane Protein Extraction Kits* (ProteoExtract™-Methode) extrahiert wurden.

3.3 Chromatographische Aufreinigung des SAM-6 Antigens aus Tumormembranextrakten

Die komplexen Rohextrakte (ProteoExtract™-Membranextrakte, Kapitel II-2.3.1.2) wurden über ein zweistufiges chromatographisches Verfahren (Größenausschluss- und Ionenaustausch-

chromatographie) mit anschließender Gelelektrophorese weiter aufgereinigt. Neben dem Abtrennen störender Fremdproteine und Salze, musste eine ausreichend hohe Anreicherung des gewünschten Antigens erzielt werden. Aus Vorversuchen wurde deutlich, dass eine Reinigung des Antigens mittels Affinitätschromatographie oder Immunpräzipitation mit monoklonalen IgM-Antikörpern nur bedingt geeignet ist. Dementsprechend bestand der erste Schritt aus einer Fraktionierung der enthaltenen Proteine nach ihrem Molekulargewicht über eine gelchromatographische Säule. Im zweiten Schritt wurden die antigenhaltigen Proteinfraktionen über Ionenaustauschchromatographie weiter aufgetrennt und dabei gleichzeitig aufkonzentriert. Für die anstehende Identifizierung, d.h. Sequenzierung der gewünschten Proteinbande mittels Massenspektrometrie, war eine Proteinmenge nötig, die im Polyacrylamidgel eindeutig mittels Coomassie-Färbung detektiert und zudem klar abgetrennt von störenden Fremdproteinen aus dem Gel ausgeschnitten werden konnte.

3.3.1 Gelfiltrationschromatographie

Die Membranextrakte wurden im nächsten Reinigungsschritt über eine Gelfiltrationssäule (Superdex™ 200) gegeben, um hochmolekulare Proteine bzw. Proteinmizellen von niedermolekularen Bestandteilen zu trennen.

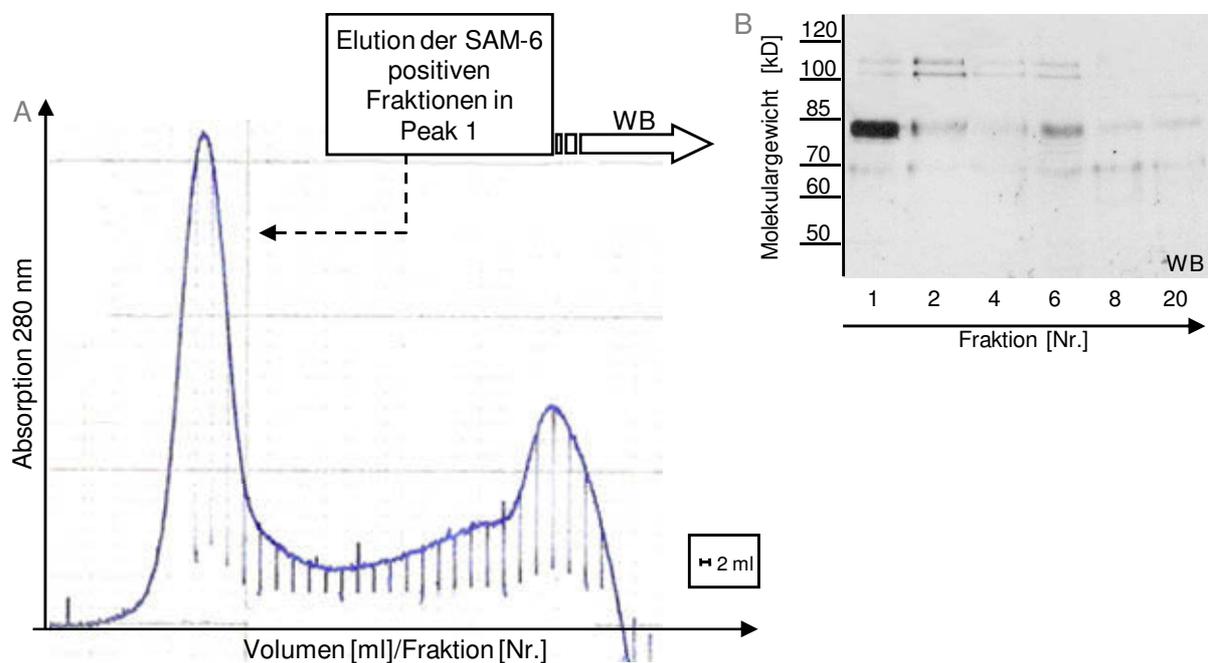


Abbildung 22: Gelchromatographie mit Membranproteinextrakt der Kolonkarzinomzelllinie 23123/87. **A**, Chromatogramm der Gelfiltration. 10 mg Proteinextrakt wurden über Superdex 200 bei einer Flußrate von 1 ml/min eluiert. Die Detektion fand bei 280 nm. **B**, Western Blot mit SAM-6 AK. Die eluierten Fraktionen wurden mittels der Western Blot-Analyse auf die positive Reaktion mit dem SAM-6 Antikörper (Primärantikörper) hin untersucht.

Die einzelnen Fraktionen wurden nach elektrophoretischer Trennung im Western Blot auf die Bindung mit dem SAM-6 Antikörper untersucht. Die Elution des 82 kD Proteins fand im ersten detektierbaren Peak statt (Abbildung 22).

Um die Ausbeute zu erhöhen, wurde die Gelfiltration bis zu 10-mal mit jeweils 10 mg Proteinextrakt unter analogen Bedingungen durchgeführt. Die jeweiligen antigenhaltigen Fraktionen (Peak 1) wurden vereint und weiter verarbeitet.

3.3.2 Anionenaustauschchromatographie

Um das potentielle Antigen aus den vorgereinigten Membranextrakten weiter aufzureinigen und zu konzentrieren, wurde die Ionenaustauschchromatographie gewählt. Auf Vorversuchen basierend wurden die antigenhaltigen Fraktionen aus jeweils 10 Gelfiltrationen auf eine Anionenaustauschersäule (Sephacrose™ Q XL) aufgetragen.

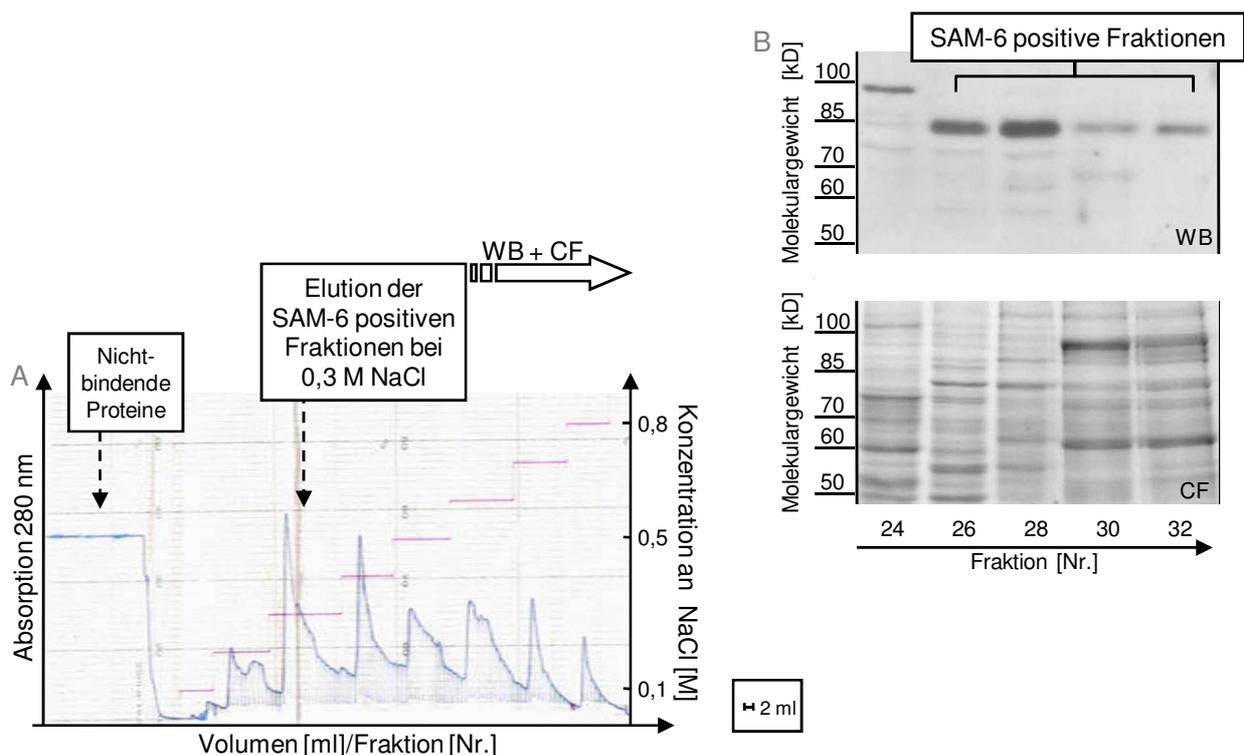


Abbildung 23: Anionenaustauschchromatographie mit durch Gelfiltration vorgereinigten Membranproteinextrakten der Kolonkarzinomzelllinie 23123/87. **A**, Elutionsprofil der Anionenaustauschchromatographie (AAC). Vorgereinigte Membranextrakte aus 10 Gelfiltrationen wurden über einen Anionenaustauscher (Sephacel Q XL) bei einer Flußrate von 1 ml/min eluiert. Die Detektion fand bei 280 nm statt. **B**, Coomassie-Färbung (CF) und Western Blot (WB) mit SAM-6 Antikörper. Die eluierten Fraktionen wurden elektrophoretisch aufgetrennt und mittels der Western Blot-Analyse auf die Reaktion mit dem SAM-6 Antikörper hin untersucht bzw. die entsprechenden Proteine mittels Coomassie-Färbung sichtbar gemacht.

Nach Auswaschen ungebundener Bestandteile wurde mit einem Salzgradienten (0 bis 800 mM NaCl) stufenweise eluiert (siehe Abbildung 23A). Aliquote der einzelnen Fraktionen wurden nach der Acetonfällung elektrophoretisch aufgetrennt und im Western Blot auf die Bindung mit dem SAM-6 Antikörper hin untersucht. Die Elution des 82 kD Proteins fand in der dritten Stufe des Gradienten bei einem Salzgehalt von ca. 300 mM NaCl statt. Im Western Blot wurde die deutliche Anreicherung des 82 kD Proteins bestätigt (siehe Abbildung 23B).

Für die Sequenzierung des potentiellen Antigens wurde ein Aliquot des Eluats elektrophoretisch aufgetrennt und die darin enthaltenen Proteine mittels Coomassie-Färbung sichtbar gemacht. Das dem Signal des Western Blots entsprechende Protein lag ausreichend weit getrennt von störenden Fremdproteinen vor und konnte für die Sequenzierung kontaminationsfrei aus dem Polyacrylamidgel isoliert werden (Abbildung 24).

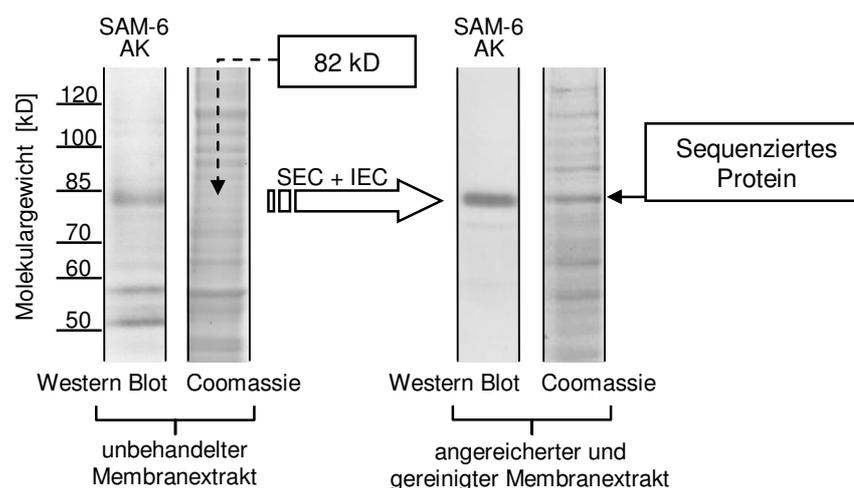


Abbildung 24: Ergebnis der chromatographischen Aufreinigung des SAM-6 Antigens aus Kolonkarzinomzellen 23123/87. Nach der Chromatographie lag das Antigen ausreichend konzentriert und isoliert von Fremdproteinen vor, und wurde aus dem Coomassie gefärbten Gel ausgeschnitten und zur Sequenzierung mittels Massenspektrometrie eingereicht. (SEC Größenausschlusschromatographie, IEC Ionenaustauschchromatographie)

3.4 Sequenzierung und Identifizierung des SAM-6 Tumorantigens

Die Identifizierung der isolierten Proteinbande erfolgte durch Massenspektrometrie und wurde von der Firma TopLab in Martinsried über das sog. Peptidmassen-Fingerprinting durchgeführt. Nach Verdau und Analyse der 82 kD Bande lieferte die Suche in der Sequenzdatenbank mehrere Treffer, die basierend auf übereinstimmenden tryptischen Peptidfragmenten mit einer

Wahrscheinlichkeit von $p=1,0$ zugeordnet werden konnten. Die indizierten Treffer wurden mit Hilfe des *Basic Local Alignment Search Tool* (BLAST) auf Homologien untersucht. Dabei wiesen die jeweiligen Sequenzen sowohl auf Proteinebene, als auch auf der Ebene der Nukleotidsequenz eine 100%ige Homologie auf. Die unterschiedlichen Einträge der Datenbanken (Akzessionsnummern: NP005338, CAB71335, AAH202351 und AAF42836) beschrieben nicht nur ein homologes, sondern ein identisches Protein.

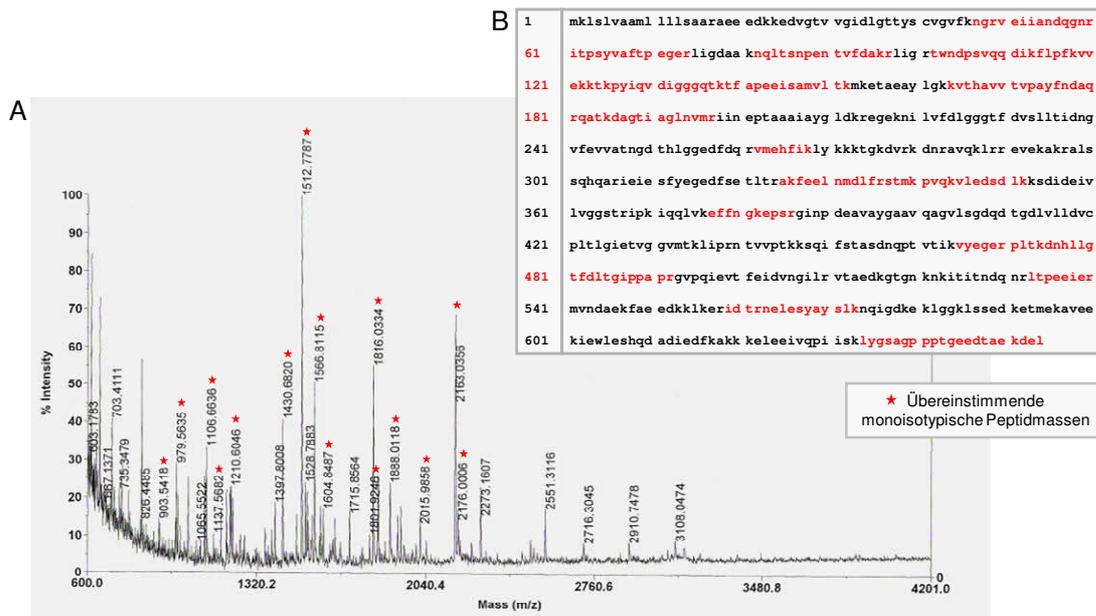


Abbildung 25: Identifizierung des SAM-6 Antigens durch Massenspektrometrie. A, Spektrogramm nach massenspektrometrischer Analyse des potentiellen SAM-6 Antigens. Die Bande mit einem Molekulargewicht von 82 kD wurde mit Trypsin verdaut und die Massen der tryptischen Peptidfragmente auf Übereinstimmungen mit bekannten Proteinen hin analysiert. Die Suche in Sequenzdatenbanken ergab humanes GRP78 (*Glucose Regulated Protein 78 kD*, Akzessionsnummer: NP005338) als den wahrscheinlichsten Treffer. Mit einer Wahrscheinlichkeit von $p=1,0$ und einer Sequenzüberlappung entsprechender Aminosäuren von mindestens 35 % konnte humanes GRP78 eindeutig identifiziert werden. Die Peptidmassen stimmten mit einer Genauigkeit kleiner 100 ppm überein. Experimentell ermittelte Peptidmassen, die den theoretischen Massen der tryptischen Peptide von humanem GRP78 entsprachen, sind im Spektrogramm mit einem Stern gekennzeichnet. **B,** Graphische Darstellung der experimentell ermittelten Peptidsequenzen gegen die Aminosäuresequenz von humanem GRP78 der Datenbank (NCBI/NP005338). Übereinstimmende, experimentell ermittelte Peptidsequenzen sind rot dargestellt und entsprechen im Spektrogramm den mit einem Stern gekennzeichneten Signalen.

Demnach wurde das humane Protein GRP78 (*Glucose Regulated Protein 78 kD*) als wahrscheinlichster Treffer identifiziert. Dabei konnten 21 der ermittelten Peptidmassen humanem GRP78 zugeordnet werden, wobei die Aminosäuresequenz zu einem Anteil von 35 % abgedeckt zugeordnet werden konnte. Die Massen der Peptidfragmente des Antigens

stimmten mit den errechneten Massen der tryptischen Peptide von GRP78 mit einer Genauigkeit kleiner 100 ppm überein. Das ermittelte Spektrogramm ist in Abbildung 25 zu sehen. Fragmente, die humanem GRP78 zugeordnet werden konnten, wurden mit einem Stern versehen. Zur Veranschaulichung wurden die experimentell gewonnen Peptidsequenzen mit der Proteinsequenz von GRP78 aus der Datenbank (NCBI/NP005338) vergleichend dargestellt. Die rot markierten Sequenzen repräsentieren die im Spektrogramm mit Sternen markierten Peptidbruchstücke.

Aufgrund der Anzahl an zugeordneten Peptiden (21 Fragmente) und der hohen Sequenzüberlappung (35 %) konnte das 82 kD Protein eindeutig dem humanen Protein GRP78 zugeordnet und somit identifiziert werden.

4 Untersuchungen zur Verifizierung des SAM-6 Zielproteins

GRP78, auch bekannt als BiP (*Immunglobulin Binding Protein*) oder HSPA5 (*Heat Shock 70 kD Protein 5*), gehört zur Familie der 70 kD Hitzeschockproteine (HSP70) und war bisher als Schutzmolekül und wichtiges Chaperon des Endoplasmatischen Retikulums bekannt. Neueste Studien beschrieben im Zusammenhang mit Tumorerkrankungen die Überexpression von GRP78 und dessen Expression auf der Tumorzelloberfläche [176, 177].

Um die ermittelte Identität des potentiellen SAM-6 Antigens zu bekräftigen, wurde die Methode der RNA-Interferenz gewählt, bei der es zum induzierten Abbau der Ziel-RNA und letztendlich zur Hemmung der Proteinexpression des Zielmoleküls GRP78 kommt [178]. Im Anschluss wurde analysiert, ob die Proteinrepression von oberflächenständigem GRP78 die Funktionalität des SAM-6 Antikörpers beeinflusst.

4.1 Effekt des Protein-*Knock-Down* von GRP78 auf die Bindung des SAM-6 Antikörpers

4.1.1 FACS-Analyse

Mit Hilfe der FACS-Analyse mit kommerziell erhältlichem Antikörper gegen humanes GRP78 wurde die Existenz von GRP78 auf der Oberfläche vitaler Tumorzellen bestätigt. Hierbei fiel auf, dass der Antikörper, der gegen das N-terminale Ende von GRP78 (ET-21, AS 71-91) gerichtet war, eine eindeutig positive Bindung ergab, nicht jedoch der, der das C-terminale Ende des Proteins (GL-19, AS 636-654) erkannte. Für folgende Bindungsstudien wurde deshalb der Antikörper gegen das N-terminale Ende des Proteins verwendet. Abbildung 26 zeigt die Bindung des Anti GRP78 Antikörpers und des SAM-6 Antikörpers auf Pankreaskarzinomzellen (BXPC-3).

Um die ermittelte Identität des potentiellen SAM-6 Antigens weiter zu bekräftigen, wurde die Expression des Zielmoleküls mit Hilfe der siRNA-Technologie transient blockiert (*Protein-Knock-Down*). Mit Hilfe des kommerziellen Anti GRP78 Antikörpers (ET-21) wurde mittels der FACS-Analyse die Repression von membranständigen GRP78 überprüft und simultan das Bindungsverhalten des SAM-6 Antikörpers auf GRP78-defizienten Zellen quantifiziert. Zur Quantifizierung wurde die Bindung der jeweiligen Primärantikörper auf unbehandelten Kontrollzellen einer maximalen Antigendichte von 100 % gleichgesetzt, die damit gleichzeitig die Bindung an Tag 0 der Transfektion repräsentierten (siehe Abbildung 27).

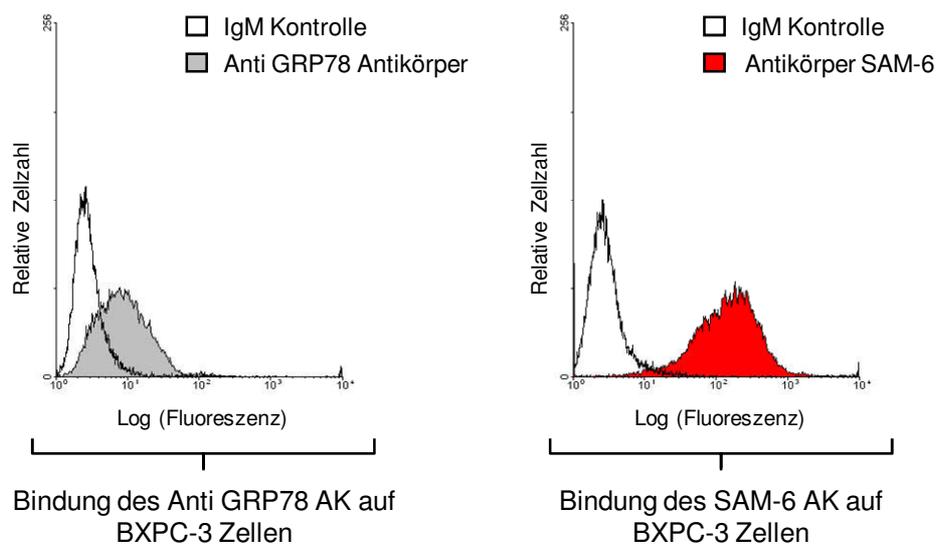


Abbildung 26: FACS-Analyse mit Anti GRP78 und SAM-6 Antikörper. Die positive Bindung von Anti GRP78 AK und SAM-6 AK bestätigte die Expression von GRP78 und des SAM-6 Antigens auf der Zelloberfläche von Pankreaskarzinomzellen (BXPc-3).

Um nicht-spezifische und zytotoxische Effekte, die durch Transfektionsreagenzien und RNA-Buchstücke hervorgerufen werden können, auszuschließen, wurden mehrere Negativkontrollen mitgeführt. Hier wurden unbehandelte Zellen, Mock-Transfektanten und Zellen transfiziert mit unspezifischer siRNA (Kontroll-siRNA, *SilencerTM Negative Control* siRNA) eingesetzt und auf die Bindung mit dem jeweiligen Antikörper hin untersucht. Stellvertretend ist in Abbildung 27 das Ergebnis der FACS-Analyse auf Zellen, die mit unspezifischer siRNA (*Negative SilencerTM* siRNA) transfiziert wurden, dargestellt. Sowohl Anti GRP78 als auch der SAM-6 Antikörper wiesen über den gesamten Inkubationszeitraum hinweg eine nahezu unveränderte Bindungseigenschaft auf (bezogen auf nicht transfizierte Zellen, Tag 0). Als weitere Kontrolle kam bei der FACS-Analyse ein Anti Human CD55 Antikörper zum Einsatz (Abbildung 27). Durch diesen zusätzlichen Antikörper gegen den Oberflächenrezeptor CD55 wurde die Unversehrtheit der Zellmembran am Ende der Transfektion überprüft. Hier konnte gezeigt werden, dass der Prozess des *Gene-Silencing* keinen Einfluss auf die Bindung des Anti CD55 und somit auf die Expression anderer Oberflächenmoleküle hatte. Pankreaskarzinomzellen, die mit GRP78 siRNA transfiziert wurden, zeigten mit dem Anti GRP78 Antikörper eine deutliche Reduktion der Bindungsintensität, die am dritten Tag nach der Transfektion ein Maximum von 76 % erreichte. Die verringerte Dichte an GRP78 auf der Zelloberfläche beeinflusste gleichzeitig das Bindungsverhalten des SAM-6 Antikörpers. Im Verlauf der Transfektion kam es auch hier zu einer deutlichen Abnahme der Bindungsintensität, die am dritten Tag die maximale Reduktion von 70 % erreichte (Abbildung 27). Hingegen konnte bei der FACS-Analyse mit dem

Anti CD55 Antikörper keine Abnahme der Bindung ermittelt werden. Hieraus lässt sich wiederum folgern, dass weitere Oberflächenstrukturen der behandelten Zellen während des Transfektions-Prozesses nicht affektiert wurden.

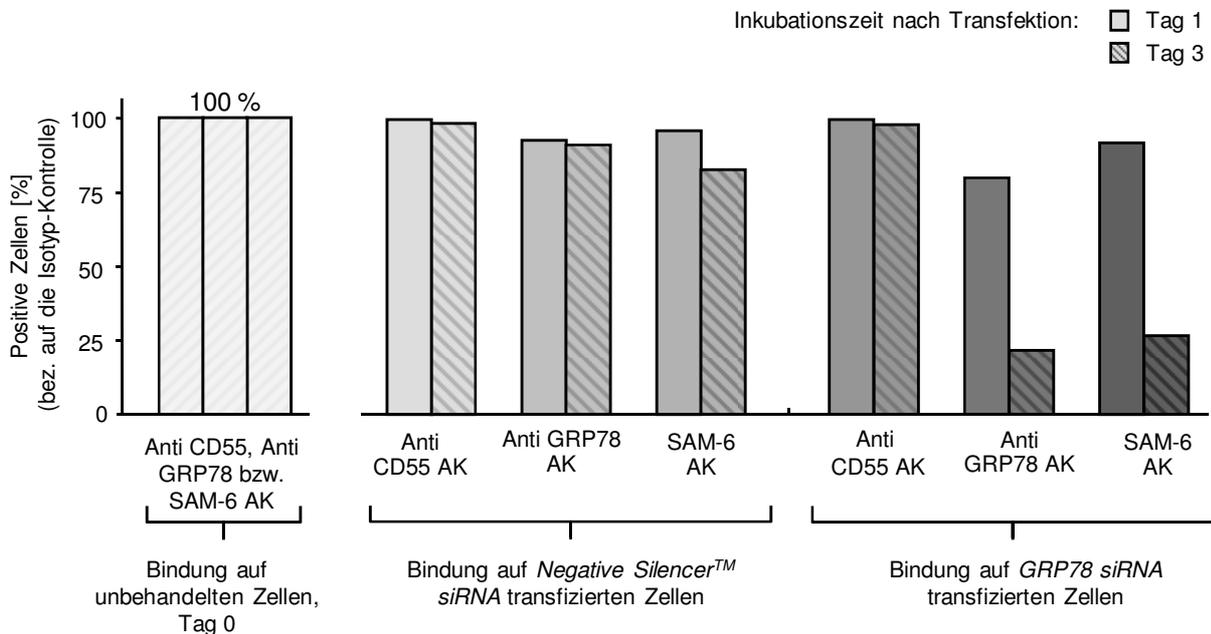


Abbildung 27: Einfluss der Oberflächenexpression von GRP78 auf die Bindung des SAM-6 Antikörpers. BXP3-3 wurden über einen Zeitraum von 3 Tagen mit GRP78 spezifischer siRNA bzw. Kontroll-siRNA (*Negative Silencer*TM siRNA) transfiziert und die Proteinrepression mittels FACS-Analyse mit SAM-6 und Kontroll-Antikörpern gegen deren Isotypkontrollen quantifiziert. Dargestellt ist der prozentuale Anteil positiv gebundener Zellen bezogen auf unbehandelte Kontrollzellen (100 %, Tag 0). Zellen, die mit der Kontroll-siRNA transfiziert wurden, wiesen über den kompletten Inkubationszeitraum hinweg eine nahezu unverändert starke Bindung aller Antikörper auf. Zellen, die mit siRNA gegen GRP78 transfiziert wurden, zeigten nach Tag 1 kaum eine Änderung im Bindungsverhalten der Antikörper (Silencing auf RNA-Ebene). Nach weiteren 48 Stunden (Tag 3), war eine deutliche Abnahme der Fluoreszenzintensität und damit der Bindung des Anti GRP78 (-76 %) und des SAM-6 Antikörpers (-70 %) zu beobachten.

Den Ergebnissen zufolge, ist GRP78 eindeutig ein Zielprotein des SAM-6 Antikörpers und für die Bindung des SAM-6 Antikörpers essentiell.

Als Positivkontrolle wurde Cy3TM-markierte siRNA gegen das *Housekeeping Gene* GAPDH eingesetzt. Sie wurde dazu benutzt, mittels konfokaler Mikroskopie die erfolgreiche Transfektion in die Zelle zu kontrollieren. Abbildung 28A zeigt die Anhäufung von Cy3TM-markierter siRNA im Zytoplasma der Zelle (rote Fluoreszenz), die nach ca. 8 Stunden vollständig aufgenommen wurde. Zur Veranschaulichung wurden die DNA der Zellkerne mit DAPI (4',6-Diamidino-2-phenylindol) markiert (blaue Fluoreszenz). Eine Bestätigung der Herabregulation der GAPDH-Genexpression mittels PCR wurde nicht durchgeführt, da für dieses Experiment die Expression

auf Proteinebene betrachtet werden sollte. Stattdessen wurden als zusätzliche Positivkontrolle Zellen mit siRNA gegen den humanen LDL-Rezeptor transfiziert und nach mehrtägiger Inkubation mit einem Anti human LDL-Rezeptor Antikörper die noch vorhandene Proteinexpression im FACS analysiert. Die Repression auf Proteinebene war in der Regel nach 24 bis 48 Stunden detektierbar (siehe Abbildung 28B). Nach 72 bis 96 Stunden konnte ein Anstieg im Bindungsverhalten des Antikörpers verzeichnet werden. Dies ist durch den permanenten Abbau der eingeschleusten RNA-Bruchstücke durch RNAsen zu erklären und machte die Methode der RNA-Interferenz nur transient einsetzbar [178].

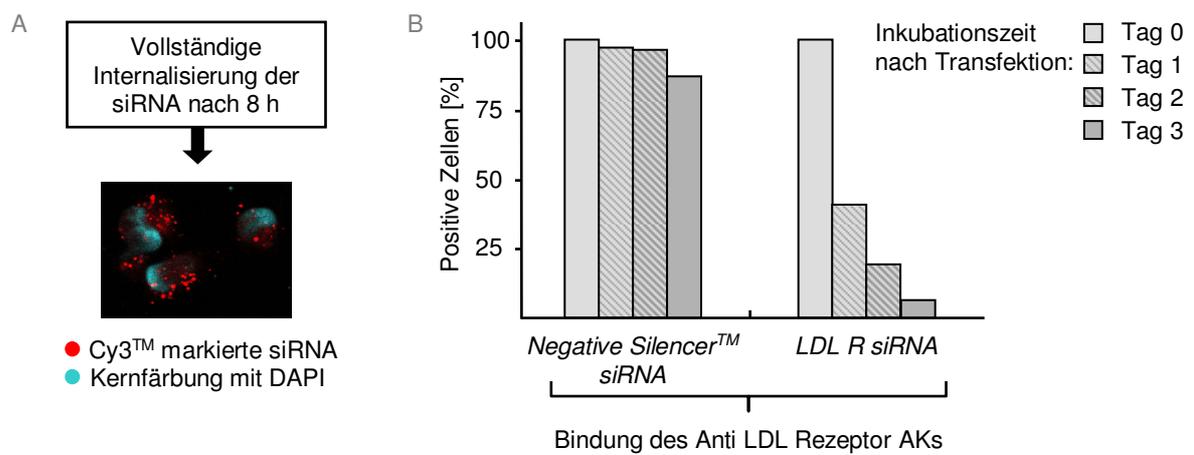


Abbildung 28: Transfektionskontrollen. **A**, Internalisierte Cy3TM-markierte siRNA im Zytoplasma von BXPC-3 Zellen (rote Fluoreszenz). Zellkerne wurden mit DAPI markiert (blaue Fluoreszenz). **B**, FACS-Analyse mit Anti LDL-Rezeptor AK auf transfizierten BXPC-3 Zellen. Die Zellen wurden 0 bis 3 Tage lang mit siRNA gegen den human LDL- bzw. Kontroll-siRNA (*Negative SilencerTM* siRNA) transfiziert und die Repression mittels FACS-Analyse mit dem Anti Human LDL-Rezeptor AK verifiziert. Dargestellt ist der Anteil positiver Zellen [%] bezogen auf unbehandelte Kontrollzellen.

4.1.2 Western Blot-Analyse

Die Suppression des Zielantigens konnte in einem weiteren Experiment mit Hilfe der Western Blot-Analyse auf Membranextrakten transfizierter Tumorzellen bestätigt werden. Membranextrakte unbehandelter Tumorzellen (BXPC-3) zeigten eine SAM-6-spezifische Proteinbande mit einem Molekulargewicht von 82 kD. Anti GRP78 (N-terminal) erkannte zusätzlich den GRP78-Wildtypen (78 kD) und ein nicht-glykosiliertes Abbauprodukt mit 72 kD. (Abbildung 29A). Auf Membranextrakten GRP78-defizienter Tumorzellen zeigten beide Antikörper eine klar reduzierte Bindung (Abbildung 29C), was auf das Fehlen der bindenden Antigene zurückschließen lässt. Im Gegensatz dazu sind auf Membranextrakten unspezifisch transfizierter Kontrollzellen unveränderte Bandenmuster zu erkennen (Abbildung 29B).

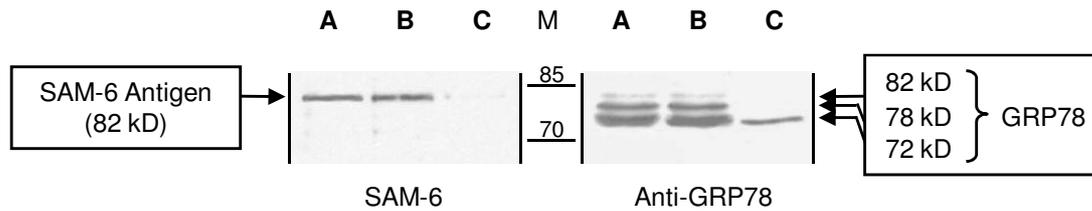


Abbildung 29: Analyse der GRP78-Protein-Level nach Transfektion mit GRP78 siRNA. Gezeigt werden Western Blots mit SAM-6 und Anti GRP78 AK auf Membranextrakten. **A**, Auf Membranextrakten unbehandelter Zellen detektierte SAM-6 eine spezifische Proteinbande bei 82 kD, Anti GRP78 zusätzlich den GRP78-Wildtypen (78 kD) und ein Abbauprodukt (72 kD). **B**, Unverändert starke Bindung der AK auf Membranextrakten unspezifisch transfizierter Zellen **C**, Reduzierte Bindung der AK auf Membranextrakte GRP78-defizienter Zellen. (*M* – Molekulargewicht [kD])

4.2 Effekt des Protein-Knock-Down von GRP78 auf die SAM-6-induzierte Apoptose

Auf der Zelloberfläche lokalisiertes GRP78 ist für die Bindung des SAM-6 Antikörpers essentiell. Um den Einfluss der Suppression des GRP78 auf die Funktionalität des SAM-6 Antikörpers zu ermitteln, wurde die anti-proliferative bzw. apoptotische Wirkung des SAM-6 Antikörpers auf GRP78-defizienten Zellen mit Hilfe des MTT-Proliferationstests (Kapitel II-2.2.2) und eines Apoptose-ELISA (Kapitel II-2.2.3) bestimmt.

4.2.1 MTT-Proliferationstest

Tumorzellen (BXPC-3) wurden wie unter Kapitel II-2.2.1 beschrieben mit GRP78 siRNA transfiziert und 2 Tage lang unter Standardbedingungen kultiviert. Zur Kontrolle wurden unbehandelte Zellen, Mock-Transfektanten und mit unspezifischer siRNA transfizierte Zellen mitgeführt. Transfizierte Zellen und Kontrollzellen wurden mit Trypsin von der Kulturschale gelöst und wie erläutert in einer 96er Kulturplatte ausgesät. Nach Adhäsion der Zellen wurde mit SAM-6 Antikörper bzw. der Isotypkontrolle (ChromPure IgM) jeweils in einer Endkonzentration von 100 µg/ml inkubiert und nach 24 Stunden der Anteil der proliferierenden Zellen bestimmt. In Abbildung 30 ist der Einfluss des Antikörpers SAM-6 auf die Proliferation der transfizierten Tumorzellen zusammenfassend dargestellt. Berechnungsgrundlage war hierbei die Proliferationsrate unbehandelter Zellen in Kulturmedium (ohne Zusatz von Antikörper), die mit 100 % angegeben wurde.

Nach 24 Stunden Inkubationszeit zeigten unbehandelte Tumorzellen unter dem Einfluss des SAM-6 Antikörpers eine Proliferation von 30 %, was bezogen auf Zellen, die in Kontrollmedium

ohne den Antikörper wuchsen, einer Proliferationshemmung von 70 % entspricht. Zellen, die mit der Isotypkontrolle behandelt wurden, zeigten eine ungehemmte Proliferation mit jeweils über 95 %. Interessanterweise konnte bei GRP78-defizienten Tumorzellen auch in Anwesenheit des SAM-6 Antikörpers eine Proliferationsrate größer 90 % beobachtet werden, die nahe am Wert einer ungehemmten Proliferation (größer 95 %) lag. Da der SAM-6 Antikörper bei Kontrollzellen, die mit irrelevanter siRNA (*Negative SilencerTM* siRNA) transfiziert wurden ebenfalls eine Proliferationshemmung von 70 % induzierte, scheint zellständiges GRP78 für die anti-proliferative Aktivität des SAM-6 Antikörpers von Bedeutung zu sein.

Um auszuschließen, dass ein beobachteter Effekt aufgrund ungünstiger Kulturbedingungen (Nährstoffmangel) zurückzuführen ist, wurde immer ein Ansatz mit der entsprechenden Menge an verbrauchtem Kulturüberstand mitgeführt, der keinen Antikörper enthielt. Diese Kontrollen zeigten jedoch keinen Effekt auf die Proliferation der untersuchten Zelllinien und wurden im Diagramm nicht dargestellt.

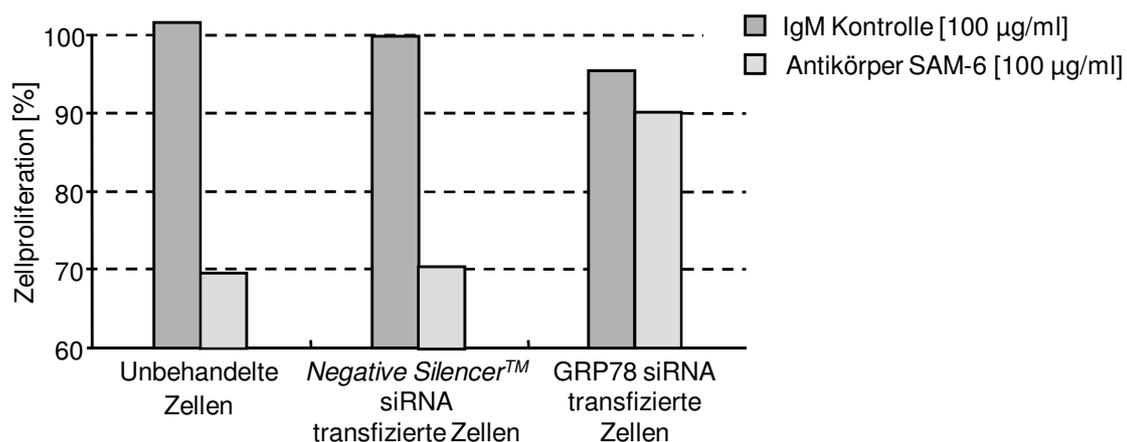


Abbildung 30: Einfluss des SAM-6 Antikörpers auf die Proliferation transfizierter Zellen.

MTT-Test mit dem SAM-6 Antikörper auf transfizierten Pankreaskarzinomzellen (BXPC-3). Die Tumorzellen wurden 2 Tage lang mit siRNA gegen GRP78 bzw. Kontroll-siRNA (*Negative SilencerTM*) transfiziert. Anschließend wurden die Zellen für 24 Stunden mit 100 µg/ml SAM-6 AK oder Isotypkontrolle inkubiert und mit Hilfe des MTT-Tests die Proliferationsrate der Zellen ermittelt. Unbehandelte Zellen und Zellen, die mit Kontroll-siRNA transfiziert wurden, zeigten im Vergleich zur Isotypkontrolle eine Proliferationshemmung von jeweils 70 % auf. Hingegen konnte bei GRP78-defizienten Zellen eine deutlich geringere Hemmung der Proliferation festgestellt werden. Hier lag die Proliferationsrate knapp über 90 %. Demnach konnte der SAM-6 Antikörper auf Zellen, die eine verminderte Expression an membranständigem GRP78 aufwiesen, einen deutlich geringeren anti-proliferativen Effekt ausüben.

4.2.2 Apoptose-Test (Cell Death Detection ELISA^{PLUS})

Tumorzellen (BXPC-3) wurden wie unter Kapitel II-2.2.1 beschrieben mit GRP78-siRNA transfiziert und 2 Tage lang unter Standardbedingungen kultiviert. Zur Kontrolle wurden unbehandelte Zellen, Mock-Transfektanten und mit unspezifischer siRNA transfizierte Zellen mitgeführt. Transfizierte Zellen und Kontrollzellen wurden mit Trypsin von der Kulturschale gelöst, und wie in Kapitel II-2.2.3 erläutert in einer 96er Kulturplatte ausgesät. Nach Adhäsion der Zellen wurde mit dem SAM-6 Antikörper und der Isotypkontrolle (ChromPure IgM) inkubiert, wobei beide in einer Endkonzentration von jeweils 100 µg/ml verwendet wurden. Nach 4 Stunden wurde mittels des ELISA das Maß an SAM-6-induzierter Apoptose bestimmt und der prozentuale Anteil apoptotischer Zellen errechnet. In Abbildung 31 ist der Einfluss des Antikörpers SAM-6 auf die Apoptose transfizierter Tumorzellen zusammenfassend dargestellt. Berechnungsgrundlage war hierbei die Absorption der Nukleosomenfreisetzung unbehandelter Zellen in Kulturmedium (ohne Zusatz von Antikörper).

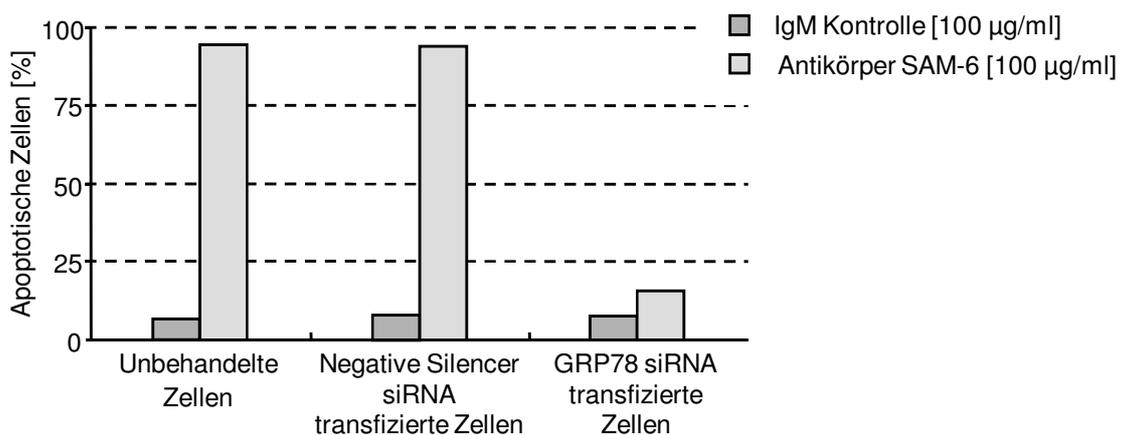


Abbildung 31: Apoptose-Induktion des Antikörpers SAM-6 auf transfizierten Zellen. Apoptose-Test (*Cell Death Detection ELISA^{PLUS}*) mit dem SAM-6 Antikörper auf transfizierten Pankreaskarzinomzellen (BXPC-3). Die Tumorzellen wurden 2 Tage lang mit siRNA gegen GRP78 bzw. Kontroll-siRNA (*Negative SilencerTM*) siRNA transfiziert. Anschließend wurden die Zellen für 4 Stunden mit 100 µg/ml SAM-6 oder Isotypkontrolle inkubiert und mit Hilfe des Apoptose-Tests über die Nukleosomenfreisetzung der Anteil apoptotischer Zellen bestimmt. Unbehandelte Zellen und Zellen, die mit Kontroll-siRNA transfiziert wurden, wiesen im Vergleich zur Isotypkontrolle einen apoptotischen Zellanteil von ca. 90 % auf. Hingegen konnte bei den Zellen, die mit GRP78-siRNA transfiziert wurden, lediglich eine minimal erhöhte Rate an apoptotischen Zellen festgestellt werden. Die Anzahl apoptotischer Zellen lag hier bei 15 %. Zellen, die mit der Isotypkontrolle inkubiert wurden, zeigten vernachlässigbare apoptotische Ereignisse unterhalb von 10 %.

In Abbildung 31 kommt die apoptotische Aktivität des SAM-6 Antikörpers in Abhängigkeit der GRP78-Expression deutlich zum Ausdruck. Nicht transfizierte und unspezifisch transfizierte

Kontrollzellen, die beide oberflächenexprimiertes GRP78 besaßen, wiesen einen Gehalt an apoptotischen Zellen von jeweils über 90 % auf. Im Gegensatz dazu zeigten Zellen, die mit GRP78-siRNA transfiziert wurden, nach der Inkubation mit dem SAM-6 Antikörper einen Gehalt an apoptotischen Zellen von nur 15 % auf. Zellen die mit der Isotypkontrolle behandelt wurden, zeigten in allen Ansätzen vernachlässigbare apoptotische Ereignisse unterhalb 10 %.

Nach der Hemmung der Oberflächenexpression von GRP78 blieb sowohl beim MTT-Test die SAM-6-induzierte Proliferationshemmung als auch beim Apoptose-Test die SAM-6-induzierte Apoptose aus. Aus beiden Versuchen geht eindeutig hervor, dass die Expression von GRP78 an der Oberfläche von Tumorzellen von essentieller Bedeutung für die Apoptose-Induktion durch den Antikörper SAM-6 ist und zumindest teilweise über GRP78 oder eine homologe Form des Proteins erfolgt. Nicht nur die Bindung sondern auch die Funktionalität des SAM-6 Antikörpers ist somit an oberflächenständiges GRP78 gekoppelt, dem so eine neue und bisher nicht in der Literatur beschriebene anti-proliferative Eigenschaft zu Teil wird.

5 GRP78^{SAM-6}

Im Laufe dieser Arbeit wurde beschrieben, dass der Antikörper SAM-6 bevorzugt mit einem Epitop des Proteins GRP78 reagiert, welches spezifisch auf malignen Zellen exprimiert wird.

Auf normalen Zellen wurde bisher keine Reaktion des SAM-6 Antikörpers beobachtet (Kapitel III-2). Die plausibelste Erklärung der fehlenden Bindung des SAM-6 Antikörpers an normale Zellen ist das Fehlen des Antigens auf der Oberfläche nicht maligner Zellen. Tatsächlich wurde aber der GRP78-Wildtyp auch auf der Oberfläche nicht maligner Zellen beschrieben, wie z.B. auf Fibroblasten [179], Monozyten-Makrophagen und proliferierenden Endothelzellen [180, 181]. Daher könnte es sich bei dem SAM-6 Antigen um eine Modifikation des GRP78 handeln, die sich in mindestens einem Merkmal vom GRP78-Wildtypen abhebt und dadurch für die Bindung des SAM-6 Antikörpers essentiell ist.

Zellen können ihrem Phänotyp über posttranskriptionale oder posttranslationale Prozesse ändern, um sich neuen Anforderungen in ihrem Umfeld anzupassen. Charakteristischerweise machen sich meist maligne Zellen derartige Modifikationen zu Nutze [182, 183]. Aus diesem Grund wurde die Gen- und die Proteinexpression des tumorspezifischen SAM-6 Antigens näher betrachtet.

5.1 Überexpression von GRP78 in Tumorgewebe

Für die Analyse der Genexpression des SAM-6 Antigens wurde RNA aus BXPC-3 Tumorzellen isoliert, in cDNA translatiert und mit spezifischen Primern (siehe Kapitel II-1.1) die komplette Nukleotidsequenz des Grp78 amplifiziert. Da für jedes Primerpaar nur ein Amplifikat (780, 610, und 570 bp; nicht dargestellt) detektiert werden konnte, wurden die einzelnen DNA-Abschnitte anschließend direkt sequenziert (Kapitel II-2.4). Nachdem die ermittelten Nukleotidsequenzen mit der theoretischen Sequenz des Grp78-Gens, bzw. nach deren Translation mit der theoretischen Aminosäuresequenz des Proteins GRP78 abgeglichen worden waren, konnte eine 100%ige Homologie zur Aminosäuresequenz von GRP78 bestätigt werden. Auf molekularer Ebene konnte mit den hier eingesetzten Methoden keine Veränderungen nachgewiesen werden. Das isolierte SAM-6 Antigen und das Protein GRP78 besitzen demnach eine identische Peptidsequenz von 654 Aminosäuren und gehören der evolutionär hochkonservierten Familie der 70 kD Hitzeschockproteine an.

Des Weiteren wurden die Expression des Grp78-Gens in malignem bzw. nicht malignem Magengewebe untersucht und die Expressionlevel der Grp78 mRNA semiquantitativ analysiert. Hierzu wurde RNA aus den entsprechenden Geweben (Tabelle 8, Kapitel II-1.5) isoliert, translatiert und anschließend mit GRP78- und GAPDH-spezifischen Primern eine semiquantitative RT-PCR durchgeführt, bei der das konstitutiv exprimierte *Housekeeping Gen* GAPDH als interner Standard eingesetzt wurde. Stellvertretend zeigt Abbildung 32 die semiquantitative PCR mit Primerpaar 2.

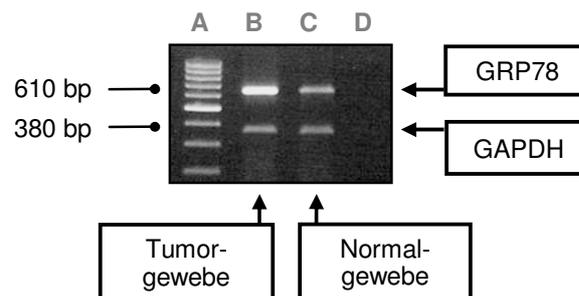


Abbildung 32: Expressionsanalyse von Grp78 in Tumor- und Normalgewebe mittels semiquantitativer RT-PCR. Gesamt-RNA von malignem (B) und nicht malignem Magengewebe (C) wurde isoliert und revers transkribiert. Die Expression von GAPDH mRNA wurde als Mengenstandard für die semiquantitative RT-PCR verwendet. Als Negativkontrolle wurde eine Probe mitgeführt, die keine cDNA enthielt (D). Zur Abschätzung der Fragmentgrößen wurde ein 100 bp Längenstandard verwendet (A). Die elektrophoretische Auftrennung erfolgte durch ein 1,5%iges Agarosegel mit anschließender Ethidiumbromid-Detektion. Dargestellt sind die Amplifikate des GRP78 (610 bp) und der internen Kontrolle GAPDH (380 bp). (*bp* – Basenpaare)

Bereits 1994 fanden Little und Kollegen heraus, dass Zellen unter ungünstigen metabolischen Bedingungen, wie sie unter anderem in der schlecht vaskularisierten Umgebung eines Tumors auftreten können, eine erhöhte molekulare Expression an Grps (*Glucose Regulated Proteins*) aufwiesen und schrieben den GRPs eine wichtige Rolle bei pathologischen Vorgängen, wie z.B. der Tumorentstehung zu [184]. Korrelierend mit dieser Aussage zeigten die von uns analysierten Gewebe deutliche Unterschiede auf. Normales Gewebe wies basale Expressionslevel an Grp78 auf, Tumorgewebe jedoch eine eindeutig erhöhte Expression an Grp78 (610 bp). Die jeweilige Expression von GAPDH verwies als interner Mengenstandard auf den Einsatz gleicher Mengen an DNA und verdeutlichte die Überexpression von Grp78 in malignem Gewebe.

5.2 Tumorspezifische Modifikation von GRP78

Entartetes Gewebe zeigt nicht selten Veränderungen auf posttranslativem Ebene [132, 182, 183, 185]. Im Folgenden wurde die Möglichkeit einer posttranslationalen Modifikation des GRP78-Wildtyps in Betracht gezogen.

5.2.1 Co-Expression von GRP78^{SAM-6}

Wie bereits im Vorfeld erläutert, bindet neben dem SAM-6 AK auch der kommerzielle Anti GRP78 Antikörper an ein Epitop, das spezifisch auf der Tumorzellmembran exprimiert wird (siehe Kapitel 4). Erste Hinweise darauf, dass die beiden Antikörper dabei verschiedene Epitope des Antigens binden, konnten durch einen Wettbewerbsversuch gewonnen werden. Hierbei wurden die Bindungsstellen der Tumorzelloberfläche entweder mit einem Überschuss an SAM-6 oder Anti GRP78 AK abgesättigt und mittels FACS-Analyse das Bindungsverhalten des jeweilig anderen Antikörpers (Anti GRP78 oder SAM-6 AK) analysiert. Sofern beide Antikörper um die gleiche Bindungsstelle konkurrieren, sollten durch die Vorinkubation die Bindungsstellen schon besetzt sein und eine schwächere Fluoreszenzverschiebung zu verzeichnen sein. In den Histogrammen war jedoch keine Abnahme der Fluoreszenzverschiebung zu erkennen (Daten nicht dargestellt). Trotz der Vorinkubation mit dem jeweils anderen Antikörper trat keine Blockade der Bindungsstellen ein und beide Antikörper zeigten eine unverändert starke Bindung an die Tumorzellen. Die beiden Antikörper konkurrieren demnach nicht um die gleiche Bindungsstelle, sondern binden unterschiedliche Epitope auf GRP78.

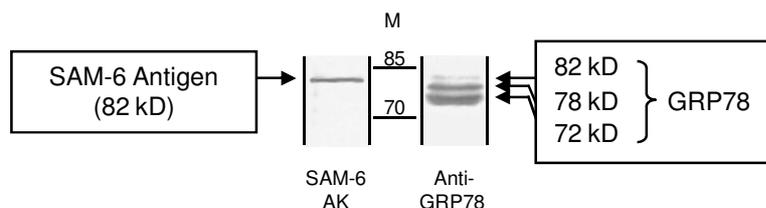


Abbildung 33: Western Blot-Analyse mit den Antikörpern SAM-6 und Anti GRP78 auf Membranproteinextrakten der Zelllinie BXPC-3. Neben dem GRP78-Wildtypen (78 und 72 kD) war eine SAM-6-spezifische Isoform des Proteins detektierbar (82 kD). Die Antikörper erkannten verschiedene Epitope des GRP78. (*M* – Molekulargewicht [kD])

Diese Beobachtung wurde mit Hilfe des Western Blots genauer betrachtet. Membranextrakte der Pankreaskarzinomzelllinie BXPC-3 wurden auf einer Nitrozellulosemembran fixiert und zur Detektion des jeweiligen Antigens neben dem SAM-6 Antikörper der Anti GRP78 AK als Primärantikörper eingesetzt (Abbildung 33). Der SAM-6 Antikörper definierte eine spezifische Bande mit einem Molekulargewicht von 82 kD. Anti GRP78 richtet sich gegen eine N-terminal

lokalisierte Peptidstruktur von GRP78. Wenn auch weniger stark, detektierte der Antikörper neben den bisher bekannten Formen des GRP78-Wildtyps (78 und 72 kD) eine dritte Variante mit einem erhöhten Molekulargewicht von ca. 82 kD. Unterschiedliche Bandenmuster der Antikörper deuten darauf hin, dass SAM-6 und Anti GRP78 verschiedene Epitope auf GRP78 erkennen. Die Co-Detektion des 82 kD Proteins spricht für die Existenz einer GRP78-Isoform, die sich durch additive Modifikationen des peptidischen Grundgerüsts abhebt (z.B. Glykosylierung, Phosphorylierung, etc.) und durch die Expression eines Neo-Epitops neue und spezifische Eigenschaften aufweist. In diesem Falle wird membranständiges GRP78 für den SAM-6 Antikörper angreifbar, der spezifisch gegen dieses Neo-Epitop gerichtet reagiert. Die SAM-6 spezifische Isoform (im Folgenden $GRP78^{SAM-6}$) wird simultan zum GRP78-Wildtypen exprimiert.

5.2.2 Carbohydrat-Epitop auf $GRP78^{SAM-6}$

Pathologische Veränderungen und maligne Transformationen von Zellen gehen häufig mit charakteristischen Veränderungen des Oligosaccharidmusters spezifischer Proteine einher [182, 183], die neben einer Unter- bzw. Überexpression der natürlichen Glykosidstrukturen ebenso eine Neo-Expression von Glykanen beinhalten kann [185]. Im Rahmen der Proteinglykosylierung sind mannigfaltige Modifikationen möglich, die entweder über Serin- und Threonin- (O-Verknüpfung) oder über Asparagin-Reste (N-Verknüpfung) erfolgen [132]. Ursächlich spielen dabei Glykosyltransferasen eine große Rolle, die vor allem in Tumorzellen überexprimiert vorliegen und die Veränderungen im zellulären Glykosylierungsmuster von spezifischen Proteinen vorantreiben.

Bezüglich des Glykosylierungsmusters des GRP78-Wildtyps liegen kaum Untersuchungen vor. Da eine Modifikation in Form einer Neo-Expression von Carbohydratstrukturen durchaus denkbar wäre, stellte sich im Folgenden die Frage, ob eventuell eine Glykosylierung des Antigens Einfluss auf die Bindung des SAM-6 Antikörpers hat. Potentielle O- und N-verknüpfte Glykoside wurden mit Hilfe von Endoglykosidasen gezielt von der Zellmembran abgespalten und die Zellen anschließend in Form von Zytospins immunhistochemisch auf die Reaktion mit dem SAM-6 Antikörper bewertet. Zu Vergleichszwecken wurde der Anti GRP78 mitgeführt, als Positivkontrolle der Anti CD55 Antikörper. Da beide peptidische Membranstrukturen erkennen, sollte die Deglykosylierung auf die Bindungsstärke der beiden Antikörper keinen Einfluss haben. Sie stehen daher für die Unversehrtheit der Zellmembran nach der Behandlung der Zellen mit den Enzymen.

Das Ergebnis ist in Abbildung 34 dargestellt. Nach der Behandlung mit O-Glykosidase findet keine Bindung mit dem SAM-6 Antikörper mehr statt (34 H). Im Gegensatz dazu bleibt die Behandlung mit N-Glykosidase ohne erkennbaren Effekt auf die Bindung des SAM-6 Antikörpers (Abbildung 34 G und I). Die Bindung des Anti CD55 und des Anti GRP78 bleibt vom Verdau mit den Glykosidasen unbeeinflusst (Abbildung 34 A-C und D-F).

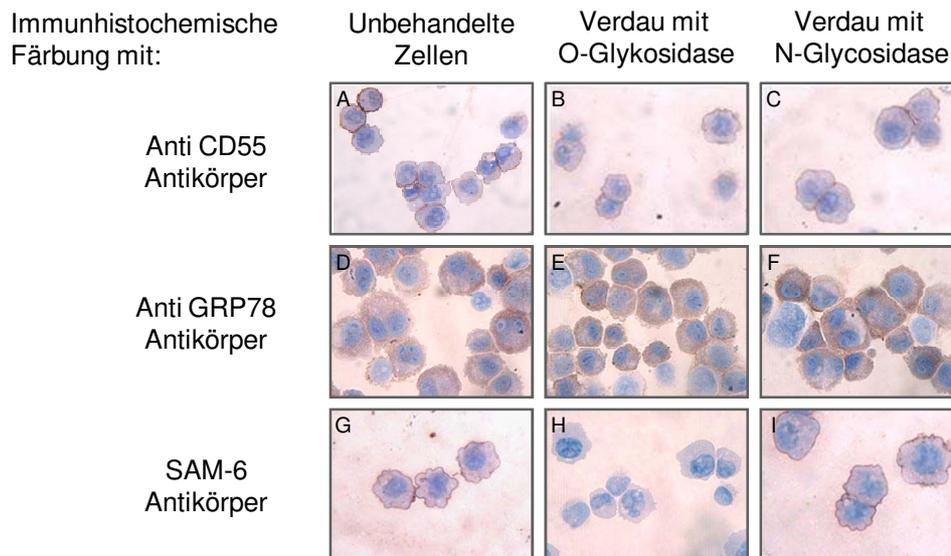


Abbildung 34: Immunhistochemische Färbung mit SAM-6 AK und Kontrollantikörpern auf Zytospins mit Pankreaskarzinomzellen (BXPC-3) nach Glykosidase-Verdau. Die positive Bindung des Anti CD55 belegt die Integrität der Zellmembran nach Verdau der Zellen (**A-C**). Die O- bzw. N-Deglykosilierung hatte keinen Einfluss auf die Bindung des Anti GRP78 AK (**D-F**). Unbehandelte Zellen und Zellen, die mit N-Glykosidase behandelt wurden, zeigen eine positive Färbung mit dem SAM-6 AK (**G; I**). Nach Abspaltung der O-verknüpften Glykane war keine Bindung des SAM-6 Antikörpers detektierbar (**H**).

Um diese Beobachtung zu bekräftigen, wurde der Effekt der Deglykosilierung ergänzend auf Membranextrakten der Tumorzelllinie BXPC-3 analysiert. Hierzu wurden Membranextrakte mit O- oder N-Glykosidase inkubiert und mit Hilfe des Western Blot die Bindung des SAM-6 Antikörpers detektiert (Abbildung 35). Nach der Abspaltung von N-verknüpften Carbohydrat-Strukturen blieb die Bindung des SAM-6 Antikörpers unbeeinflusst. Interessanterweise reduzierte sich durch die N-Deglykosilierung das Molekulargewicht des Zielmoleküls von 82 auf 72 kD, entsprechend dem Molekulargewicht einer nicht glykosilierten Form bzw. eines Abbauprodukts des GRP78-Wildtyps. Deshalb ist gleichzeitig von einer N-Glykosilierung des Proteins auszugehen, die jedoch keinen Einfluss auf die Bindung des Antikörpers ausübte. Im Gegensatz dazu konnte das Zielantigen (82 kD) nach dem Aufschluss mit O-Glykosidase mit dem SAM-6 Antikörper nicht mehr detektiert werden. Um zu zeigen, dass das Fehlen der Reaktion mit dem SAM-6 Antikörper nicht durch unspezifische Proteasenaktivitäten verursacht

wurde, wurden die jeweiligen Proben ebenso auf die Bindung mit dem Anti GRP78 Antikörper hin untersucht. In Abbildung 35 ist deutlich zu erkennen, dass nach dem Verdau mit O- oder N-Glykosidase das Zielmolekül (82 kD) nicht mehr detektiert werden konnte, der Anti GRP78 Antikörper jedoch die Proteinbanden mit 72 und 78 kD klar erkannte. Demnach sind unspezifische Proteaseaktivitäten auszuschließen und die Effekte ausschließlich auf die Deglykosylierung zurückzuführen. Ein O-verknüpftes Oligosaccharid scheint für die Bindung des SAM-6 Antikörpers essentiell und daher das Epitop des SAM-6 Antikörpers zu sein.

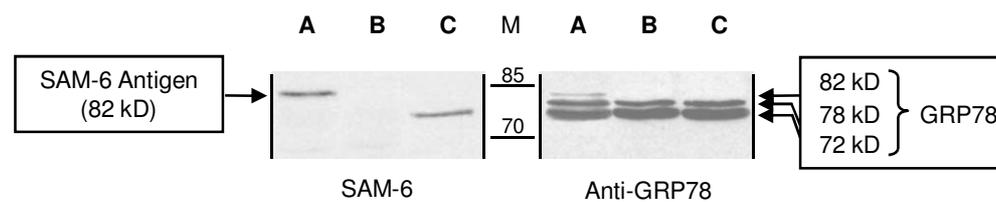


Abbildung 35: Western Blot auf Pankreaskarzinomzellen (BXPC-3) nach Aufschluss mit O- oder N-Glykosidase. Der SAM-6 Antikörper band nach der O-Deglykosylierung nicht mehr an das Zielprotein (82 kD). Die Abspaltung N-verknüpfter Kohlenhydrate führte zur Reduktion des Molekulargewichts des Zielmoleküls (72 kD), zeigte aber keinen Einfluss auf die Bindungsstärke des SAM-6 Antikörpers. Der Anti GRP78 AK detektierte nach der enzymatischen Behandlung mit O- und N-Deglykosidase den GRP78-Wildtypen (78 kD) und ein Abbauprodukt (72 kD), jedoch nicht mehr die SAM-6 spezifische Isoform (82 kD). (**A**, Unbehandelter Membranextrakt in Reaktionspuffer. **B**, Membranextrakt nach Inkubation mit O-Glykosidase. **C**, Membranextrakt nach Inkubation mit N-Glykosidase. **M**, Molekulargewicht [kD])

Bei einem der Zielmoleküle des humanen monoklonalen Antikörpers SAM-6 handelt es sich um eine neue, glykosylierte Isoform des GRP78 (GRP78^{SAM-6}). Die auf der Zellmembran lokalisierte Variante des GRP78 besitzt ein Molekulargewicht von 82 kD und wird spezifisch auf einer Reihe verschiedener Tumorarten überexprimiert, nicht jedoch auf gesundem Gewebe. GRP78^{SAM-6} wird neben dem GRP78-Wildtypen co-exprimiert, der ein Molekulargewicht von 78 kD besitzt und im Gegensatz zu der SAM-6 spezifischen Isoform gleichzeitig auf nicht malignen Zellen zu finden ist.

Die neue Variante des GRP78 resultiert aus einer posttranslationalen Modifizierung von GRP78 und trägt im Unterschied zu seinem Wildtypen zusätzlich O-glykosidisch gebundene Kohlenhydrate. Diese neuen Kohlenhydrat-Regionen repräsentieren das Epitop des SAM-6 Antikörpers.

5.3 Funktioneller Vergleich des SAM-6 Antigens mit dem GRP78-Wildtypen

Das SAM-6 Antigen weist als posttranslational modifizierte Isoform von GRP78 unterschiedliche und gemeinsame Strukturelemente mit dem GRP78-Wildtypen auf. Um sie genauer charakterisieren zu können, wurden funktionelle Vergleiche zwischen den SAM-6 Antikörper und dem kommerziell erhältlichen Anti GRP78 Antikörper zur Hilfe gezogen.

5.3.1 Induktion der Apoptose

Zunächst stellte sich die Frage, ob beide Antikörper nach der Bindung ihres Antigens in der Lage sind, Apoptose zu induzieren. Hierzu wurden wie unter 2.2.3 beschrieben, Tumorzellen mit SAM-6 bzw. Anti GRP78 Antikörper in gleicher Konzentration für 24 Stunden inkubiert und mit Hilfe des Apoptose-Tests *Cell Death Detection ELISA^{PLUS}* der Gehalt an apoptotischen Zellen analysiert. Zur Kontrolle wurden entsprechende Isotypkontrollen mitgeführt. Abbildung 36 zeigt die apoptotische Aktivität von SAM-6 im Vergleich mit der Aktivität des Anti GRP78 Antikörpers. Sie lag mit 65,2 % eindeutig höher als die des Anti GRP78 Antikörpers (15,2 %). Zellen, die mit der IgM Isotypkontrolle behandelt wurden, zeigten bei einem Wert von 6,5 % vernachlässigbare apoptotische Ereignisse. Interessanterweise wies die IgG Isotypkontrolle mit 17,4 % eine ähnlich hohe apoptotische Aktivität auf, wie auch nach Inkubation mit dem Anti GRP78 Antikörper zu detektieren war. Damit wurde hier nicht von einer spezifischen Induktion der Apoptose ausgegangen. Die starke Induktion der tumorspezifischen Apoptose scheint somit eine Eigenheit des SAM-6 Antikörpers zu sein.

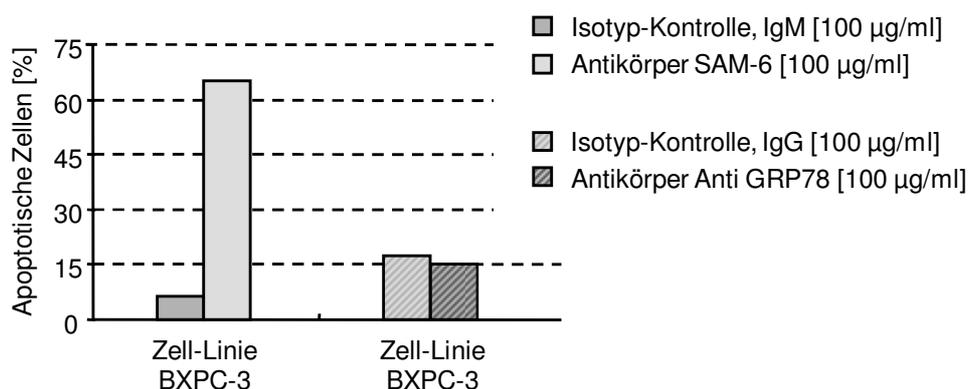


Abbildung 36: Analyse der Funktionalität der Antikörper SAM-6 und Anti GRP78 mit Hilfe des Apoptose Tests (*Cell Death Detection ELISA^{PLUS}*). Pankreaskarzinomzellen (BXPC-3) wurden 24 Stunden lang mit den Antikörpern SAM-6, Anti GRP78 oder deren Isotypkontrollen inkubiert. Der prozentuale Anteil an apoptotischen Zellen wurde bezogen auf den Kontrollwert unbehandelter Zellen berechnet.

5.3.2 Induktion zelltoxischer Lipideinlagerungen

Die hier beschriebene, tumorspezifische Apoptose ist das Resultat einer unkontrollierten Lipidanreicherung induziert durch den SAM-6 Antikörper [143]. Da in der Literatur bereits eine Interaktion des Anti GRP78 bzw. des GRP78 Antigens mit Lipiden beschrieben wurde [186, 187], sollte nach Anfärben der Lipide mit Sudanrot (Kapitel II-2.2.6) das Ausmaß der Einlagerungen beider Antikörper miteinander verglichen werden. Hierzu wurden auf Objektträgern herangewachsene Zellen mit SAM-6 oder Anti GRP78 Antikörper 48 Stunden lang inkubiert, wie beschrieben mit Sudanrot gefärbt und die Lipideinlagerungen mikroskopisch ausgewertet.

Das Ergebnis ist in Abbildung 37 dargestellt. Die Färbung zeigt bei Zellen die mit SAM-6 Antikörper inkubiert wurden deutliche Lipideinlagerungen, die sich in kettenförmig im Zytosol der Zelle ansammelten. Zellen, die mit GRP78 inkubiert wurden, zeigen nur vereinzelte Lipideinschlüsse. Zur Kontrolle wurden die jeweiligen Isotypen mitgeführt, die keine signifikanten Einschlüsse aufzeigten (nicht dargestellt).

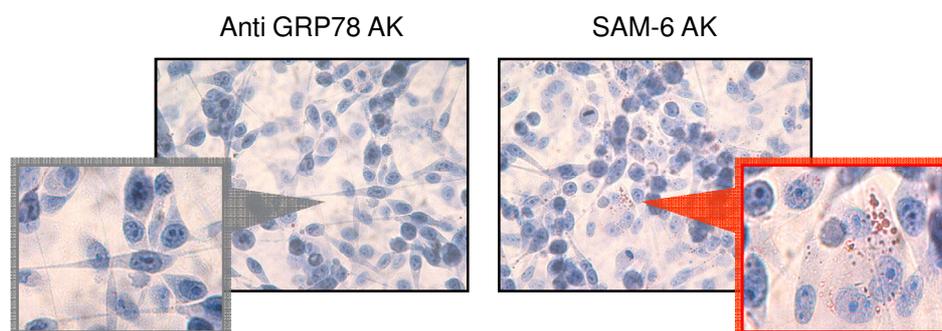


Abbildung 37: Färbung von eingelagerten Neutralfetten mit Sudanrot (Sudan III). Pankreaskarzinomzellen (BXPC-3) wurden für 48 Stunden mit den Antikörpern Anti GRP78 und SAM-6 inkubiert und anschließend einer Färbung mit Sudanrot unterzogen. In Zellen, die mit AK SAM-6 behandelt wurden, wurden rötlich gefärbte Fetttropfchen sichtbar. Der AK Anti GRP78 induzierte keine sichtbare Anhäufung von intrazellulären Lipiden. (*Original Vergrößerung x100 bzw. x200*)

Die ermittelten funktionellen Unterschiede zwischen SAM-6 und dem kommerziell erhältlichen Anti GRP78 Antikörper sprechen als weiteres Indiz für die Existenz eines SAM-6 spezifischen Epitops auf dem gemeinsamen Antigen GRP78.

5.3.3 *Ectodomain Shedding* von GRP78^{SAM-6} und GRP78

GRP78 wurde in verschiedenen Kompartimenten gesunder und maligner Zellen entdeckt und erfüllt meist Aufgaben, die zum Überleben der Zelle dienen. Einige Arbeitsgruppen beschreiben sowohl *in vitro* als auch *in vivo* die Existenz einer extrazellulären, löslichen Variante des GRP78 (im Folgenden als sGRP78, *soluble GRP78* bezeichnet) [188]. Ob GRP78 dabei über sekretorische Prozesse oder durch die Abspaltung der extrazellulären Domäne (*Ectodomain Shedding*) von transmembranär verankertem GRP78 in den Extrazellularraum freigesetzt wird, bleibt bislang umstritten [188, 189]. Auch dessen funktionelle Bedeutung ist bisher noch unklar, zirkulierendes sGRP78 könnte jedoch im Rahmen pathophysiologischer Entgleisungen eine wichtige Rolle spielen [190].

Innerhalb dieser Arbeit stellte sich die Frage, ob parallel zu sGRP78 die Existenz einer löslichen Variante von GRP78^{SAM-6} denkbar wäre. Durch den Einsatz bekannter *Shedding*-Induktoren wurden basierend auf der Beteiligung verschiedener Mechanismen Unterschiede oder Parallelen bezüglich des GRP78-Wildtypen untersucht. Als *in-vitro*-Modellsubstanz wurde der Phorbol-12-myristat-13-acetat (PMA) verwendet, ein Inhaltsstoff des giftigen Milchsafte der Wolfsmilchgewächse (Euphorbiaceae). Neben PMA, welches als exogene synthetische Substanz *in vivo* nicht relevant ist, wurden Wasserstoffperoxid (H₂O₂) und Lipopolysaccharid (LPS) gewählt, die als potente *in-vivo*-Induktoren vieler membranständiger Rezeptoren bekannt sind [191-193]. H₂O₂ diente dabei zur Generierung reaktiver Sauerstoffspezies (ROS, *Reactive Oxygen Species*), die in vielen endogenen Prozessen physiologischer und pathophysiologischer Art involviert sind, LPS zur Imitation einer bakteriellen Infektion [194, 195].

5.3.3.1 Abspaltung von GRP78^{SAM-6} von der Zelloberfläche

Zur Quantifizierung einer möglichen Abspaltung wurden die mit den jeweiligen *Shedding*-Induktoren behandelten Zellen der FACS-Analyse unterzogen. Dabei dienten der SAM-6 Antikörper und zu Vergleichszwecken der Anti GRP78 Antikörper als Primärantikörper. Das Ergebnis ist in Abbildung 38 graphisch dargestellt. Die Inkubation der Tumorzellen mit H₂O₂ hatte eine starke Abnahme der Oberflächendichte der spezifischen Variante GRP78^{SAM-6} um 86 % zur Folge. Im Vergleich reduzierte sich die Dichte des GRP78 Wildtyps um nur 40 %. Nach Behandlung mit PMA, sank die Antigendichte von GRP78^{SAM-6} bereits nach 2-stündiger Inkubation stark bis auf 71 % ab. Nach dieser Zeit schien die Dichte des GRP78-Wildtyps verglichen mit unbehandelten Kontrollzellen nahezu unverändert (102 %). Erst nach 24-stündiger Inkubation mit PMA war hier ein Rückgang der GRP78-Oberflächendichte um 55 % zu verzeichnen. Hingegen nahm die Expressionsdichte der spezifischen Variante

GRP78^{SAM-6} wieder leicht zu und lag nach 24-stündiger Inkubation mit PMA bei 53 %. Hier war demnach bereits nach 2-stündiger Behandlung ein Plateau-Wert erreicht. Ein besonderer Unterschied im Bindungsverhalten beider Antikörper war nach Inkubation der Zellen mit LPS zu beobachten. Während mit dem SAM-6 Antikörper nur initial eine geringfügige Reduktion zu beobachten war, wurde bei der Wildtyp-Variante bereits nach 2 Stunden eine deutliche Reduktion von 45 % beobachtet, die sich nach 24 Stunden einem maximalem Rückgang von 68 % näherte. Aus dem unterschiedlichen Verhalten der beiden Antigene lässt sich schließen, dass eine Abspaltung zwar bei beiden induziert werden kann, doch durchaus durch unterschiedliche Substanzen. Auffällig war, dass LPS auf membranständiges GRP78^{SAM-6} kaum Einfluss nimmt, womit die spezifische Rolle des GRP78^{SAM-6} bei Tumorerkrankungen deutlich wird. Der Wildtyp hingegen stellt ein Schutzmolekül gegen eine Reihe verschiedener Stressoren da, weshalb auch bei Infektionen bakterieller Art eine Antwort zu erwarten ist.

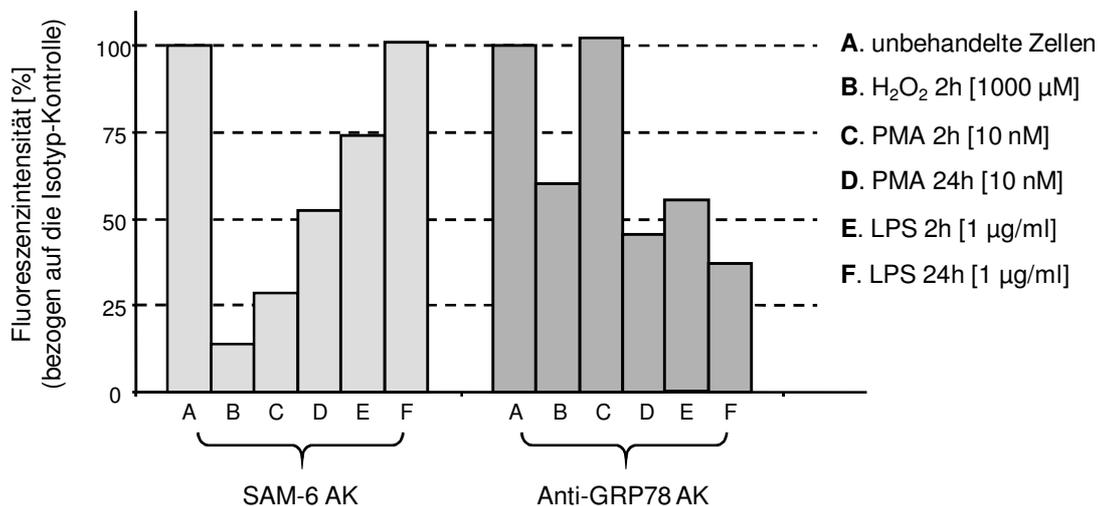


Abbildung 38: FACS-Analyse mit BXPC-3 Zellen nach Behandlung mit *Shedding*-Induktoren.

Als Primärantikörper dienen die Antikörper SAM-6 und Anti GRP78 (ET-21). Dargestellt ist der prozentuale Anteil der medianen Fluoreszenzverschiebung bezogen auf unbehandelte Kontrollzellen (100 %).

Unter dem Einfluss der gewählten Reagenzien war ein Rückgang der Oberflächendichte beider Antigene, des GRP78^{SAM-6} und des GRP78-Wildtyps zu erkennen. Die Generierung von löslichen GRP78-Varianten ist daher grundsätzlich möglich.

5.3.3.2 Freisetzung von GRP78^{SAM-6} in den Extrazellularraum

Neben der Bestimmung der Oberflächendichte von GRP78 und GRP78^{SAM-6} auf den Tumorzellen wurde zusätzlich der Anteil der löslichen Formen von GRP78 und GRP78^{SAM-6} in den einzelnen Zellüberständen bestimmt. Dabei sollte geklärt werden, ob die Proteine möglicherweise durch Denaturierung von zellständigem GRP78 durch die zugegebenen Reagenzien nicht mehr detektiert werden konnten, oder ob es sich bei der Abnahme der Antigendichte auf der Zelloberfläche tatsächlich um eine durch die eingesetzten Substanzen induzierte Abspaltung der Proteine handelte. Die jeweiligen Zellüberstände wurden mit Hilfe des Dot Blots und anschließender Chemolumineszenzdetektion auf den Gehalt an SAM-6 Antigen bzw. GRP78 hin analysiert. Abbildung 39 spiegelt das Ergebnis des Dot Blots wieder.

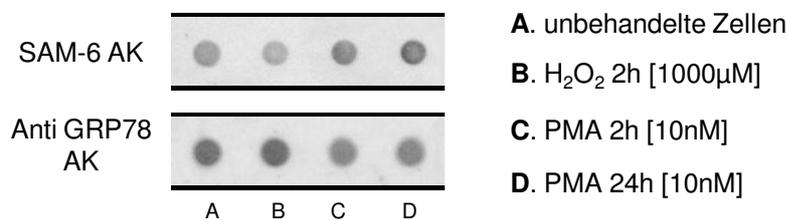


Abbildung 39: Dot Blot-Analyse von BXPC-3 Zellkulturüberständen nach Induktion des *Shedding*. Als Primärantikörper dienen die Antikörper SAM-6 und Anti GRP78 (ET-21).

Hier war zu beobachten, dass die Überstände der unbehandelten Kontrollzellen geringe Anteile an freiem sGRP78^{SAM-6} und sGRP78-Wildtyp aufwiesen. Im direkten Vergleich der Überstände konnte mit dem SAM-6 Antikörper in den Zellüberständen der mit PMA-behandelten Zellen eine deutlich erhöhte Konzentration an freiem sGRP78^{SAM-6} detektiert werden. Da die Zunahme an intaktem, löslichem GRP78^{SAM-6} eindeutig mit der Reduktion der Antigendichte auf der Zelloberfläche korrelierte (vgl. FACS-Analyse), kann hier von einer tatsächlichen Induktion des *Shedding* durch PMA ausgegangen werden. Der Dot Blot mit dem Anti GRP78 AK spiegelte ein gegensätzliches Ergebnis wider. Im Vergleich zum Kontrollüberstand wurde hier in den Überständen PMA-behandelter Zellen ein erniedrigter Gehalt an sGRP78-Wildtyp ermittelt, obwohl bei der FACS-Analyse auch hier eine, wenn auch weniger deutliche, Reduktion der Antigendichte zu verzeichnen war.

Ein umgekehrtes Verhältnis war nach Behandlung der Zellen mit H₂O₂ zu erkennen. Hier wurde trotz der eindeutigen Abnahme der Antigendichte für GRP78^{SAM-6} und GRP78 (siehe FACS-Analyse) ein eindeutig erniedrigter Anteil an sGRP78^{SAM-6} aber ein leicht erhöhter Gehalt an freier Wildtyp-Variante festgestellt.

Nach Behandlung mit LPS nahm der Anteil an zellständigem GRP78 eindeutig ab und die Überstände korrelierten durch einen leicht erhöhten Gehalt an freiem GRP78. Hingegen konnte bei GRP78^{SAM-6} kaum eine Abnahme der Oberflächendichte nach LPS-Inkubation beobachtet werden. Im Widerspruch zu den Ergebnissen der FACS-Analyse wurde im Überstand ein stark erhöhter Gehalt an sGRP78^{SAM-6} ermittelt. Dieses Ergebnis ist möglicherweise durch die Interaktion zwischen dem SAM-6 Antikörper und freiem LPS zu erklären, wie im Rahmen eigener Arbeiten innerhalb der Arbeitsgruppe (Steffen Erk, 2004) belegt werden konnte. Somit ist die Detektion von freiem GRP78^{SAM-6} nach LPS-Inkubation mittels des Dotblot/Western Blot-Verfahrens nicht geeignet. Die Ergebnisse wurden nicht dargestellt.

6 Das (potentielle) SAM-6 Target

Wie bereits beschrieben konnte mittels FACS-Analyse mit einem Antikörper gegen GRP78 die Expression dieses Antigens auf der Zelloberfläche von Tumorzellen bestätigt werden. In diesem Zusammenhang wurden Antikörper verwendet, die gegen verschiedene Peptidstrukturen des GRP78 Antigens gerichtet waren. Zum einen wurde der Klon ET-21 verwendet, der eine Peptidsequenz am N-terminalen Ende des Proteins erkennt, und zum anderen der Klon GL-19, der an eine Peptidabfolge am C-terminalen Teil des Proteins bindet.

Bei Membranproteinen liegen unterschiedliche Möglichkeiten der Verankerung vor. Im Regelfall befindet sich das N-terminale Ende an der dem Zytosol abgewandten Seite (extrazellulär). An diesem Ende tragen die Proteine vielfach Kohlenhydratreste, weshalb typische Membranproteine der Klasse der Glykoproteine zugeordnet werden können. Das C-terminale Ende kann ebenfalls nach außen zeigen, in der Lipidschicht verankert oder an der Zytosolseite lokalisiert auftreten (intrazellulär). Bei der FACS-Analyse mit Anti GRP78 auf BXPC-3 Zellen war nur mit dem Antikörper gegen das N-terminale Ende (Klon ET-21) eine eindeutige Bindung nachzuweisen. Hier liegt es nahe, dass es sich bei dem SAM-6 Antigen um ein transmembranes Protein handelt, dessen N-terminales Ende nach außen ragt. Mit dem Antikörper gegen das C-terminale Ende (Klon GL-19) war keine Bindung an die Zelloberfläche nachzuweisen. Das C-terminale Ende könnte ins Zellinnere ragen, eine Bindung des Antikörpers von außen ist somit nicht möglich. Es besteht auch die Möglichkeit, dass das C-terminale Ende des Peptids ein kurzes Stück auf der extrazellulären Seite der Membran herausragt und aus sterischen Gründen keine Bindung stattfinden kann.

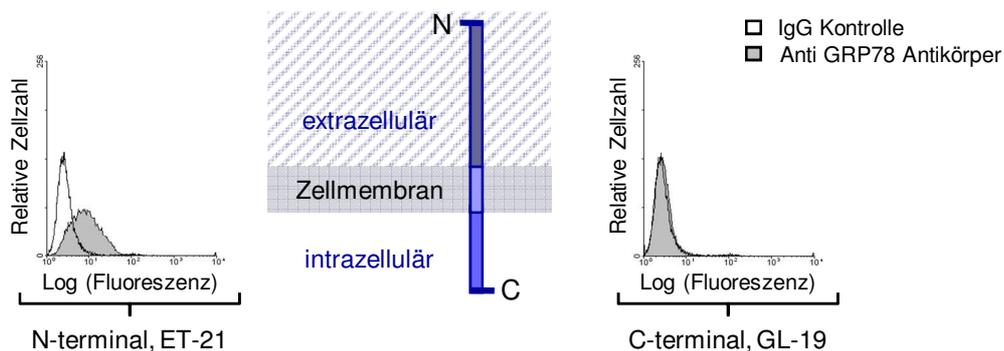


Abbildung 40: FACS-Analyse mit Antikörpern gegen GRP78 auf Pankreaskarzinomzellen (BXPC-3). Der Antikörper, der gegen den N-terminalen Teil von GRP78 gerichtet ist (ET-21), zeigte eine eindeutige Bindung auf der Zelloberfläche der Tumorzellen. Bei Anti GRP78 AK gegen den C-terminalen Teil des Proteins (GL-19) konnte keine Bindung detektiert werden.

Zusätzlich zur experimentellen Charakterisierung des SAM-6 Antigens wurde eine theoretische Sequenzanalyse über ExPASy (*Expert Protein Analysis System*), Proteomics Server des Schweizer Instituts für Bioinformatik (*Swiss Institute for Bioinformatics*; www.expasy.org), durchgeführt. Neben den Signalregionen bei Aminosäure 1 bis 17 und Aminosäure 650 bis 654 konnte ein potentieller Transmembranbereich zwischen Aminosäure 220 und 238 bestätigt werden. Extrazelluläre O-Glykosilierungen sind an Aminosäure 166 und 184 möglich, potentielle Stellen für N-glykosidische Bindungsstellen konnten nicht ermittelt werden.

Folgende Abbildung zeigt zusammenfassend die schematische Darstellung des (putativen) SAM-6 Antigens. Es handelt sich um eine membranständige Isoform von GRP78, die sich durch zusätzliche O-Glykosilierungen vom GRP78-Wildtyp abhebt. Die Expression der GRP78-Isoform ist tumorspezifisch, ist also spezifisch auf der Oberfläche von Tumorzellen, nicht aber auf der Zellmembran normaler Zellen zu finden.

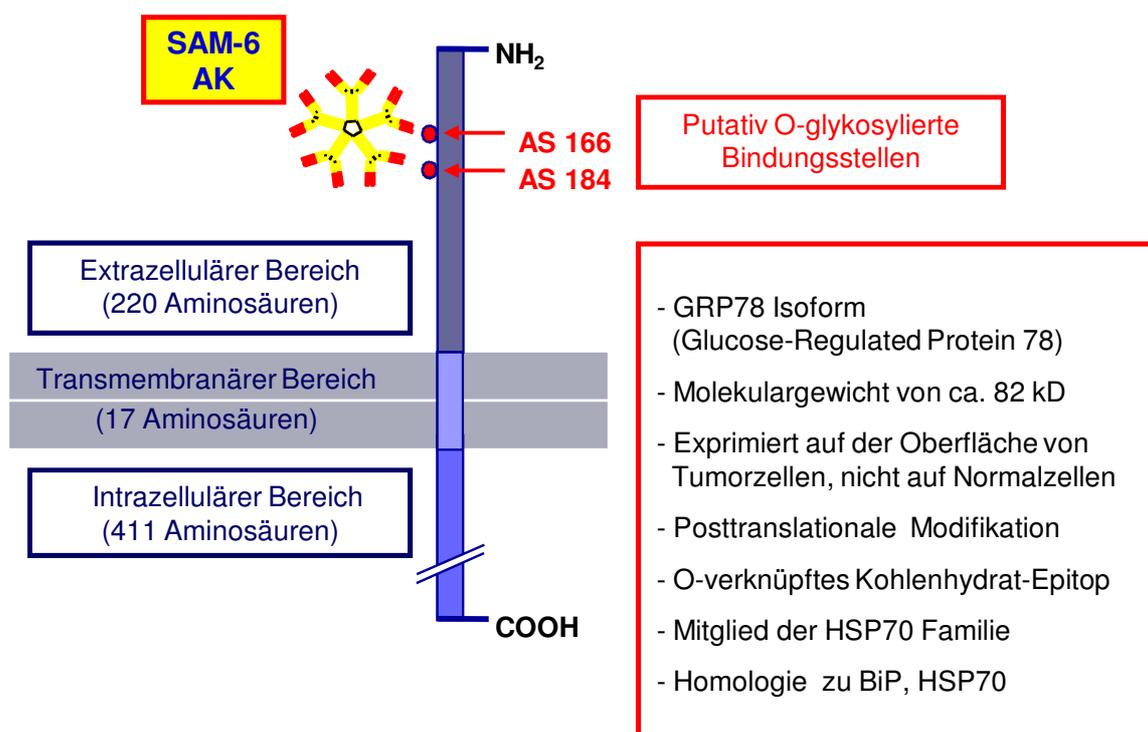


Abbildung 41: Schematische Darstellung des (potentiellen) SAM-6 Targets.

IV. Diskussion

1 Der SAM-6 Antikörper – Bedeutung und Funktion

Der monoklonale IgM-Antikörper SAM-6 stammt direkt aus dem Menschen und kann mit Hilfe der Hybridomatechnologie in nahezu unbegrenzter Menge produziert werden [61]. Die Analyse des Antikörpers ermöglicht neue Einblicke in angeborene, körpereigene Abwehrmechanismen gegen Tumorerkrankungen des Menschen. Hier dienen tumorassoziierte Veränderungen im Glykosilierungsmuster natürlich vorkommender Glykane als Angriffspunkt natürlicher IgM-Antikörper. Als Bestandteil des humoralen Immunrepertoires des Menschen und aufgrund ihrer gezielt einsetzbaren Wirkungsweise werden die natürlichen IgM-Antikörper zu Hoffnungsträgern für neue therapeutische Ansätze in der Onkologie [65, 111, 196, 197].

Neben der Erforschung des außergewöhnlichen Apoptose-Mechanismus des SAM-6 Antikörpers, stand vor allem die Identifizierung und Charakterisierung seiner Zielstruktur im Mittelpunkt dieser Arbeit. Der human Antikörper fiel insbesondere durch seine Reaktivität gegenüber Tumorzellen auf. Vergangene Arbeiten zeigten, dass der Antikörper SAM-6 spezifisch mit Tumorzellen, nicht aber mit normalen Epithelzellen oder fibroblastischen Zellen reagierte [143]. Daher wurde im Rahmen dieser Arbeit eine bereits bestehende immunhistochemische Studie erweitert und dabei ein breiteres Spektrum an Normalgeweben und epithelalem Tumorgewebe auf die Reaktion mit dem SAM-6 Antikörper hin untersucht. Die tumorspezifische Reaktion des Antikörpers konnte noch umfassender belegt werden, wobei eine große Anzahl der häufigsten Tumoren unterschiedlicher Herkunft und Organe mit einbezogen wurde. Die Bindung des SAM-6 Antikörpers beschränkte sich ausschließlich auf malignes Gewebe und fand, wie durch FACS-Analysen mit entsprechenden Zelllinien zusätzlich bekräftigt werden konnte, dabei auf der Zelloberfläche statt [143, 198].

Der humane IgM-Antikörper SAM-6 bindet an eine neue Isoform des Hitzeschockproteins GRP78 (GRP78^{SAM-6}). Das Antigen wurde über mehrstufige chromatographische Verfahren aus Tumorzellmembranextrakten aufgereinigt und nach tryptischen Verdau über die Methode des Peptidmassen-Fingerprinting mit MALDI-MS eindeutig als humanes GRP78 identifiziert. Die auf der Zellmembran lokalisierte Variante des GRP78 besitzt ein Molekulargewicht von 82 kD und wird auf einer Vielzahl verschiedener Tumorarten exprimiert. Dabei wird GRP78^{SAM-6} parallel zu der bisher bekannten GRP78-Wildtyp-Variante (78 kD) co-exprimiert. Im Gegensatz zur Wildtyp-Variante, von deren Existenz auf der Oberfläche verschiedenster Zellarten berichtet wurde [176, 180, 181, 188, 199, 200], konnte GRP78^{SAM-6} auf gesundem Gewebe bisher nicht nachgewiesen werden [65, 143]. Bei der SAM-6-spezifischen Variante des GRP78 handelt es sich um eine posttranslational modifizierte Isoform von GRP78, die spezifisch auf der Zellmembran lokalisiert ist, nicht jedoch intrazellulär zu finden ist. Sie trägt zusätzliche

Glykosilierungen, wobei O-glykosidisch verknüpfte Glykane für die Bindung und die Reaktion mit dem SAM-6 Antikörper essentiell sind. Der SAM-6-Rezeptor stellt somit eine tumorspezifische Isoform des Hitzeschockproteins GRP78 dar, deren O-glykosilierte Carbohydrat-Regionen als Epitop fungieren [65].

Ein weiteres Ziel der Arbeit lag in der Analyse der tumorspezifischen Wirkungsweise des SAM-6 Antikörpers. Durch die Bindung an GRP78 hemmt der Antikörper *in vitro* nicht nur das Wachstum von Magen- und Pankreaskarzinomzellen, sondern induziert tumorspezifisch Apoptose [143]. Dabei kommt es durch eine übermäßige Akkumulation von Lipiden zu einer unphysiologisch hohen Konzentration an intrazellulären Lipiden, Cholesterolestern und Triglyceriden, die letztendlich zur zellulären Lipotoxizität führen [143, 198]. Dieser Effekt kann durch die Anwesenheit von oxidiertem LDL (oxLDL) noch weiter verstärkt werden. Nicht transformierte Zellen hingegen zeigen keinen der beobachteten Effekte auf das Wachstumsverhalten und die Lipideinlagerungen. Es handelt sich also um einen durch den Antikörper vermittelten, direkten Effekt, der zu einer neuen Art des apoptotischen Zelltodes, der sog. *Lipoptose* führt.

Der exakte Mechanismus der Lipoptose konnte auch im Rahmen dieser Arbeit nicht abschließend geklärt werden. Der SAM-6 Antikörper bindet zum einen oxidierte LDL-Partikel und zum anderen modifiziertes GRP78 der Zelloberfläche. Den Untersuchungen zufolge liegt es nahe, dass die Lipoproteine direkt an den pentameren Antikörper binden und über diesen in die Zelle geschleust werden. Tatsächlich konnte die Internalisierung des Antikörpers über Immunfluoreszenzstudien bestätigt werden, und nach Bindung des Antikörpers an die Tumorzelle eine rezeptorvermittelte Endozytose beobachtet werden [133]. Anschließend verläuft die SAM-6-induzierte Lipoptose über einen spezifischen Signalweg, der Gemeinsamkeiten mit dem intrinsischen Signalweg aufweist, jedoch wie beim extrinsischen Signalweg über externe pro-apoptische Liganden angeregt wird. Infolge der unphysiologisch hohen intrazellulären Konzentration an oxLDL kommt es zur Induktion einer Caspasenkaskade, die nach der initialen Freisetzung von Cytochrom C aus den Mitochondrien über die Initiatorcaspasen 8 und 9 verläuft und letztendlich durch die Aktivierung der terminalen Caspasen 3 und 6 den apoptotischen Zelltod einleitet [198]. Neben dem eleganten Weg der apoptotischen Eliminierung von Tumorzellen, werden gleichzeitig, als eine Art Nebeneffekt der tödlichen Lipidanhäufung, modifizierte und damit schädliche oxLDL-Partikel aus dem Kreislauf des Organismus entfernt.

2 Natürliche Immunität des Menschen

2.1 Zelluläre und humorale Komponenten des angeborenen Immunsystems

Unter Immunität versteht man die Fähigkeit eines Organismus, Krankheitserreger und entartete körpereigene Zellen spezifisch abzuwehren. Die Immunreaktionen der Wirbeltiere lassen sich dabei in angeborene und erworbene Mechanismen unterteilen [84, 96, 201]. Die angeborene Immunität ist die evolutionär älteste Form der Immunabwehr, die den Krankheitserreger unmittelbar nach Kontakt mit dem Organismus ausschaltet [80, 202]. Sie bildet die erste Abwehrfront. Dringen Mikroorganismen in den Körper ein, werden diese rasch als potenzielle Pathogene erkannt und effizient von phagozytierenden Zellen wie Makrophagen, Mastzellen, Granulozyten (v.a. Neutrophile) und dendritischen Zellen beseitigt (Phagozytose oder Lyse). Dendritische Zellen nehmen eine besondere Rolle als Vermittler zwischen den beiden Immunantworten ein. Sie phagozytieren die Bakterien und präsentieren bei Bedarf deren Bestandteile auf ihrer Zelloberfläche und ermöglichen so die Aktivierung von T-Zellen. Des Weiteren zählen natürliche Killerzellen (NK-Zellen) zum Werkzeug der innaten Immunität, die infizierte und insbesondere krankhafte körpereigene Zellen erkennen und abtöten [91, 92]. Zur Unterstützung der Immunzellen werden zeitgleich verschiedene humorale Komponenten freigesetzt. Die Ausschüttung von Mediatoren (Zytokine, Interferone usw.) bewirkt wiederum die Aktivierung und Bereitstellung weiterer Immunzellen. Um das Erkennen von Erregern zu erleichtern, binden aktivierte Komplementfaktoren an fremdartige Oberflächen und markieren bzw. opsonisieren eingedrungene Erreger. Eine andere Form der Opsonisierung erfolgt durch sog. natürliche Antikörper, die in großer Menge von B1-Zellen (CD5-positiven Zellen) gebildet werden [61, 66, 93, 94, 96, 110, 124, 126, 127, 203]. Im Unterschied zu den Antikörpern der adaptiven Immunantwort kursieren natürliche Antikörper bereits im Blut, ohne dass ihre Bildung durch vorherigen Antigenkontakt stimuliert wurde [203].

So unterschiedlich wie die eingedrungenen Erreger, so variabel ist auch der Ablauf der angeborenen Immunantwort. Zelluläre und lösliche Faktoren bilden zusammen ein eng verzahntes und gut abgestimmtes Abwehrsystem, das schnell und effizient eingedrungene Pathogene innerhalb weniger Stunden vollständig beseitigt. Zur Aktivierung der angeborenen Immunabwehr ist keine Antigenpräsentation durch T-Zellen erforderlich, wodurch eine schnelle Reaktion bereits Minuten nach dem Eindringen von Mikroorganismen garantiert ist. Die angeborene Immunantwort ist also weit mehr als nur die erste Schutzreaktion des Körpers. In der Regel ist sie allein schon wirksam genug, um den Großteil der Infektionen zuverlässig abzuwehren [66, 82, 114].

2.2 Rezeptoren des angeborenen Immunsystems

Jahrzehntelang wurde die angeborene Immunität als unspezifisches System angesehen, dessen Hauptaufgabe im Verdau durch phagozytierende Zellen und der Präsentation fremder Peptide für immunkompetente Zellen bestand. Neue wissenschaftliche Erkenntnisse der letzten Jahre belegen jedoch, dass das angeborene Immunsystem größte Spezifität besitzt. Es besitzt die hochentwickelte Fähigkeit zwischen eigenen (*Self*) und fremden Strukturen (*Non-Self*) zu unterscheiden [79, 97, 101, 103, 105, 204, 205]. Diese Unterscheidungsfähigkeit verdankt es insbesondere einer Familie von im Verlauf der Evolution erhalten gebliebener Oberflächenrezeptoren, den *Pattern Recognition Receptors* (PRRs) [83, 206, 207]. Diese werden von vielen verschiedenen Effektorzellen der angeborenen Immunität exprimiert, insbesondere von antigenpräsentierenden Zellen (APC) wie Makrophagen, Monozyten, dendritischen Zellen und den B-Zellen [208]. Das Expressionsmuster ist dabei nicht klonal verteilt, sondern alle Zellen einer bestimmten Subpopulation exprimieren Rezeptoren einer identischen Spezifität. Die Spezifität eines jeden Membranrezeptors ist genetisch determiniert (keimbahnkodiert) und wird von Generation zu Generation weitergegeben. Die PRRs stehen ohne vorherige Reifung schnell zur Verfügung und erkennen pathogene Eindringlinge über charakteristische und hochkonservierte molekulare Merkmale (*Pathogen Associated Molecular Pattern*, PAMP) [82, 83, 115-117, 123]. Diese PAMP sind spezifisch für bestimmte Pathogene und essentiell für ihr Überleben. Sie kommen im Wirtsorganismus nicht vor und lassen sich dadurch von den körpereigenen Zellen des infizierten Gewebes unterscheiden. Anstatt spezifischer Einzelstrukturen (z.B. kurze Peptidsequenzen), handelt es sich hier um repetitive Muster, die im Lauf der Evolution praktisch unverändert erhalten blieben [115]. Meist handelt es sich um Carbohydrat- oder Lipidreste wie z.B. die Lipopolysaccharide der Bakterienhülle oder Bestandteile viraler Nukleinsäuren. Neuere Untersuchungen ergaben, dass einige der PRRs auch endogene Strukturen erkennen, die von gestressten oder geschädigten Zellen exprimiert werden [209, 210]. Zu diesen gehören unter anderem fragmentierte Bestandteile der extrazellulären Matrix (z.B. Fibronectin) [211], Hyaluronan [212], Chromatin [213] oder auch Hitzeschockproteine [214, 215].

Erkennt ein Rezeptor seinen Gegenspieler, kommt es zur sofortigen Induktion zellulärer Signalkaskaden, die zur Aktivierung von weiteren Abwehrmechanismen wie z.B. der Bereitstellung von Makrophagen oder Produktion von Zytokinen führt. Die Aktivierung der angeborenen Immunität ist somit auch Voraussetzung für die Induktion der erworbenen Immunantwort [82, 96, 99, 100, 216]. Sie wird nahtlos eingeleitet, wenn das angeborene Abwehrsystem nicht in der Lage ist, eine Infektion eigenständig abzuwehren.

3 Immunogenität von Tumoren

Malignität stellt eine Art chronische Erkrankung dar. Betrachtet man die tägliche Anzahl an sich teilenden Zellen und die dabei spontan auftretenden Mutationsraten, sind zelluläre Transformationen alltägliche und häufig auftretende Ereignisse. Dass der Organismus nicht innerhalb kürzester Zeit von Tumoren überschwemmt wird, sondern sich ein Tumor nur selten manifestiert [113], dafür sorgt das angeborene Abwehrsystem des Menschen.

Im Blutkreislauf gesunder Individuen existieren natürliche Antikörper, die in der Lage sind Tumorzellen über komplementaktivierte Zytotoxizität oder aber über diverse apoptotische Mechanismen zu zerstören [111, 112, 217, 218].

3.1 Kontrolle der Tumorentstehung durch natürliche IgM-Antikörper

Bereits Ende des 19. Jahrhunderts formulierte Paul Ehrlich mit der Seitenkettentheorie (*Side-Chain Theory*) das erste Modell zur Abwehr invasiver Partikel und transformierter eigener Zellen [25]. In seiner Theorie beschrieb er auf der Oberfläche immunkompetenter Zellen spezifische Rezeptoren, die genetisch determiniert mit bestimmten Antigenen reagierten. Er beschrieb zum ersten Mal die Existenz von Antikörpern und deren genetische Verankerung im Rahmen der Immunantwort und der Immunüberwachung. Ca. 50 Jahre später bekräftigten F.M. Burnet und L. Thomas die ehrlichsche Theorie und schrieben dem Immunsystem eine maßgebliche Beteiligung an der Überwachung von Tumoren und der Tumorentstehung zu. Sie gingen schon damals davon aus, dass Veränderungen einer Zelle, die im Rahmen der Tumorentstehung auftreten, vom Immunsystem als fremd erkannt und bekämpft werden [120-122].

Auslöser einer Immunantwort sind demnach nicht nur exogene, in den Körper eingedrungene Erreger [115, 129], sondern insbesondere krankhaft veränderte Zellen des eigenen Körpers [61, 68, 69, 123, 124, 130]. Das Immunsystem kontrolliert die Entstehung entarteter Zellen und inaktiviert sie, bevor sich ein Tumor manifestieren kann. Gefährliche zelluläre Abbauprodukte und Entartungen körpereigener Zellen werden so bereits in der Frühphase ihrer Entstehung effektiv beseitigt und eine Überhäufung des Organismus mit transformierten Zellen im Vorfeld verhindert [197].

Mit Hilfe der humanen Triomatechnologie gelang es, natürliche Antikörper direkt aus dem Menschen zu isolieren [61]. Sie werden über die Keimbahngene codiert und entstehen ohne

Affinitätsreifung [61, 126, 127]. Unter ihnen befanden sich tumorreaktive Antikörper, die überwiegend eine pentamere Struktur vom IgM-Isotyp aufwiesen [66, 95, 125, 127, 128]. Sie besaßen die Fähigkeit, entartete Zellen über modifizierte Carbohydrat-Strukturen zu erkennen und frühzeitig zu eliminieren [61, 62, 66, 93, 95, 129, 130, 197, 219]. Vereinzelt isolierbare Antikörper vom IgG- oder IgA-Isotyp zeigten hingegen keine derartige Reaktion mit Tumorzellen [61, 110].

Natürliche Antikörper spielen bei der körpereigenen Tumorbekämpfung eine entscheidende Rolle. Sie sind bereits ohne exogene Stimulation mit Antigenen im menschlichen Körper zu finden [95, 126]. So können sie nicht nur aus bereits an Krebs erkrankten Menschen, sondern ebenso und in vergleichbarer Menge aus gesunden Probanden gewonnen werden [61, 112]. Demzufolge werden tumorreaktive Antikörper nicht erst infolge eines Antigenkontakts (beim Auftreten der Tumorerkrankung) gebildet, sondern patrouillieren von Beginn an im menschlichen Körper. Sie werden von einer kleinen Untereinheit der B-Lymphozyten, den CD5-positiven B-Zellen (oder B1-Zellen) produziert [61, 62, 93, 95, 124, 127], die sich phylogenetisch, phänotypisch und funktionell von den konventionellen B2-Lymphozyten unterscheiden [124, 220].

Die genetische Kodierung der natürlichen Antikörper liegt in den Keimbahngenen fixiert vor. Sie entstehen demnach unabhängig von Mutations- und Reifungsprozessen, wie sie bei der Produktion von Antikörpern der sekundären Immunantwort bekannt sind [61, 126]. Die durch Affinitätsreifung entstandenen Antikörper scheinen bei dieser ersten Abwehrstrategie eine untergeordnete Rolle zu spielen. Sie konnten zu diesem Zeitpunkt der Immunantwort bisher weder im Tier noch im Menschen nachgewiesen werden. Ein eindeutiges Indiz dafür, dass es sich um vererbte Antikörper handelt, die dem komplexen Netzwerk der innaten Immunität zugehörig sind und nicht aus dem Antikörperrepertoire der erworbenen Immunantwort stammen. Die Tumorreaktivität der isolierten Antikörper ist demnach nicht das Ergebnis einer erworbenen sondern vielmehr der angeborenen Immunität [61].

3.1.1 Keimbahnkodierung

Die innate Immunität basiert auf einem vererbten und fixen Pool spezifischer Rezeptoren, die bevorzugt bestimmte konservative Strukturen wie z.B. Glykoproteine und Glykolipide binden [82, 83, 115]. Das Repertoire und das Reaktivitätsmuster natürlicher Immunglobuline innerhalb einer Spezies und auch zwischen den verschiedenen Spezies ist bemerkenswert ähnlich und stabil. Die genetische Stabilität scheint das Ergebnis einer evolutionären Selektion zu sein und ermöglicht Schutz gegen ein breites Spektrum pathogener Strukturen [125]. Die

keimbahnkodierten Gene der natürlichen Immunglobuline zeigen dennoch eine gewisse Variabilität. Durch geringe Deletionen, Additionen oder Mutationen bei der Rekombination wird eine genetische Variabilität der Immunglobulin-Rezeptoren garantiert [126].

3.1.2 Affinität und Reaktivität

Im Gegensatz zu den gereiften Antikörpern der sekundären Immunantwort, die eine hohe Affinität zu einem einzigen Antigen aufweisen [221], besitzen die natürlichen IgM-Antikörper der innaten Immunität geringere Affinität zu deren Epitopen. Dies ermöglicht ihnen, *oligo-* statt *monospezifisch* zu reagieren [66, 125], was wiederum die Erkennung konservativer Muster auf verschiedenen Molekülen (z.B. Carbohydrate auf Glykoproteinen und -lipiden) und damit ein breites Spektrum an Antigenen erlaubt. Aus evolutionärer Sichtweise ist diese Oligoreaktivität eine hochkonservierte Eigenschaft des Immunsystems, wie die Existenz oligoreaktiver Antikörper in den unterschiedlichsten Spezies beweist [222, 223].

Trotz der niedrigen Affinität zu deren Epitopen weisen die tumorreaktiven IgM-Antikörper dennoch eine hohe Reaktivität auf [77]. Möglicherweise nutzen sie die pentamere Struktur und potenzieren ihre Aktivität durch verschiedene Arten der Kreuzreaktivität, wie sie beispielsweise eindrucksvoll bei der Kreuzreaktivität des Antikörpers SAM-6 mit schädlichen LDL-Partikeln zu beobachten ist [143].

3.1.3 Penetration an den Wirkort

Etwa 30 % der im Blutkreislauf zirkulierenden natürlichen Antikörper sind pentamere IgM-Antikörper. Sie sind dabei nahezu in allen Geweben zu finden [77]. Trotz ihrer Größe gelingt es ihnen, endotheliale Barrieren zu überschreiten und ins Gewebe zu penetrieren. Bei *in-vivo*-Versuchen im Menschen (SC-1) und der Maus (SAM-6) erreichten die intraperitoneal applizierten IgM-Antikörper primäre bzw. subkutan implantierte Tumore [67, 134, 198]. Die pentameren Moleküle sind also in der Lage, über die Zirkulation an den Wirkort (Tumor) zu gelangen [224, 225]. Möglicherweise nutzen sie die im Vergleich zu kleineren Molekülen langsame Penetration, um durch effektive Akkumulation ihre apoptotische Wirkungsweise zu potenzieren.

3.1.4 Erkennung von Carbohydrat-Epitopen

Natürliche Antikörper sind nicht nur für die Abwehr externer Pathogene wie Bakterien und Viren zuständig. Entartete körpereigene Zellen und zelluläre Abbauprodukte werden insbesondere

durch natürlich vorhandene IgM-Antikörper frühzeitig bekämpft [197]. Sie richten sich dabei direkt gegen definierte und rein tumorassoziierte Carbohydrat-Epitope posttranskriptional modifizierter Oberflächenrezeptoren [61, 65, 72, 74]. Im Gegensatz zur Erkennung peptidischer Antigene verläuft diese Immunantwort unabhängig von der T-Zell-vermittelten Immunantwort und ist schon vor dem ersten Antigenkontakt einsatzbereit. In dieser frühen Phase der Verteidigung benötigen die IgM-Antikörper keine hohe Penetrationskraft und Affinität, sondern erkennen oligoreaktiv die konservativen Strukturen der Glykokonjugate. Durch ein Überangebot an Kohlenhydrat-Antigenen, wäre in diesem Falle eine hohe Affinität nicht von Vorteil. Zudem teilen sich die Glykokonjugate meist homologe Strukturen, die Kreuzreaktionen ermöglichen.

3.2 Immunogenität von Carbohydrat-Antigenen

Das Immunsystem wird nicht nur durch die Präsentation und Erkennung von Peptidstrukturen aktiviert. Studien der letzten Jahre belegen immer mehr, dass Carbohydrate eine kritische Rolle im Immungeschehen eines Organismus einnehmen. Neben den klassischen Peptidketten, sind es vor allem Kohlenhydrat-Epitope, die dem Immunsystem präsentiert werden. Die Kapazität des Immunsystems, ein breites Spektrum an pathogenen Molekülen zu identifizieren, wird dadurch noch weiter erhöht. Als T-Zell-unabhängige Antigene können Carbohydrat-Epitope zwar von digestiven Zellen prozessiert werden, doch in der Regel werden sie von den Immunzellen der sekundären Immunität nicht erkannt. Sie sind daher nicht in der Lage, sekundäre Abwehrmechanismen inklusive Affinitätsreifung und Gedächtnisfunktion zu initiieren [219, 226]. Sie führen zur Aktivierung der innate Immunantwort, wobei die dabei zugrundeliegenden Mechanismen noch nicht vollständig geklärt sind. Möglicherweise basieren sie auf ähnlichen Mechanismen wie die bei der Aktivierung der T-Zell-induzierten Immunantwort, auch eine Prozession bzw. Präsentation über einen MHC-ähnlichen Mechanismus ist denkbar [114, 227].

Die Antigenpräsentation im Rahmen der adaptiven Immunantwort limitiert sich auf proteosom-generierte Peptide intrazellulärer Pathogene bzw. proteolytische Peptide endozytierter extrazellulärer Pathogene [226, 228]. Die MHC-Moleküle binden typischerweise peptidische Strukturen, um Liganden für die T-Zell-Rezeptoren zu bilden. Extrazelluläre Pathogene werden dabei überwiegend über Makrophagen endozytiert, proteolytisch gespalten und über MHC II präsentiert. Intrazelluläre Pathogene hingegen, werden über MHC I präsentiert. Es findet keine Aktivierung durch Kohlenhydrate statt.

Dennoch können Carbohydrat-Epitope auf Glykoproteinen die Prozessierung und Generierung von T-Zell-Epitopen beeinflussen. Sie bestimmen die dreidimensionale Form des Proteins, können somit den Angriffspunkt von Proteasen erschweren oder erleichtern, selbst Teil des T-Zell-aktivierenden Epitops sein oder sogar die Erkennung körpereigener Antigene über die Expression bestimmter Carbohydrat-Epitope positiv oder negativ beeinflussen [229, 230]. Demnach kann die pathologische Veränderung des Glykosierungsmuster körpereigener Glykopeptide (z.B. Collagen II) gestörte immunologische Reaktionen nach sich ziehen. Vermehrte Entzündungs- und Abbauprozesse körpereigenen Gewebes sind die Folge, wie sie bei diversen Autoimmunerkrankungen wie z.B. der rheumatoiden Arthritis zu beobachten sind [230]. Hier liegen oft posttranslationale Modifikationen zugrunde, die durch die T-Zellen erkannt werden.

3.3 Die tumorspezifische Zelloberfläche als Zielstruktur natürlicher IgM-Antikörper

Zellen verändern ihren Phänotyp, um ihr Überleben in einem sich rasch ändernden Umfeld zu sichern [231]. Die Tumorzelle zeichnet sich daher im Vergleich zu einer ausdifferenzierten gesunden Zelle durch eine Vielfalt stoffwechselbedingter Besonderheiten aus, die sich auch auf die Strukturen der Zellmembran ausdehnt und zu morphologischen und funktionellen Unterschieden der Zelloberfläche führt (Abbildung 42, modifiziert nach [232, 233]).

Meist gehen pathologische Veränderungen einer Zelle mit differenzierten Veränderungen des Oligosaccharidmusters auf Proteinen und Lipiden einher [182, 183, 234]. Sie treten gehäuft in Karzinomen auf und korrelieren signifikant mit der Progression von Tumoren, der Metastasierung und der Überlebensrate der Erkrankten [182, 235, 236]. Ursächlich spielen dabei Glykosyltransferasen und Glykosidasen eine große Rolle, die vor allem in Tumorzellen überexprimiert vorliegen und die Veränderungen im zellulären Glykosierungsmuster von Proteinen und Lipiden vorantreiben. Dabei sind vielfältige Modifikationen möglich, die meist über Serin- und Threonin- (O-Verknüpfung) oder über Asparagin-Reste (N-Verknüpfung) erfolgen [132, 235]. Neben der Unter- bzw. Überexpression der natürlichen Glykosidstruktur können dabei ebenso gänzlich neue Glykosidstrukturen exprimiert werden [185].

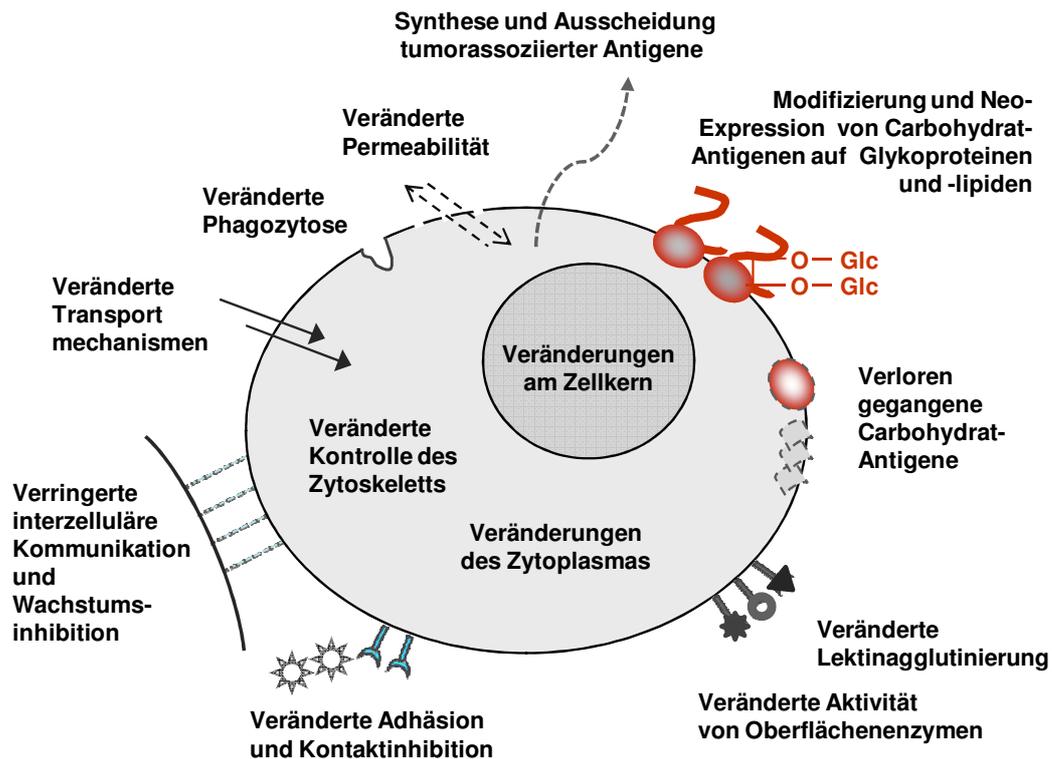


Abbildung 42: Strukturveränderungen und phänotypische Merkmale einer malignen Zelle (modifiziert nach [232, 233]).

Komplexe Oligo- und Polykondensate von Sacchariden sind als Hauptbestandteil der Zellmembranen in nahezu allen Zellen eines Organismus zu finden und spielen beim Vertebraten vor allem in biologischen Signal- und Erkennungsprozessen eine zentrale Rolle [237]. Sie liegen entweder frei oder kovalent an Lipide oder Proteine (Glykokonjugate) verankert vor, werden sezerniert oder beeinflussen in membranassoziierter Form die Oberflächenbeschaffenheit einer Zelle.

In der Kohlenhydratschicht einer Zelle lassen sich früheste Anzeichen einer tumorassozierten Veränderung detektieren, die mit bisherigen konventionellen Methoden nicht erfasst werden konnten [234]. Sowohl in der gesunden als auch in der krankhaft veränderten Zelle werden Proteine/Lipide exprimiert, die zwar die identische Grundstruktur besitzen, sich dennoch über die Signatur ihrer Glykane voneinander unterscheiden. Unterschiede zwischen gesundem und malignem Gewebe lassen sich eindeutig in dessen Carbohydrat-Profil feststellen.

3.3.1 Frei zirkulierende Carbohydrat-Antigene

Tumorzellen sind in der Lage, spezifische Glykane in den Kreislauf eines Organismus zu sezernieren. Die Bestimmung der Glykan-Level könnte die frühe Diagnose einer Tumorerkrankung oder die Kontrolle über den Verlauf der Erkrankung erleichtern.

Bisherige diagnostische Tests bestimmen Proteine, die aus dem Blut der Patienten gefiltert werden, wie z.B. das prostataspezifische Antigen (PSA), ein 34 kD Protein aus der Kallikrein-Familie. Es wird vom Drüsenepithel der Prostata und von den periurethralen Drüsen produziert und stellt den empfindlichsten Parameter in der Diagnostik des Prostatakarzinoms dar. Der organspezifische Marker ist allerdings nicht krankheitsspezifisch. Erhöhte PSA-Level weisen lediglich auf eine Erkrankung der Prostata hin und können ebenso bei anderen Erkrankungen des Organs erhöht sein (Prostatitis, benigne Prostatahyperplasie). PSA fungiert daher nicht als reiner Tumormarker, sondern richtiger als Gewebemarker. Die Definition eines zuverlässigen Grenzwertes und damit die eindeutige Unterscheidung zwischen einer gut- und bösartigen Gewebsveränderung ist hier problematisch und birgt die erhöhte Gefahr falsch-positiver Befundergebnisse [238, 239]. Das PSA-Screening allein besitzt demnach eine nur unzureichende diagnostische Aussagekraft. Ähnlich verhält es sich bei der Bestimmung des Serum-Antigens CA 125. Sein Nachweis dient zur klinischen Verlaufskontrolle bei Patientinnen mit Ovarialkarzinom. Die Serumspiegel des hochmolekularen Glykoproteins verhalten sich dabei proportional zur Tumormasse [240, 241]. Auslöser für die Expression von CA 125 sind erhöhte Laktat-Konzentrationen im Gewebe. Zum Schutz vor dabei entstehenden schädlichen Wasserstoff-Ionen kommt es zur Sekretion von CA 125 von der Tumorzelloberfläche [242]. CA 125 ist jedoch kein tumorspezifisches Antigen. Erhöhte Serumspiegel können auch im Rahmen einer Schwangerschaft, der Menstruation, bei Endometriose, Infektionen im kleinen Becken oder gutartigen Tumoren auftreten. Des Weiteren liegt kein organspezifisches Antigen vor, da auch nicht ovariale maligne Tumoren erhöhte Serumspiegel hervorrufen können [240, 243, 244]. Das Risiko falsch-positiver Befunde ist auch bei der Bestimmung des Alfa-1-Fetoproteins (AFP) nicht auszuschließen. Erhöhte Level an AFP werden im Zusammenhang mit Leberkarzinomen detektiert. Neben der Sonographie und Computertomographie unterstützt die Bestimmung der AFP-Level die frühzeitige Diagnose des hepatozellulären Karzinoms (HCC). Jedoch mangelt es auch diesem Proteinmarker an Spezifität. Ungewöhnlich hohe Konzentrationen des Glykoproteins werden im Verlauf einer Schwangerschaft produziert oder können ein Anzeichen von Keimzelltumoren oder anderen chronischen Lebererkrankungen (Hepatitis, Leberzirrhose) sein [245-247].

Zuverlässigere Ergebnisse versprechen Testsysteme, die auf der Detektion tumorspezifischer Glykane aufbauen. Beispielsweise die Bestimmung einer Variante des AFP, die zusätzliche

Fucose-Einheiten trägt [248]. Noch verlässlicher soll die Bestimmung einer Isoform des Glykoproteins GP73 sein. Amerikanische Forscher identifizierten eine wiederum mit Fucose bestückte Variante des GP73, dessen Bestimmung die Sensitivität bereits bestehender Testsysteme vervielfacht und als aussagekräftiger Marker die Diagnose von Leberkarzinomen erleichtert [249, 250]. Einige Testsysteme befinden sich derzeit in der klinischen Erprobungsphase. Verglichen mit der konventionellen Diagnostik versprechen die neuen Screenings vor allem bei Risikopatienten (z.B. Patienten mit chronischer Lebererkrankung) eine frühzeitigere und eindeutigere Diagnose von Tumoren [251].

3.3.2 Kovalent gebundene Carbohydrat-Antigene

Kovalent gebundene Carbohydrat-Antigene treten in zwei Kategorien auf. Sie liegen entweder mit Struktur- und Membranlipiden verankert (Glykolipide) oder mit Proteinen verknüpft (Glykoproteine) vor.

Bei den Glykolipiden handelt es sich meist um Glykosphingolipide, die über ihren Lipidanteil in der äußeren Zellmembran verankert sind. Der Aminodialkohol Sphingosin bildet das strukturelle Grundgerüst, an welches langkettige Fettsäuren und komplexe Oligosaccharide geknüpft werden. Je nach Art des verknüpften Zuckermoleküls lassen sich die Glykosphingolipide wiederum in neutrale Glykolipide (Cerebroside) und negativ geladene Glykolipide (Ganglioside und Sulfatide) unterteilen. Je nach Art und Verknüpfung der nach außen ragenden Oligosaccharide werden die Eigenschaften der Zelloberfläche entscheidend geprägt [252, 253]. Alle Funktionen der Glykosphingolipide sind bislang nicht vollständig geklärt. Hauptsächlich sind sie bei zelltypspezifischen Adhäsions- und Interaktionsprozessen beteiligt und bei einer Vielzahl von Signaltransduktionswegen von Bedeutung [254, 255]. Einige dienen als Rezeptoren für Bakterien, Toxine und Viren oder werden mit unterschiedlichsten Krankheiten unterschiedlicher Pathogenese (z.B. kardiovaskulärer Art, Autoimmunprozesse etc.) in Verbindung gebracht [256].

Glykosphingolipide sind vor allem bei der Onkogenese von Bedeutung. Die Glykolipide modulieren Signalvorgänge, die für Wachstum, Invasion und Metastasierung von Tumoren essentiell sind und korrelieren so negativ mit der Überlebenschance eines Erkrankten. Glykogene Transformationen (initial onkogen) führen zur aberrierenden Expression natürlich vorhandener Ganglioside bzw. glykosilierter Ganglioside, wie sie normalerweise nicht auf der Zelle exprimiert werden [257-259]. Beispielsweise werden die Ganglioside GM2, GD2 oder GD3 auf den meisten Tumorarten neuroectodermalem und epithelialelem Ursprungs exprimiert [260], wobei steigende Level an Gangliosid meist mit dem Grad an Malignität korrelieren [258, 259].

In diesem Zusammenhang ist gleichzeitig die Überexpression neutraler Glykolipide wie Globo H oder Lewis^y (CD174) auf der Oberfläche epithelialer Tumore zu nennen [261]. Hohe Expressionsraten des Globo H Carbohydrat-Antigens werden im Vergleich zu Globo H-negativen Tumoren mit einer schlechten Prognose in Verbindung gebracht [262]. Das Lewis^y Carbohydrat-Antigen liegt auf neoplastischem gastrointestinalem Gewebe in stark überexprimierter Form vor. Das Neuraminsäurederivat der Lewis-a-Blutgruppen-Determinante besitzt prokoagulierende und angiogene Eigenschaften und kann daher positiven Einfluss auf die Tumorentstehung und -wachstum nehmen [263]. Als Tumormarker (CA 19-9) dient seine Bestimmung im Serum zur Therapie- und Verlaufskontrolle beispielsweise bei der Behandlung des Pankreaskarzinoms.

Neben den Glykolipiden gehören die Glykoproteine zur Gruppe der membrangebundenen Carbohydrat-Antigene. Zu ihnen gehören membrangebundene Muzine, die in nahezu allen Organen des Menschen zu finden sind. Muzine regulieren aufgrund ihrer Größe und Ladung die Adhäsion von Zellen und Mikroorganismen an Epithelzellen und erhalten die Barrierefunktion der Schleimhäute aufrecht. In der Diagnostik zählen die Muzine MUC1 (CA 15-3) und MUC4 mittlerweile zu potentiellen Tumormarkern [264-267]. Zusätzlich zu ihrer normalen physiologischen Expression werden sie auf epithelialen Tumoren, zahlreichen Adenokarzinomen, Lymphomen und beim multiplen Myelom überexprimiert und aufgrund der verminderten Zelladhäsion mit der Metastasenbildung und aggressivem Tumorwachstum in Zusammenhang gebracht [264, 265, 267]. Sie destabilisieren interzelluläre Kontakte, erleichtern so die Motilität maligner Zellen und erschweren den Angriff immunkompetenter Zellen [264]. In Folge der malignen Transformation exprimieren Tumorzellen Muzine mit einem veränderten Oligosaccharidmuster [234, 257, 264]. Die modifizierten Carbohydrat-Epitope sind als Thomsen-Friedenreich-Antigen (TF, CD176) bzw. als T-nouvelle-Antigene bekannt (Tn, CD175, und sialyl-Tn, CD175s) [268]. Typischerweise sind die Glykotope auf verschiedenen neoplastischen Geweben zu finden, in der Regel aber nicht auf gesundem Gewebe [257, 264, 268].

3.3.3 Carbohydrat-Antigene auf Schutzmolekülen und Wachstumsfaktoren

Durch Veränderungen des Phänotyps versucht ein Tumor, die Immunüberwachung eines Organismus zu umgehen. Mit Hilfe der unterschiedlichsten Mechanismen versucht er, den Zelltod zu verhindern, indem er versucht Wachstumsfaktoren zu autonomisieren oder inhibitorische Signale zu ignorieren. Um ein schnelles und aggressives Wachstum zu erlangen, werden Wachstumsfaktoren und Schutzmoleküle überexprimiert und modifiziert [111, 269, 270]. Die natürlichen Immunmechanismen eines Menschen greifen genau an diesen Molekülen an,

die ursprünglich zum Schutz des Tumors dienen. Der Mensch besitzt von Natur aus zytotoxische Antikörper, die sich gegen modifizierte Oligosaccharidsequenzen der ursprünglich tumorprotektiven Glykokonjugate richten [61, 133, 217, 269]. Von verschiedenen Arbeitsgruppen wurden zytotoxische Antikörper isoliert, deren Angriffspunkt ein verändertes Glykosilierungsmuster auf Glykokonjugaten darstellt. Neben Antikörpern gegen Glykolipide wie GM2 und GD2 [218, 271] oder das MUC1 Glykoprotein [272], sind es vor allem natürliche IgM-Antikörper, die sich gegen modifizierte Wachstumsrezeptoren und Schutzmoleküle richten [61, 68, 69, 111, 124, 130]. Der natürliche IgM-Antikörper SC-1 wurde aus einem an Sichelzellkarzinom erkrankten Patienten gewonnen [62]. Er erkennt über N-verknüpfte Carbohydrat-Epitope einen modifizierten CD55-Rezeptor [73]. CD55, auch bekannt als DAF (*Decay-Acceleration Factor*), verhindert die Zellyse durch Aktivierung des autologen Komplements [273]. Maligne epitheliale Zellen sind für die Überexpression dieses Schutzmoleküls bekannt [135]. Auf der Membran von Magenkarzinomzellen wurde neben dem CD55-Wildtypen eine modifizierte Variante des Rezeptors entdeckt [74]. Der natürliche IgM-Antikörper PAM-1 bindet über eine modifizierte Carbohydrat-Region an den CFR-1-Wachstumsrezeptor (*Cysteine-Rich Fibroblast Growth Factor Receptor*) und blockiert dessen ursprüngliche Funktion [71, 72]. Die modifizierte Variante des CFR-1-Rezeptors wird ausschließlich auf epithelialen Tumorzellen und Präkanzerosen exprimiert [69, 71]. Eine weitere Gruppe membrangebundener Proteine, die im Rahmen einer malignen Erkrankung auf Tumorzellen modifizierte Glykosilierungen aufweisen, stammt aus der Familie der Hitzeschockproteine. Hitzeschockproteine sind als intrazelluläre Proteine mit Chaperon-Funktion bekannt, die insbesondere bei der Faltung und Generierung von Proteinen, deren Transport innerhalb bzw. aus der Zelle heraus und bei Signalvorgängen beteiligt sind [274]. Charakteristischerweise werden sie in und auf der Oberfläche maligne transformierter Zellen überexprimiert und modifiziert [275]. Die Überexpression von Hitzeschockproteinen ist offensichtlich für die Entwicklung von Therapieresistenzen verantwortlich, korreliert mit dem Malignitätsgrad eines Tumors und wird somit direkt mit einer schlechten Prognose in Verbindung gebracht [275, 276]. Kürzlich wurde auf malignem Prostatagewebe eine tumorspezifisch glykosilierte Isoform des bisher bekannten Hitzeschockproteins GRP94 (GP96) identifiziert, einem Mitglied der HSP90 Familie [132]. Eine ähnliche Beobachtung wurde bei Proteinen der HSP70 Familie gemacht, deren Expression für ein besonders aggressives Tumorstadium steht [275]. Hohe Level des Hitzeschockproteins GRP78 wurden auf der Oberfläche häufig vorkommender Tumorarten, wie Mamma-, Lungen-, Magen-, Leber- oder Prostatakarzinom entdeckt [177, 275]. Im Rahmen dieser Arbeit wurde eine membranständige Variante des Chaperons identifiziert, die im Vergleich zum GRP78-Wildtypen ein

posttranslational modifiziertes Glykosilierungsmuster trägt [65]. Sie fungiert als Zielmolekül für den humanen IgM-Antikörper SAM-6, der aus einem an Magenkarzinom erkrankten Patienten isoliert werden konnte [143]. Er bindet über O-glykosidisch verknüpfte Carbohydratreste an das tumorspezifische Glykoprotein [65] und induziert eine unkontrollierte Anhäufung intrazellulärer Lipide, die letztendlich zur Apoptose der Tumorzelle führt [143, 198]. Wie auch die Expression seines Antigens GRP78^{SAM-6}, beschränkt sich seine Reaktivität dabei ausschließlich auf malignes Gewebe [143, 198].

In allen geschilderten Fällen wird, aufgrund einer Modifikation, die der Tumorzelle ursprünglich das Überleben sichern sollten, ein Tumor angreifbar und eröffnet dadurch die Möglichkeit neuer Therapieansätze in der Onkologie [111, 270].

4 GRP78 - Bedeutung und Funktion des Hitzeschockproteins

Der bisher bekannte GRP78-Wildtyp wird sowohl intrazellulär als auch extrazellulär exprimiert. Eine erhöhte Expression des Chaperon-Moleküls dient der Zelle zum Schutz gegen diverse zelluläre Stressoren endogenen und exogenen Ursprungs. Im Rahmen einer Tumorerkrankung wird seine Expression v.a. mit der Entwicklung von Resistenzmechanismen, mit einem hohen Grad an Malignität und schlechten Prognosen in Verbindung gebracht [177, 276].

4.1 Struktur und Funktionsweise des intrazellulären GRP78

GRP78 (*Glucose Regulated Protein 78 kD*) ist auch unter den Namen BiP (*Immunoglobulin Binding Protein*), HSPA5 (*Heat Shock Protein A5*), HSP78 (*Heat Shock Protein 78 kD*) oder als luminales Calcium-bindendes Protein (*Luminal Ca²⁺ Binding Protein*) bekannt und ist aufgrund seiner molekularen Struktur ein Mitglied der HSP70 Familie (*Heat Shock Protein 70 kD*) [277]. Abbildung 43 zeigt die zwei Hauptdomänen des GRP78, die sich in eine ATP-Bindungsstelle am N-Terminus und in eine Peptidbindungsstelle am C-Terminus untergliedern [278, 279]. Seine ATPase-Aktivität wird durch die Bindung von Peptiden am C-Terminus beeinflusst. Durch das Tragen einer KDEL-Signalsequenz (C-Terminus) ist das molekulare Chaperon hauptsächlich im Endoplasmatischen Retikulum (ER) lokalisiert [280]. Dort ist es für die korrekte Faltung und Oligomerisierung von Proteinen verantwortlich, dessen Bindung über deren hydrophobe Bereiche erfolgt und dem Chaperon nur im denaturierten oder nicht korrekt

gefalteten Zustand zugänglich sind [278, 279, 281]. GRP78 kooperiert synergistisch mit einer Vielzahl an Chaperonen und Enzymen, um die fehlerfreie Faltung und Oligomerisierung anderer Proteine zu gewährleisten [278, 282, 283]. Im inaktiven Zustand liegt GRP78 neben seiner monomeren Form als Oligomer vor. In diesem Aggregatzustand wurde von posttranslationalen Phosphorylierungen und ADP-Ribosylierungen berichtet, die als Reservoir an schnell verfügbarem GRP78 dienen [283-285]. Bindet ein Protein an ein Oligomer, führt dessen Auflösung zur Freisetzung der monomeren und zum Rückgang der modifizierten Form [284, 285]. Ein Anstieg an ungefalteten oder unvollständigen Peptiden im Lumen des ER führt also zur Abnahme an modifizierten Aggregaten, zum Anstieg an freien GRP78-Monomeren und zur Induktion der ATPase-Aktivität [284, 285]. Sinkt schließlich die Peptidkonzentration im ER, werden die gebunden Polypeptide nach erneuter Bindung von ATP wieder freigesetzt, und es bilden sich wieder modifizierte GRP78-Aggregate, die sich erneut zum Oligomer anlagern [278]. Eine weitere Modifikation des GRP78 wurde in der Synovialflüssigkeit rheumatoider Patienten nachgewiesen. Diese Variante des GRP78 trägt O-glykosidisch gebundene Kohlenhydrate und war ursprünglich als Auto-Antigen p68 bekannt [179]. Interessanterweise wiesen die Seren derselben Patienten körpereigene Antikörper auf, die sich genau gegen diese Carbohydrat-Struktur richteten. Daher ist es also nicht auszuschließen, dass auch bei der SAM-6 spezifischen Variante des GRP78 eine ähnliche posttranslationale Modifikation vorliegt.

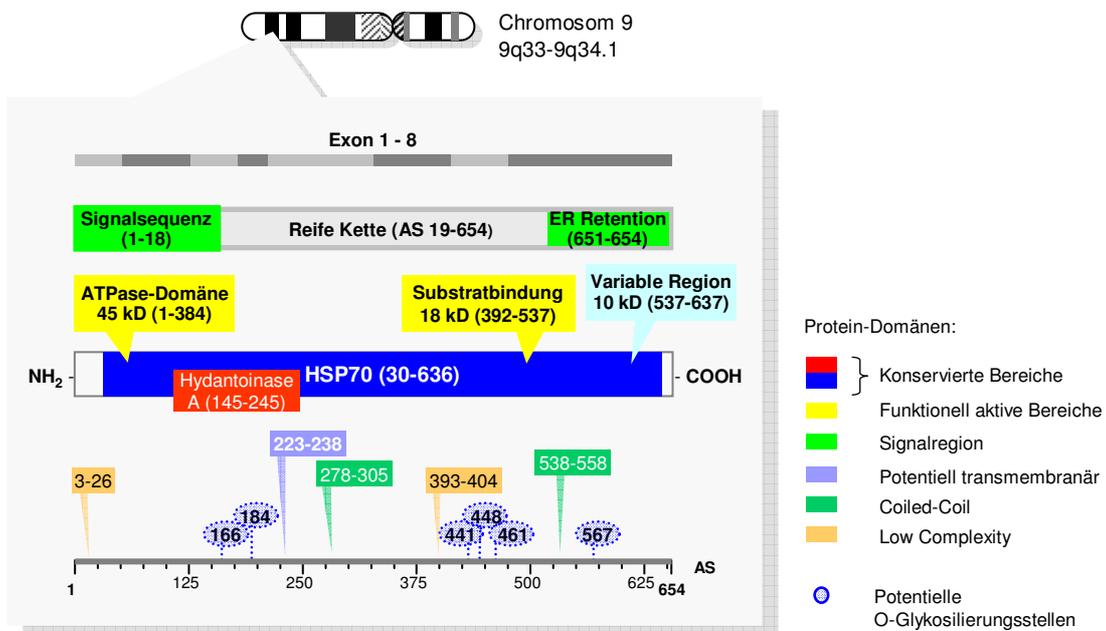


Abbildung 43: Schematische Darstellung der molekularen Struktur des GRP78 (HSPA5).

4.2 Physiologische Rolle des intrazellulären GRP78

GRP78 ist bei der Maturierung verschiedenster Proteine beteiligt [286]. Es interagiert mit Immunglobulinen, bindet dabei die schweren Ketten bis diese mit den leichten Ketten assoziiert sind [287]. Ebenso ist GRP78 bei der Reifung von Apolipoprotein B beteiligt [288] oder verhindert durch seine Bindung, dass mutante Formen des LDL-Rezeptors die Zelloberfläche erreichen [289]. Des Weiteren assoziiert GRP78 mit MHC Molekülen und ist beispielsweise bei der Generierung oder Beladung von MHC Klasse I-Molekülen beteiligt [290].

Molekulare Chaperone wie GRP78 sind nicht nur für die Qualitätskontrolle von Proteinen zuständig, sondern gleichzeitig bei regulatorischen Abläufen im ER involviert [274, 291, 292]. Dabei entfaltet GRP78 vor allem anti-apoptotische Eigenschaften. Das Protein neutralisiert negative Auswirkungen physiologischer und umweltbedingter Faktoren und sichert dadurch das Überleben der Zelle. Neben endogenen physiologischen Faktoren wie Nahrungsmangel, Hypoxie, Acidose oder oxidativem Stress können auch exogene umweltbedingte Stressfaktoren wie Temperatur (Hitzeschock), UV-Strahlung, virale oder bakterielle Infekte und vor allem Chemotherapeutika eine Störung des ER-Gleichgewichts verursachen [293]. Auch Substanzen die die Calcium-Homöostase beeinflussen (z.B. Ca-Ionophore, Ca-Chelatoren) oder Glykosilierungsabläufe inhibieren (z.B. Tunicamycin, Thapsigargin), stören den geregelten Ablauf im ER [177, 292]. Es kommt zur Anhäufung mißgefalteter Proteinen, woraus ein Ungleichgewicht zwischen ER-Funktion und ER-Kapazität und damit ER-Stress entsteht.

Ausgelöst durch die überhöhte Konzentration an unreifen und nicht korrekt gefalteten Proteinen, kommt es zur verstärkten Transkription des Grp78-Gens und einer erhöhten Produktion des GRP78-Proteins, um das Überangebot an Proteinen durch vermehrte Faltungs- und Abbauprozesse zu reduzieren. Die Induktion verläuft über einen Signaltransduktionsweg, der als sog. *UPR (Unfolded Protein Response)* bezeichnet wird. Die UPR setzt sich aus einem Netzwerk verschiedener Signaltransduktoren zusammen, wobei die in der ER-Membran verankerten Transkriptionsfaktoren PERK, ATF6 und IRE1 als Signalsensoren fungieren [177, 292]. GRP78 interagiert mit den Sensorproteinen und hält diese unter stressfreien Bedingungen in inaktiver Form [177, 294]. Steigt der intrazelluläre Gehalt an zu prozessierenden Proteinen an, dissoziiert GRP78 von den Sensorproteinen, die daraufhin *ER Stress Response* Elemente (ERSE) aktivieren und über weitere Signalkaskaden den Grp78-Promotor und die Transkription von Chaperonen anstoßen. Reicht die Aktivierung des UPR-Signalwegs nicht aus, um den ER-Stress auszuschalten, laufen in der bereits beschädigten Zelle apoptotische Signalwege an. GRP78 hemmt durch unterschiedliche Mechanismen die Signalkaskaden der bereits begonnenen Apoptose und entfaltet seine anti-apoptotische Wirkung [177, 292].

Das ER ist nicht nur ein wichtiges Kompartiment für die Proteinbiosynthese, sondern gleichzeitig ein wichtiges Speicherorgan für intrazelluläres Calcium. Durch seine Calcium-bindenden Eigenschaften dient GRP78 als eine Art Puffersubstanz, die den Calcium-Ausstrom vom ER ins Zytosol und somit den Calciumhaushalt der Zelle reguliert [177, 295]. ER-Stress-induzierte apoptotische Stimuli (z.B. oxidativer Stress verursacht durch mitochondrialen Calcium-Überschuss) werden dadurch vermindert [296]. Des Weiteren inhibiert GRP78 die Aktivierung pro-apoptotischer Komponenten (z.B. BIK, BAX) [177, 297] und verhindert dadurch die mitochondriale Freisetzung von Cytochrom C und die folgende Aktivierung von Initiator- und Effektorcaspasen [177, 298, 299]. In der Literatur wurde ebenso die direkte Interaktion von GRP78 mit Procaspasen (Procaspase 7 und 12) beschrieben, wodurch GRP78 direkt Einfluss auf die Aktivierung der Caspasenkaskade ausübt und die finale Aktivierung von Effektorcaspasen verhindert [299, 300].

4.3 Translokation von GRP78 an die Zelloberfläche

Die Lokalisation des GRP78 beschränkt sich nicht nur auf das ER. Unter bestimmten Bedingungen wurde das Chaperon im Zellkern [179] und interessanterweise auch extrazellulär auf der Oberfläche diverser Zellen nachgewiesen [180, 181, 292].

Dabei bleibt bisher ungeklärt, über welchen Mechanismus GRP78, dessen Lokalisation im ER über die KDEL-Signalsequenz (Tetrapeptid Lys-Asp-Glu-Leu) am C-Terminus gewährleistet ist, dennoch aus dem ER an die Zelloberfläche oder in andere Zellkompartimente gelangen kann. Möglicherweise kommt es im ER infolge einer chronischen Stressinduktion zu einer Überexpression an GRP78. Vorhandene KDEL-Rezeptoren können das Überangebot an GRP78 nicht abfangen und nach Sättigung der Rezeptoren gelangt freies GRP78 über den konventionellen sekretorischen Signalweg an die Zelloberfläche [177, 301]. Die KDEL-Sequenz des Moleküls bleibt dabei erhalten und ragt in den extrazellulären Raum. Zusammen mit GRP78 wurden auch andere Proteine, die ursprünglich als intrazellulär bekannt waren, über ihre KDEL-Tetrapeptidsequenz an der Oberfläche gestresster Zellen identifiziert [301, 302]. Einige Arbeitsgruppen vertreten die These, dass GRP78 gebunden an andere Peptide an die Oberfläche gelangt. Aufgrund seiner Affinität zu Lipiden sind Multiproteinkomplexe denkbar, die während des Faltungsprozesses durch hydrophobe Wechselwirkungen mit lipidhaltigen Proteinen entstehen und dabei zusätzlich die KDEL-Funktion blockieren könnten [301, 302]. Sie gehen davon aus, dass GRP78 keine Transmembrandomäne aufweist, sondern über transmembranär verankerte Peptide an der Zelloberfläche fixiert vorliegt. Die Existenz einer

Transmembrandomäne wird demnach kontrovers diskutiert. Betrachtet man die Peptidsequenz, ist laut Extrapolation basierend auf der Aminosäuresequenz des GRP78 eine transmembranäre Verankerung möglich, deren Existenz von anderen, unabhängigen Arbeitsgruppen wiederum belegt werden konnte [177, 301]. Eigene Ergebnisse aus der FACS-Analyse mit Anti-GRP78 Antikörpern belegten, dass das N-terminale Ende des Proteins eindeutig in den Extrazellularraum ragt, wie aus der Bindung des Anti GRP78 Antikörpers, der gegen eine am N-terminalen Ende lokalisierte Peptidstruktur gerichtet war, gefolgert werden kann. Ein gegen das C-terminale Ende gerichteter Anti GRP78 hingegen wies keine eindeutige Bindung auf lebenden Zellen auf. Entweder ist dieses Ende des Proteins über die Bindung an andere Peptide (in der Zellmembran fixierte Peptide) blockiert oder das C-terminale Ende ragt ins Zellinnere und kann dadurch nicht detektiert werden. Als dritte Möglichkeit ist eine sterische Hinderung denkbar, wobei der C-terminale Teil zwar ebenso in den Extrazellularraum ragt, aber dabei so ungünstig präsentiert wird, daß der Antikörper nicht angreifen kann. Für letztere Erklärung sprechen die Beobachtungen von Delpino und Kollegen, die die am C-terminalen Ende lokalisierte KDEL-Peptidsequenz über einen Antikörper, der gegen diese Peptidsequenz gerichtet war, an der Oberfläche von Tumorzellen detektieren konnten (Abbildung 44). Zusammenfassend kann keine eindeutige Aussage bezüglich der Existenz einer Transmembrandomäne gefolgert werden, die Summe der genannten Indizien spricht jedoch für die Fixierung des GRP78 über einen transmembranären Bereich (Abbildung 44).

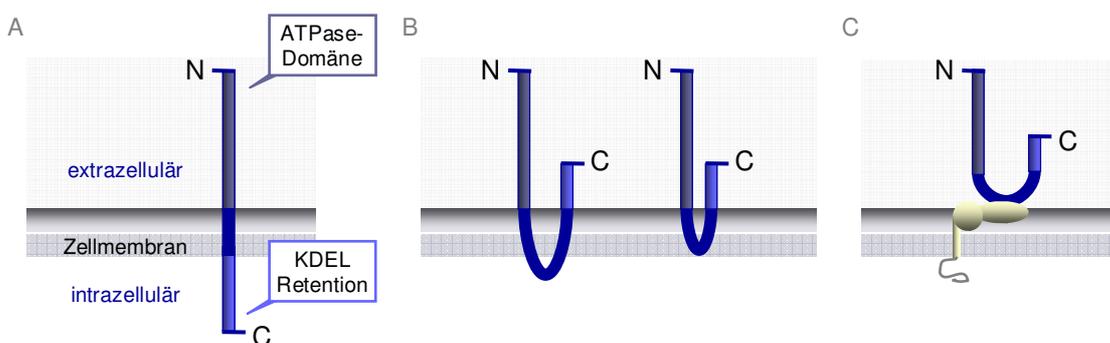


Abbildung 44: Schematische Darstellung der möglichen Membranverankerungen des SAM-6-Antigens. **A.** Transmembran-Verankerung, der C-terminale Teil ragt ins Zellinnere. **B.** Transmembran-Verankerung, der C-terminale Teil ragt in den Extrazellularraum. Der transmembranäre Abschnitt ragt hierbei in den intrazellulären Raum oder liegt eingebettet in der Zellmembran vor. **C.** Keine Transmembran-Verankerung, GRP78 komplexiert mit transmembranär verankerten Peptiden. Beide Enden ragen in den extrazellulären Raum. (*N* – *N*-terminales Ende, *C* – *C*-terminales Ende des Proteins)

4.4 Physiologische Rolle des extrazellulären GRP78

Teile des synthetisierten GRP78 sind auf der Membran verschiedener Zellen zu finden. Damit ist das Protein nicht nur intrazellulär zum Schutze der Zelle aktiv, sondern erfüllt ebenso auf der Zelloberfläche Funktionen als Signalgeber und Rezeptor für verschiedene Liganden. Beispielsweise ist membranständiges GRP78 bei der Antigenpräsentation über MHC Klasse I-Moleküle involviert [290], dient als Co-Rezeptor für Viren [199, 303], oder kommt als Rezeptor für den Angiogenese-Inhibitor Kringle 5 [181] und der aktivierten Form des Plasmaproteinase-Inhibitors α_2 -Macroglobulin zum Einsatz. Bindet α_2 -Macroglobulin an membranassoziiertes GRP78, kommt es zur Induktion einer mitogenen Signalkaskade, die schließlich zur Blockade des programmierten Zelltods und zur Steigerung der zellulären Proliferation führt. Dies resultiert im Falle einer Tumorzelle in der Erhöhung des metastatischen Potentials [200, 304].

4.5 Rolle des GRP78 bei der Tumorentstehung

Die molekularen Schutzmechanismen des GRP78 machen sich neben gesunden Zellen insbesondere maligne Zellen zu Nutze, die durch die gesteigerte Expression solcher Schutzmoleküle ihr Überleben sichern. Tumorzellen müssen ihren zellulären Umsatz aufgrund eines erhöhten Nahrungs- und Energiebedarfs anpassen [231]. Infolge der schlechten Vaskularisierung der Tumoreareale kommt es neben mangelnden Nährstoffbedingungen zur Hypoxie und zur Acidose im metabolischen Umfeld der Zellen [305, 306]. Gleichzeitig setzen ständig ablaufende immunologische Abwehrmechanismen die Zellen unter Stress [124, 130]. Maligne Zellen sind daher permanent zellulärem Stress ausgesetzt und es ist nicht verwunderlich, wenn es infolgedessen in Tumorgeweben zur Aktivierung der *UPR* und einer natürlichen Induktion von Hitzeschockproteinen kommt. Hohe Expressionsraten an Hitzeschockproteinen verhindern zelluläre und molekulare Schäden und verlängern das Leben der Zelle [177, 275, 292].

Erste Hinweise darauf, dass GRP78 für die Proliferation von Zellen und das Wachstum von Tumoren essentiell ist, wurden mittels *Grp78-Knock-out*-Versuchen in Fibrosarkomazellen erhalten. GRP78-defiziente Zellen waren nicht in der Lage, Tumore zu bilden. Hingegen führte die Aktivierung des *Grp78*-Promotors *in vivo* zum Wachstum der Tumoren, was mit Hilfe von Maus-Xenograft-Modellen gezeigt werden konnte [176].

Neueste Untersuchungen zeigten, daß das *Grp78*-Gen ebenso durch ER-Stress unabhängige Mechanismen aktiviert werden kann. Zum Beispiel kann der onkogene Transkriptionsfaktor

c-Myb, der vor allem mit der Entwicklung von Kolonkarzinomen in Zusammenhang gebracht wird, den Grp78-Promotor aktivieren und eine endogene GRP78-Induktion hervorrufen [307]. Andere Arbeiten berichteten von Chromatin-Modifikationen, die die Transkription von Grp78 regulieren sollen [308]. Zudem können extrazelluläre Stimuli über membranständiges GRP78 intrazelluläre Signale auslösen, die wiederum die Tumorpheriferation anstoßen, wie bereits unter 4.4 erläutert wurde [304]. Neben seiner schützenden Aktivität gegen zellulären Stress ist GRP78 somit auch direkt an der Proliferation von Tumorzellen beteiligt.

In verschiedenen Tumorgeweben wurden hohe Expressionsraten an GRP78 entdeckt, z.B. bei Karzinomen der Lunge [309, 310], des Magens [311, 312], der Brust [313-315], hepatozellulären Karzinomen [316, 317] oder Karzinomen der Blase und der Prostata [318-321]. Histologische Untersuchungen belegten die Existenz erhöhter GRP78-Level sowohl intrazellulär als auch auf der Zelloberfläche aggressiver Tumoren. Die Überexpression dieses Chaperons korreliert ganz offensichtlich mit einer erhöhten Therapieresistenz und einem erhöhten Grad an Malignität und steht daher meist für eine schlechte Prognose. Diese negative Korrelation konnte *in vitro* [315, 321, 322] und bei Patienten mit Mamma- und Prostatakarzinom eindeutig bestätigt werden [313, 318, 320]. Zhang *et al.* Bestätigten ebenfalls, dass sich bei Patienten mit primären Magentumoren und metastasierenden Lymphknoten die Expressionsrate an GRP78 invers zur Überlebensrate der Patienten verhielt [312].

Mit der schlechten Prognose korrelierte ein weiterer interessanter Aspekt: Im Serum von Prostatakarzinom-Patienten wurden natürliche Antikörper gegen GRP78 entdeckt [323, 324]. Bisher ist noch unklar, ob diese Antikörper agonistische oder antagonistische Aktivität besitzen, da Antikörper gegen GRP78 auch im Serum gesunder Probanden nachgewiesen wurden [301]. Doch deren Existenz belegt klar die antigene Eigenschaft des an der Zelloberfläche lokalisierten GRP78 [318].

4.6 Rolle des GRP78 in der Tumortherapie

Tumorzellen, die Schutzmoleküle exprimieren, werden gerade durch diese Moleküle für neue Therapien empfänglich. Das gezielte Ausschalten der GRP78-Expression oder GRP78-Funktion ermöglicht neue Ansätze innerhalb der Tumortherapie. Die Expression von GRP78 stellt sich aber nicht nur als attraktives Zielmolekül gegen Tumorzellen dar sondern eignet sich dabei gleichzeitig als endogener Biomarker für das Ansprechen einer Therapie oder zur Kontrolle des Wachstumsverhaltens eines Tumors [276].

Der therapeutische Effekt bereits bekannter Therapien kann durch das Auftreten stressprotein-induzierter Resistenzmechanismen stark limitiert werden [176, 177, 297]. Nichtsteroidale Antirheumatika wie der COX2-Inhibitor Celecoxib [325, 326], das Spurenelement Selen [327, 328], Chemotherapeutika oder Angiogenese- und Vaskularisationshemmer [322] rufen in Tumorzellen Apoptose hervor. Sie induzieren gleichzeitig die Produktion von GRP78 und folglich die Unterdrückung der gewünschten Apoptose [276]. GRP78-defiziente Zellen werden für das jeweilige Agens wieder zugänglich, was die direkte Involvierung von GRP78 bei einer therapieinduzierten Resistenz verdeutlicht [177, 322]. Chemotherapeutika aktivieren pro-apoptotische Komponenten, die, wie bereits unter 4.2 erläutert, direkt durch GRP78 komplexiert und inaktiviert werden und damit zu einer allgemeinen Chemotherapieresistenz führen [276, 292].

In diesem Falle könnten Kombinationstherapien neue Ansätze bei der Bekämpfung refraktärer Tumore darstellen. Bisher wurden eine Reihe natürlicher Substanzen entdeckt, die in pharmakologischen Konzentrationen die Expression oder die Aktivität von GRP78 hemmen, und somit unterstützend beim Einsatz gegen Tumorerkrankungen denkbar erscheinen. Eine solche Wirkung ist bisher von Genistein bekannt, einem Phytoöstrogen der Sojabohne [329], von (-) Epigallocatechingallat, einem Bestandteil des grünen Tees [330] oder der aus Pflanzen isolierten Salicylsäure [331]. Ein bakterielles Toxin, das AB₅ Subtilase-Toxin, ist in der Lage, die anti-apoptotische Funktion des GRP78 zu inaktivieren, indem es GRP78 in der Region zwischen der ATPase- und der Peptidbindungsdomäne spaltet [332, 333]. Auch Interleukin-24 interagiert mit intrazellulärem GRP78. Das Interleukin wird von Immunzellen produziert, unterdrückt das Tumorwachstum und induziert tumorselektiv Apoptose [334].

Die genannten Substanzen wirken auf verschiedene zelluläre Zielmoleküle und Signalwege ein und beeinflussen dabei die Wirkungsweise und die Expression von GRP78. Eine gezielte Therapie gegen oberflächenständiges GRP78 ist hiermit nicht erreichbar. Durch die Entdeckung von extrazellulär lokalisiertem GRP78 ergaben sich weitere Therapieansätze. Es wurden synthetische Peptide entwickelt, die gegen extrazelluläres GRP78 gerichtet waren. Sie wurden mit einer pro-apoptotischen Sequenz ausgestattet oder schleusten durch Endozytose toxische Substanzen wie Taxol in die Zelle und lösten dadurch Apoptose aus [318, 335]. Einen weiteren Ansatz bietet der Angiogenese-Inhibitor Kringle 5 (K5). K5 wird über extrazelluläres GRP78 internalisiert, blockiert die anti-apoptotische Aktivität von GRP78 und induziert den Zelltod [181].

4.7 Protektive Eigenschaften der GRP78-Überexpression

Da die Expression von GRP78 nicht nur auf Tumorzellen beobachtet wurde, ist neben der bisher beschriebenen, negativen Rolle des Proteins im Rahmen einer Tumorerkrankung eine erhöhte Expression von GRP78 auf normalen Zellen auch mit protektiven Eigenschaften verbunden (Abbildung 45). Die Herabregulation von GRP78 im Rahmen einer Krebstherapie birgt daher die Gefahr unerwünschter Nebenwirkungen in sich: Hohen Konzentrationen an intrazellulärem GRP78 werden protektive Eigenschaften bei neuro-degenerativen Erkrankungen wie der Parkinsonschen oder der Alzheimerschen Krankheit zugeordnet, deren pathologisches Erscheinungsbild über die Anhäufung von falsch gefalteten und mutierten Proteinen charakterisiert wird [336, 337]. Eine erhöhte Expression von GRP78 in neuronalen Zellen schützt diese vor der drohenden Neurotoxizität [338, 339] und unterdrückt die Produktion von β -Amyloiden, die den Hauptbestandteil der senilen Plaques bei der Alzheimerschen Erkrankung darstellen [340].

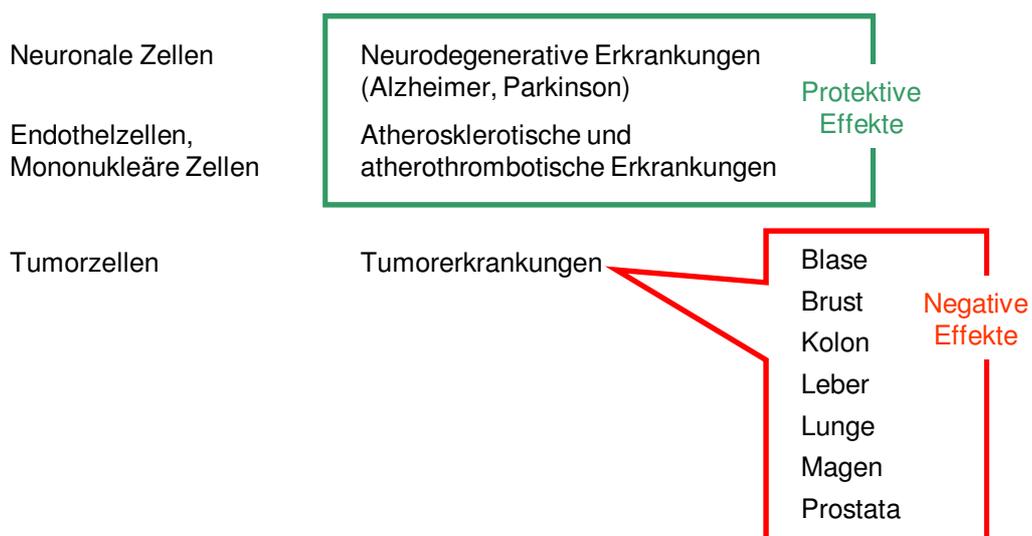


Abbildung 45: Überexpression des GRP78 auf normalen Zellen und auf Tumorzellen. Die patho-physiologisch aktivierte Überexpression von GRP78 kann neben negativen Effekten auch protektive Effekte auf das Krankheitsbild eines Patienten ausüben (nach [293]).

Schützende Funktionen werden ebenso dem extrazellulär lokalisierten GRP78 zugesagt. Es wird auf der Oberfläche nicht maligner mononukleärer Zellen und proliferierenden Endothelzellen exprimiert [180, 181, 341]. Unabhängige Arbeitsgruppen berichteten von positiven Effekten auf die Entwicklung atherothrombotischer und kardiovaskulärer Erkrankungen [180, 342]. In diesem Zusammenhang spielen erhöhte Level an Homocystein

eine Rolle, die zu den unabhängigen Risikofaktoren für Atherosklerose und thrombotische Erkrankungen zählen [343, 344]. Erhöhte Level an GRP78 unterbinden den homocysteininduzierten ER-Stress und schützen so vaskuläre Endothelzellen vor dem Zelltod [345, 346]. Zudem inhibiert GRP78 die Aktivierung von Genen, die für die Biosynthese von Cholesterin und Triglyceriden zuständig sind [187], unterdrückt die Generierung von Thrombin, und sorgt so für die Reduktion des prokoagulierenden Potentials der Zellen [342].

Diese Aspekte limitieren die ungezielte Therapie der GRP78-Expression aufgrund möglicher unerwünschter Nebeneffekte. Die Entdeckung der SAM-6-spezifischen Isoform des GRP78 bietet die Möglichkeit, diese Problematik zu umgehen. Sie wird spezifisch auf Tumorzellen exprimiert, normale Zellen, die den GRP78-Wildtypen exprimieren, würden bei einer Therapie mit dem SAM-6 Antikörper nicht tangiert (Abbildung 46).

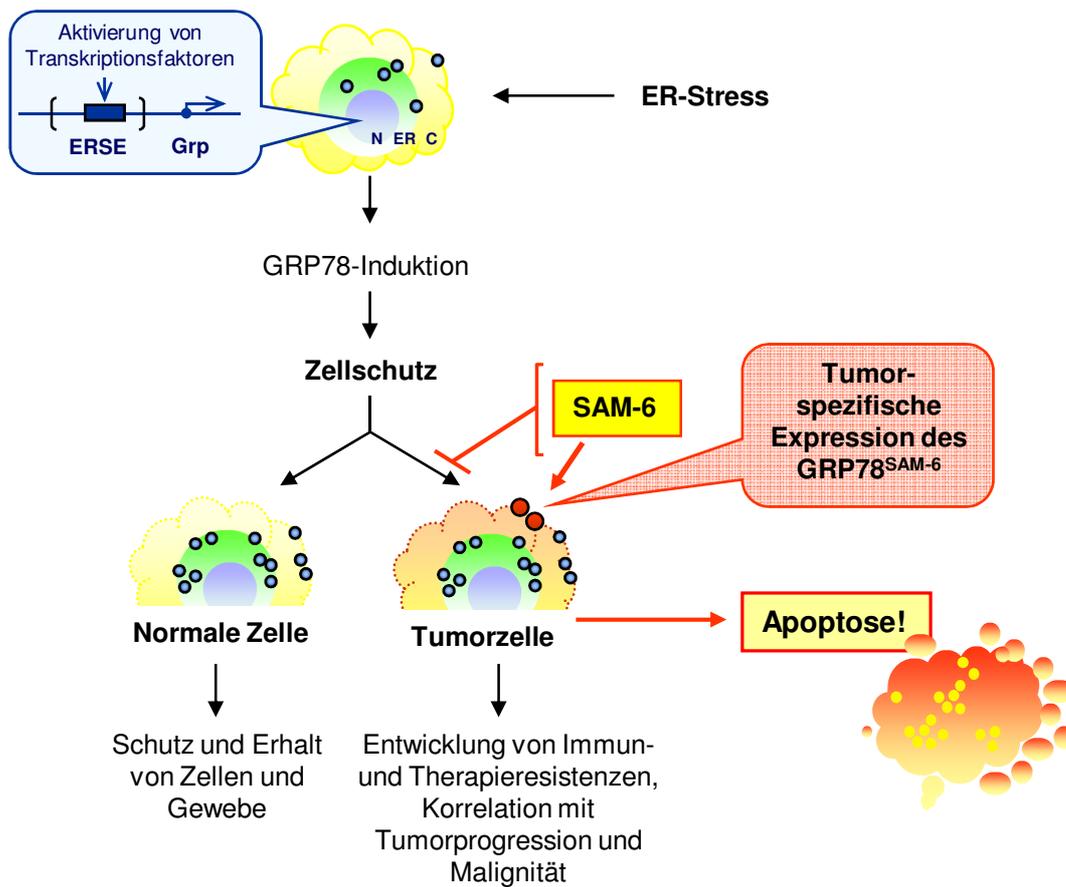


Abbildung 46: Funktionsweise des GRP78^{SAM-6}. Die erhöhte Expression von GRP78 schützt sowohl normale Zellen als auch Tumorzellen vor endogenen und exogenen Stressoren. Während die Bekämpfung der Tumorzellen über GRP78 auch normale Zellen tangieren würde, werden Tumorzellen durch die Expression der tumorspezifischen Isoform GRP78^{SAM-6} gezielt angreifbar. (N- Zellkern, ER - Endoplasmatisches Retikulum, C – Zytoplasma)

4.8 Existenz löslicher GRP78-Varianten

Delpino *et al.* beschrieben eine lösliche Form des GRP78 (sGRP78, *soluble GRP78*), die in Kulturüberständen gestresster Tumorzellen und in geringer Menge auch im Blutkreislauf gesunder Probanden nachgewiesen werden konnte [301]. Über die funktionelle Bedeutung der löslichen Variante ist bisher wenig bekannt. Zirkulierendes GRP78 könnte als eine Art Transport-Vesikel für antigene Peptide dienen, die so dem Immunsystem präsentiert werden [347, 348]. Nach einem ähnlichen Prinzip funktionieren Anti-Tumor-Vaccinationen, die aus stressproteinhaltigen Extrakten gewonnen wurden. Jedoch konnte bei experimentellen Versuchen mit GRP78 keine Immunantwort hervorgerufen werden, wie es z.B. bei GRP94-haltigen Extrakten der Fall war [349]. Andere Arbeitsgruppen versetzten humane Monozyten mit exogenem HSP70 und konnten zeigen, dass HSP70 mit spezifischen Rezeptoren der Monozytenoberfläche reagierte und für die Sekretion pro-inflammatorischer Zytokine (Interleukin-1 β , Interleukin-6 und TNF- α) verantwortlich war [348, 350]. Ein ähnliches Verhalten zeigten Mikrogliazellen, die mit rekombinatem GRP78 inkubiert wurden. Hier induzierte freies GRP78 die Produktion von Interleukin-6 und TNF- α und stimulierte die Phagozytose von Amyloid- β -Peptiden [351]. Demnach könnte freies, zirkulierendes GRP78 eine wichtige Rolle im Rahmen pathophysiologischer Entgleisungen spielen und als Marker zur Diagnose und Verlaufskontrolle verschiedener Erkrankungen von Interesse sein [190]. Doch liegen bisher keine Untersuchungen bezüglich einer gesteigerten Expression von löslichem GRP78 im Blut von Patienten vor.

Wie GRP78 in den extrazellulären Raum gelangt, bleibt bislang umstritten. Zum einen könnte GRP78 aus dem Zellinneren verletzter Zellen stammen und infolge nekrotischer oder apoptotischer Vorgänge freigesetzt werden. Zum anderen könnte freies GRP78 über sekretorische Prozesse an die Zelloberfläche gelangen oder durch die Abspaltung der extrazellulären Domäne (*Ectodomain Shedding*) von transmembranär verankertem GRP78 entstehen [188, 189]. Da eigenen Untersuchungen zufolge eine transmembranäre Fixierung des Proteins wahrscheinlich ist, wurde die Möglichkeit des *Ectodomain Shedding* genauer analysiert. Die proteolytische Freisetzung der extrazellulären Domäne eines an der Zellmembran verankerten Proteins erfolgt je nach Art der Verankerung durch spezifische Proteasen oder Phospholipasen (auch *Sheddasen* und Sekretasen genannt) [151, 352]. Das *Ectodomain Shedding* läuft konstitutiv unter normalen physiologischen Bedingungen ab, wodurch sich basale Level an freiem GRP78 im Kreislauf gesunder Menschen erklären lassen [191]. Unter pathophysiologischen Umständen, die meist mit Entzündung und Apoptose einhergehen, werden endogene Reize freigesetzt, die durch die Aktivierung der

verantwortlichen Enzyme den Vorgang der Abspaltung verstärken. Sie werden auch mit der Entstehung von Tumoren und Metastasen in Verbindung gebracht [353]. Die Abspaltung der Ectodomäne kann ebenso durch nicht physiologische Reagenzien hervorgerufen werden. *In vitro* wird häufig der Phorbol-12-myristat-13-acetat (PMA) verwendet, ein Inhaltsstoff des giftigen Milchsafte der Wolfsmilchgewächse (Euphorbiaceae). PMA induziert bei einer Reihe von transmembranären Proteinen eine Abspaltung, auszugsweise seien hier das Adhäsionsmolekül L-Selektin und der Interleukin-1-Rezeptor Typ II zu nennen [191, 352]. Ahram und Kollegen sammelten bereits im Jahr 2005 erste Hinweise darauf, dass auch membranständiges GRP78 unter dem Einfluß von PMA von der Zelloberfläche abgespalten wird [190]. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde die Abspaltung der beiden membranständigen Antigene GRP78 und GRP78^{SAM-6} unter der Einwirkung verschiedener *Shedding*-Induktoren untersucht. Neben PMA, wurden Wasserstoffperoxid (H₂O₂) und Lipopolysaccharid (LPS) verwendet, die beide als potente *in-vivo*-Induktoren vieler membranständiger Rezeptoren bekannt sind [191-193]. LPS diente dabei zur Imitation einer bakteriellen Infektion, H₂O₂ zur Generierung reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) [194, 195].

Die Generierung von löslichen GRP78-Varianten war grundsätzlich möglich, die verwendeten Induktoren führten aber zu unterschiedlichen Ergebnissen. GRP78^{SAM-6} zeigte unter dem Einfluss von Wasserstoffperoxid die deutlichste Reduktion der Antigendichte. Die Abnahme der Dichte des GRP78-Wildtyps war hingegen nur halb so hoch. Ein weiterer Unterschied war nach Inkubation mit LPS zu beobachten. Während LPS nur initial einen geringen Einfluss auf die Antigendichte des GRP78^{SAM-6} hatte, war die Dichte des GRP78-Wildtyps bereits nach einer 2-stündigen Inkubationszeit deutlich bis auf die Hälfte reduziert. Auffällig ist, dass LPS auf membranständiges GRP78^{SAM-6} kaum einen Einfluss ausübt, wodurch die spezifische Rolle des GRP78^{SAM-6} bei Tumorerkrankungen deutlich wird. Der GRP78-Wildtyp hingegen stellt ein Schutzmolekül gegen eine Reihe verschiedener Stressoren da, weshalb auch bei Infektionen bakterieller Art eine Antwort zu erwarten ist. Die gewählten Reagenzien reduzierten die Oberflächendichte beider Antigene in einem unterschiedlichen Ausmaß. Als Ursache dieser Reduktion wäre neben einer Abspaltung auch ein Einfluss der Reagenzien auf die mRNA-Synthese denkbar. GRP78 ist mit einer Halbwertszeit von 24 Stunden ein relativ stabiles Protein [322]. Ein Einfluss auf die Proteinsynthese wäre nach 24-48 Stunden zu erwarten. Unter Einwirkung von H₂O₂ war bereits nach einer relativ kurzen Inkubationszeit von 2 Stunden eine deutliche Abnahme der Antigendichte zu verzeichnen. In diesem Falle ist bei beiden GRP78-Molekülen ein solcher Einfluss auf die Proteinsynthese auszuschließen. Auch unter der Einwirkung des Phorbol-12-myristat-13-acetats war nach bereits 2 Stunden die maximale Reduktion der SAM-6-spezifischen GRP78-Variante zu erkennen. Hingegen wurde die Antigendichte des

GRP78-Wildtyps erst nach 24 Stunden sichtlich reduziert. Hier könnte demnach ein Mechanismus zugrunde liegen, der die Proteinsynthese von GRP78 negativ reguliert. Als dritte Möglichkeit könnten die zugegebenen Reagenzien die Zellen zur Internalisierung von Proteinen anregen und dadurch die Oberflächendichte der zu untersuchenden Antigene herabsetzen. Wie bereits erläutert können sowohl membranständiges GRP78 als auch die SAM-6-spezifische Variante GRP78^{SAM-6} nach Bindung von Liganden endozytiert werden [133, 190, 354]. Ob sich unter dem Einfluss *Shedding*-induzierender Substanzen die intrazelluläre Konzentration an GRP78 erhöht, wurde bisher noch nicht untersucht.

Zusätzlich zur Bestimmung der Oberflächendichte der beiden Antigene wurde zusätzlich der Anteil ihrer löslichen Varianten in den einzelnen Zellüberständen bestimmt. Dadurch sollte geklärt werden, ob es sich bei der Abnahme der Antigendichte auf der Zelloberfläche tatsächlich um eine durch die eingesetzten Substanzen induzierte Abspaltung der Proteine handelte oder ob die Proteine möglicherweise durch Denaturierung durch die zugegebenen Reagenzien nicht mehr detektiert werden konnten.

Nach Induktion mit PMA wiesen die Zellüberstände eine eindeutig erhöhte Konzentration an freiem GRP78^{SAM-6} auf. Da die Zunahme an intaktem, löslichem GRP78^{SAM-6} mit der Reduktion der Antigendichte auf der Zelloberfläche korrelierte (vgl. FACS-Analyse), kann hier von einer tatsächlichen Induktion des *Shedding* durch PMA ausgegangen werden. Analog den Ergebnissen von Ahram und Kollegen verhielt sich GRP78 gegensätzlich [189]. Im Vergleich zum Kontrollüberstand wurde in den Überständen PMA-behandelter Zellen ein erniedrigter Gehalt an sGRP78 ermittelt, obwohl auch hier eine Reduktion der Antigendichte an der Zelloberfläche zu verzeichnen war. Auch Ahram und Kollegen verglichen die Zellüberstände PMA-behandelter Zellen mit dem Überstand unbehandelter Zellen und berichteten von einer erniedrigten Konzentration an freiem GRP78. Sie machten eine mögliche Wiederaufnahme des freigesetzten GRP78 durch endozytotische Prozesse dafür verantwortlich [189]. Unter dem Einfluss von H₂O₂ zeigte sich ein umgekehrtes Bild. Trotz der eindeutigen Abnahme beider Antigene auf der Zelloberfläche nahm im Vergleich zum Kontrollüberstand der Anteil an sGRP78^{SAM-6} ab, im Gegensatz dazu der Gehalt an sGRP78 leicht zu. Das auf den ersten Blick widersprüchlich erscheinende Resultat ist durchaus erklärbar. Zum einen könnten die Antigene direkt durch die zugegebenen Reagenzien zur Internalisierung angeregt werden. Andererseits ist es durchaus möglich, dass membranständiges GRP78 von der Oberfläche abgespalten wird und als neuer Ligand Rezeptoren ansteuert, die es mit hoher Affinität binden und internalisieren. Solche Interaktionen sind bei etlichen Vertretern der HSP70 Familie bekannt, die mit modifizierten LDL-Partikeln um die Bindungsstelle von *Scavenger*-Rezeptoren auf Makrophagen konkurrieren [355]. Lösliches GRP78^{SAM-6} kann hierbei durchaus unterschiedliche

Eigenschaften besitzen und nach seiner Internalisierung eine zu sGRP78 antagonistische Wirkung hervorrufen.

Insgesamt war zu beobachten, dass sowohl lösliches GRP78^{SAM-6} als auch die lösliche Wildtyp-Variante des GRP78 in geringen Anteilen im Überstand unbehandelter Zellen zu detektieren waren, wobei der Anteil an freiem GRP78 doppelt so hoch lag. Ein Grund für den basalen Level der löslichen Proteine könnte eine Aktivierung der Zellen während der Aufarbeitung gewesen sein. Durch die Kultivierung der Zellen in FCS-freiem Medium, den Mediumwechsel und Wasch- und Zentrifugationsschritte könnten stressinduzierende Reize auf die Zellen ausgeübt worden sein, die die Abspaltung eines geringen Anteils an GRP78 zur Folge hatten. Andererseits wurde mehrmals von freiem GRP78 im Plasma gesunder Probanden berichtet [301]. Basale Levels an freiem GRP78 stammen daher sehr wahrscheinlich aus einer unter physiologischen Bedingungen ständig ablaufenden Abspaltung von membranständigem GRP78.

Die Wirkmechanismen, die dem *Shedding* mittels der eingesetzten Reagenzien zugrunde liegen, sind weitgehend unbekannt und wurden im Rahmen dieser Arbeit nicht analysiert. Welche Signalwege hierbei im Detail eine Rolle spielen und wie sich die Aktivierung der SAM-6-spezifischen Variante des GRP78 vom GRP78-Wildtypen unterscheidet, muss in weiterführenden Arbeiten mit Hilfe spezifischer Inhibitoren untersucht werden. Gleichzeitig ist die physiologische Funktion beider löslicher GRP78-Formen nicht bekannt. Die Abspaltung des extrazellulären Teils eines transmembranären Proteins führt zur Bildung löslicher und biologisch aktiver Formen von Membranproteinen. Über diesen Mechanismus kann die Zelle rasch auf zelluläre Einflüsse reagieren und lösliche regulatorische Faktoren bereitstellen. Beispielsweise können Zytokine, Wachstumsfaktoren oder Adhäsionsmoleküle bei Bedarf schnell von ihrer membranständigen in eine lösliche Form überführt werden [191, 352]. Welche strukturellen Voraussetzungen für die Abspaltung der Ectodomäne nötig sind, ist bisweilen nicht vollständig geklärt.

5 Kreuzreaktivität des SAM-6 Antikörpers mit oxLDL

Die tumorspezifische Variante des GRP78 existiert in zwei Formen, die beide unterschiedliche Funktionen im Körper ausüben können. Membranständiges GRP78^{SAM-6} bindet den tumorreaktiven SAM-6 Antikörper und internalisiert mit Hilfe des Antikörpers oxidativ modifiziertes LDL (oxLDL). Toxisches oxLDL wird somit aus dem Kreislauf des Körpers entfernt und gleichzeitig Tumorzellen über spezifische Lipotoxizität eliminiert.

Möglicherweise spielt bei diesem Vorgang auch die lösliche Form des GRP78^{SAM-6} eine Rolle, über dessen funktionelle Bedeutung bisher nichts bekannt ist. Zirkulierendes GRP78^{SAM-6} könnte freies LDL abfangen, um anschließend über *Scavenger*-Rezeptoren von phagozytierenden Zellen internalisiert und entfernt zu werden. Mitglieder der HSP70 Familie (darunter auch GRP78) sind dafür bekannt, mit *Scavenger*-Rezeptoren zu interagieren, die einerseits für die Aufnahme von oxLDL und andererseits für eine rasche Internalisierung von HSP70-Antigenen verantwortlich sind [355].

Schlüsselpunkt der apoptotischen Wirkung des SAM-6 Antikörpers ist dennoch die tumorspezifische Akkumulation schädlicher Mengen an Cholesterol und Triglyceridestern, die unter dem Einfluss des SAM-6 Antikörpers in Form von LDL-Partikeln in die Tumorzelle gelangen [143, 198]. Nach welchem Mechanismus hierbei die Lipoproteine in die Zelle gelangen und wie genau der Komplex aus oxLDL, Antikörper und GRP78^{SAM-6} die Lipotoxizität in Tumorzellen auslöst, konnte in weiten Teilen geklärt werden. Der SAM-6 Antikörper bindet zum einen die oxidierten LDL-Partikel und zum anderen membranständiges GRP78^{SAM-6} der Tumorzelle. So liegt es nahe, dass die Lipoproteine an den pentameren Antikörper binden und über diesen indirekt vermehrt in die Zelle gelangen. Der oxLDL-beladene Antikörper bindet an membranständiges GRP78^{SAM-6}, wird über rezeptorvermittelte Endozytose internalisiert und dadurch die Tumorzelle letztendlich mit einem Vielfachen an oxLDL übersättigt. Der Mechanismus der rezeptorvermittelten Endozytose konnte in eigenen Immunfluoreszenzstudien bestätigt werden [133, 198]. Ähnliche Ergebnisse berichtete eine unabhängige Arbeitsgruppe, die von der Internalisierung des GRP78 berichtete, nachdem peptidische Liganden an das Protein gekoppelt worden waren [354].

Letztendlich bindet der Antikörper SAM-6 auf beiden Molekülen bestimmte Epitope. Diese spezifische Kreuzreaktivität könnte ein Grund für die unkontrollierten Aufnahme von oxLDL und den anschließenden lipotoxischen Zelltod darstellen.

Bei der Bindung des LDL/oxLDL scheint das Apolipoprotein B100 von Bedeutung zu sein. ApoB 100 ist ein Hauptbestandteil von LDL und in geringerem Maße auch in VLDL, nicht jedoch in HDL enthalten. Western Blot-Analysen auf den erwähnten Lipoproteinen bestätigten eine

eindeutige Reaktion des SAM-6 Antikörpers mit den ApoB 100-haltigen Lipoproteinen, wobei die detektierten Proteine mit einem Molekulargewicht von rund 80 kD dem ApoB 100 zugeordnet werden konnten. Sehr wahrscheinlich fungiert ApoB 100 als Brückenmolekül zwischen den Lipoproteinen und dem SAM-6 Antikörper. Hierbei bleiben noch Fragen offen, die im Rahmen dieser Arbeit nicht weiter verfolgt wurden. Gegenstand weiterer Untersuchungen bleibt, welches Strukturmerkmal des ApoB 100 für die Bindung an den SAM-6 Antikörper letztendlich verantwortlich ist und welche Rolle oxidative Veränderungen dieses Strukturmerkmals spielen, die letztendlich für ein erhöhtes apoptotisches Potential verantwortlich sind. Modifikationen des ApoB-Epitopes treten vermehrt im Rahmen pathologischer Entgleisungen auf. Der Grad der Modifikation bestimmt das apoptotische Potential und die Affinität von LDL/oxLDL zu Rezeptoren und Proteoglykanen [356, 357]. Auch die Lipotoxizität und Affinität des SAM-6 Antikörpers zu den untersuchten Lipoproteinen scheint im direkten Zusammenhang mit dem Grad der Modifikation des ApoB-Epitopes zu stehen. Der Antikörper SAM-6 bindet die ApoB-haltigen Lipoproteine VLDL und LDL und in verstärktem Maße oxidierte Formen des LDLs, nicht jedoch das ApoB 100-freie Lipoprotein HDL. Das Ausmaß der Bindung korrelierte mit dem Ausmaß der apoptotischen Aktivität des SAM-6 Antikörpers, die bei einer erhöhten Verfügbarkeit an oxLDL Maximalwerte erreichte [198].

6 Der apoptotische SAM-6-Signalweg

Die SAM-6-induzierte Apoptose stellt das Ergebnis eines gestörten Lipidhaushalts der Zelle dar, das durch die Bindung und Internalisierung des tumorspezifischen Antikörpers SAM-6 und eines Übermaßes an oxLDL zustande kommt. Dabei ist die GRP78-vermittelte Internalisierung des SAM-6 Antikörpers ausschlaggebend für die tödliche Anhäufung der Lipide [133, 198]. Möglicherweise induziert die unphysiologisch hohe intrazelluläre Konzentration an oxLDL die tödliche Caspasenkaskade, die nach der initialen Freisetzung von Cytochrom C aus den Mitochondrien über die Initiatorcaspasen 8 und 9 verläuft und letztendlich durch die Aktivierung der terminalen Caspasen 3 und 6 den apoptotischen Zelltod einleitet. Die SAM-6-induzierte Apoptose verläuft über einen spezifischen Signalweg, der Gemeinsamkeiten mit dem intrinsischen Signalweg aufweist, jedoch wie beim extrinsischen Signalweg über externe pro-apoptotische Liganden angeregt wird. Bei der bisher bekannten extrinsischen Signaltransduktion handelt es sich um eine rezeptorvermittelte Initiation der Apoptose. Bei der reinen intrinsischen Signaltransduktion setzt mitochondriales Cytochrom C die Caspasenkaskade in Gang, das zuvor durch unspezifische Noxen (z.B. UV-Strahlung, Chemotherapeutika) aus den Mitochondrien freigesetzt wurde [173].

6.1 Pro-apoptotische Funktion des oxLDL

OxLDL wird *in vitro* ein direkter toxischer Einfluss auf verschiedene Zellarten zugesagt, der zur Apoptose der Zellen führen kann [358-361]. Während der Oxidation von LDL entstehen bioreaktive Moleküle wie z.B. Oxysterole, Lysophospholipide und Fettsäureperoxide, die für die Zytotoxizität von oxidiertem LDL verantwortlich gemacht werden [356, 362]. Durch biochemische und chemische Prozesse werden der Lipid- und/oder der Protein-Anteil (ApoB) des LDL unterschiedlich stark oxidativ modifiziert, so dass ein heterogenes Gemisch aus toxischen Lipiden entsteht. Der Grad der Toxizität als auch die Affinität zu den jeweiligen Rezeptoren ist dabei abhängig vom Oxidations- bzw. Modifikationsgrad des Lipoproteins [356].

OxLDL wird nach seiner Internalisierung über endosomale/lysosomale Kompartimente abgebaut. Die toxischen Lipide werden freigesetzt und können einen direkten toxischen Effekt auf die Zelle ausüben. Zudem können sie durch Derivatisierung oder Lipidperoxidation zu funktionellen Veränderungen von Zellproteinen (z.B. Tyrosinkinase Rezeptoren, Enzyme) und zellulären Lipiden führen, die Bildung von ROS initiieren oder die Genexpression pro- und anti-apoptotischer Proteine beeinflussen (z.B. CD95, BAX) [356]. Gleichzeitig beeinflusst oxLDL

über vielfältige Mechanismen die Regulation zytotoxischer Signalwege. OxLDL ist in der Lage, durch die direkte Aktivierung von zellulären Proteasen (z.B. Effektorcaspase 3) Apoptose zu induzieren [363, 364] oder aber über indirekte Mechanismen zytotoxische Signalwege auszulösen. Hierbei spielt der Calciumhaushalt der Zelle eine entscheidende Rolle. Bei der oxLDL-induzierten Apoptose kommt es zum Einstrom extrazellulären Calciums in die Zelle und zur Aktivierung calciumabhängiger Endonukleasen, die schließlich den Abbau/Zerfall der Zelle einleiten [359, 362]. Durch die erhöhte Verfügbarkeit an intrazellulärem Calcium kommt es gleichzeitig zur Aktivierung zytosolischer Phospholipase A₂ (cPLA₂), die wiederum bei TNF-induzierter Apoptose beteiligt ist [365]. Die cPLA₂ ist gleichzeitig für die Deacylierung der Fettsäuren von Phospholipiden und somit für die Freisetzung freier Fettsäuren zuständig. Aktiviert oxLDL die cPLA₂, kommt es zu einer erhöhten Bereitstellung freier Fettsäuren, die wiederum zu Cholesterolestern umgesetzt werden. Aufgrund der überhöhten Produktion werden diese als intrazelluläre Lipidtröpfchen sichtbar [366]. Des Weiteren beeinflusst oxLDL Einfluss die Aktivität verschiedener proteolytischer Systeme [367, 368]. Im Gegensatz zu nativen Lipoproteinen wird oxLDL nach der Internalisierung nur langsam hydrolysiert [369] und der Abbau zusätzlich behindert, indem einströmende oxidierte Lipide die lysosomalen Enzyme inhibieren [370]. Es kommt zur Akkumulation von oxLDL in den Lysosomen, zur Schädigung und Ruptur der Lysosomen und schließlich zur Autolyse der Zelle (Endopepsis) [371].

Der Antikörper SAM-6 bindet mit hoher Affinität an oxLDL und membranständiges GRP78. Er erfüllt eine wichtige Trägerfunktion, um über den Endozytosemechanismus vermehrt oxLDL in die Zelle zu transportieren. Im Anschluss ist eine direkte Apoptose-Induktion durch toxisches oxLDL sehr wahrscheinlich. Ob der Antikörper SAM-6 lediglich als Träger fungiert oder gleichzeitig direkt in Apoptosemechanismen involviert ist, bleibt Gegenstand weiterer Untersuchungen.

6.2 Interaktion von GRP78 mit Lipoproteinen

Aus einer anderen Perspektive betrachtet könnte die übermäßige Aufnahme des oxLDL nicht über den SAM-6 Antikörper selbst, sondern über die Bindung an membranständiges GRP78 erfolgen. GRP78 wurde an der Oberfläche adipöser Lipideinlagerungen [186] und als Bestandteil atherosklerotischer Läsionen und Schaumzellen entdeckt [180]. GRP78 ist durch die Interaktion mit intrazellulärem Apolipoprotein B100 (ApoB 100) an der Generierung von LDL/VLDL beteiligt. Während der gesamten Biogenese assoziiert intrazelluläres GRP78 als Teil eines Chaperon-Komplexes mit ApoB und sorgt für seine korrekte Faltung und Modifizierung

[288]. Hierbei korreliert die Expression an GRP78 mit der Menge an intrazellulär verfügbaren Lipiden. Modifikationen können die ursprünglichen Eigenschaften eines Moleküls modulieren. Daher ist die direkte Interaktion von membranständigem, modifiziertem GRP78 mit ApoB-haltigen Lipoproteinen durchaus denkbar, was unter dem Einfluss des SAM-6 Antikörpers zu einer unkontrollierten Aufnahme von Lipiden führt.

6.3 Inaktivierung der anti-apoptischen Funktion von GRP78

Hitzeschockproteine stellen Schutzmoleküle der Zelle dar, die ihrerseits pro-apoptische Signaltransduktionswege hemmen und so bereits angelaufene Apoptosemechanismen unterbinden können [298-300, 372, 373]. Beispielsweise unterbindet GRP78 durch Komplexbildung mit Caspase 7 und Caspase 12 die Cytochrom C-vermittelte Aktivierung der Caspasenkaskade [299]. Der Cytochrom C-abhängige Apoptoseweg wird somit unterbrochen und negativ reguliert. Deshalb ist es durchaus möglich, dass durch die Bindung des SAM-6 Antikörpers an modifiziertes GRP78 und die anschließende Internalisierung die schützende Funktion des Chaperons aufgehoben wird, und der Apoptosevorgang wieder ungehindert ablaufen kann.

Durch den SAM-6 Antikörper könnten ebenso weitere Signalkaskaden angestoßen werden. GRP78 inhibiert SREBP (*Sterol Regulatory Element Binding Protein*), ER-residente Transkriptionsfaktoren, die Gene aktivieren, die für die Biosynthese von Cholesterol und Triglyceriden zuständig sind. Eine erhöhte Expression von SREBP wurde mit der intrazellulären Einlagerung von Cholesterol und Lipiden assoziiert [187]. Möglicherweise aktiviert der SAM-6 Antikörper die Bereitstellung von SREBP und induziert so die Einlagerung der Lipide. Weiterhin ist es denkbar, dass der Antikörper SAM-6 direkt oder indirekt die ATP-Domäne von GRP78 blockiert und dem Protein damit seine anti-apoptische Eigenschaft nimmt [374]. Abbildung 47 zeigt den SAM-6-induzierten Signalweg und GRP78-abhängige Signalwege schematisch gegenübergestellt.

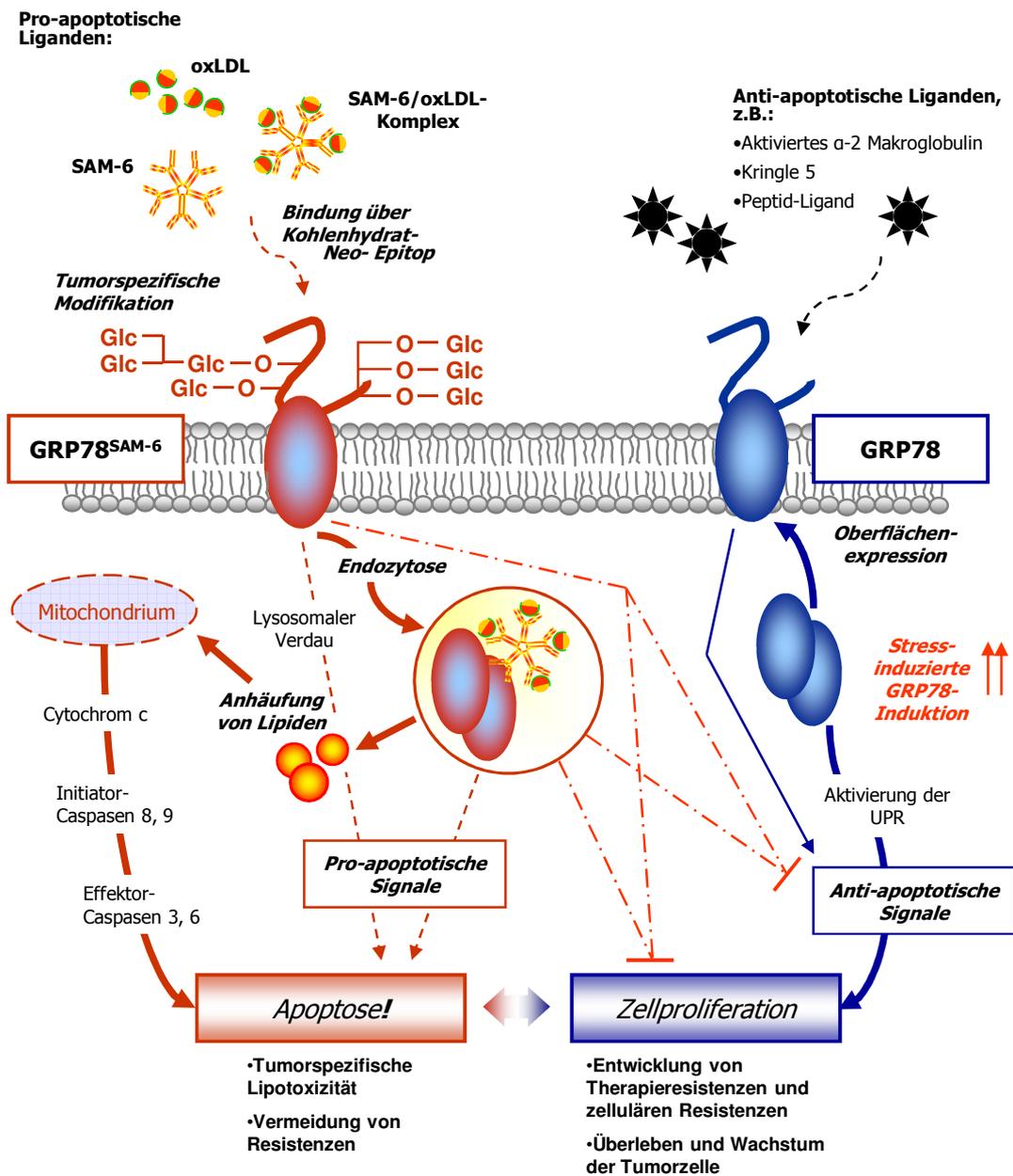


Abbildung 47: Zusammenfassende Gegenüberstellung SAM-6-induzierter und GRP78-abhängiger Signalwege.

Neben dem eleganten Weg der apoptotischen Eliminierung von Tumorzellen, werden gleichzeitig als eine Art Nebeneffekt der tödlichen Lipidanhäufung modifizierte und damit schädliche LDL-Partikel aus dem Kreislauf des Organismus entfernt. Wie und ob man sich diesen Effekt des SAM-6 Antikörpers für die Therapien sog. Wohlstandskrankheiten, die mit Hyperlipid- und Hypercholesterinämien einhergehen, zu Nutze machen kann, werden laufende Untersuchungen zeigen.

7 Resumé

Die Entstehung maligner Zellen durch irreversible genetische Veränderungen ist ein allgegenwärtiger Prozess im menschlichen Organismus. Zellen sichern sich ihr Überleben durch die Expression von Stress- und Schutzmolekülen. Transformierte Zellen nutzen denselben Mechanismus und gewährleisten ihr Wachstum und Überleben gerade durch die Modifikation dieser Stress- und Schutzmoleküle. Doch der Mensch besitzt von Natur aus ein effektives Abwehrsystem. Obwohl die maligne Veränderung von Schutzmolekülen zur Überlebensstrategie der Tumorzelle gehört, wird sie gerade durch die Expression solcher modifizierter Antigene zum Angriffsziel der körpereigenen Immunabwehr (*Immune Surveillance*). Die humorale Immunität des Menschen basiert dabei vor allem auf der effektiven Wirkungsweise natürlicher IgM-Antikörper. Nur in Ausnahmefällen vermag ein Tumor diesem Abwehrsystem zu entfliehen und sich daraus ein manifester Tumor zu entwickeln.

Im Rahmen dieser Arbeit konnte ein weiteres Mal belegt werden, dass natürliche IgM-Antikörper in der Lage sind, menschliche Tumorzellen zu bekämpfen. Sie stammen direkt aus dem Menschen und sind bestens dafür geeignet, neue immunologische Strategien gegen tumorspezifische Strukturen zu definieren. Sie erkennen Tumorzellen spezifisch und beseitigen sie nach Induktion verschiedener Apoptosemechanismen effektiv, ohne dabei inflammatorische Prozesse auszulösen. Im Speziellen richten sie sich dabei gegen Strukturen, die die Zelle zum Überleben braucht. Sie identifizieren transformierte Zellen über tumorspezifisch modifizierte aber dennoch konservierte Carbohydrat-Epitope, die ursprünglich zum Schutz der Tumorzelle dienen. Ihre Angriffspunkte sind Wachstumsfaktoren (z.B. CD55, CFR-1), Adhäsionsmoleküle (z.B. MUC1) oder Schutzmoleküle (z.B. GRP78), die in modifizierter Form zum Ziel der tumorreaktiven IgM-Antikörper werden. Sie stellen einen wichtigen Bestandteil der angeborenen Tumorabwehr des Menschen dar, in der die frühzeitige Erkennung von maligne veränderten Carbohydrat-Strukturen auf Glykoproteinen und Glykosphingolipiden eine wichtige Rolle spielt. Carbohydrat-Antigene, die einen Großteil der Zelloberflächen-Antigene ausmachen, eignen sich hervorragend für eine Immuntherapie und gewinnen auch in der Onkologie als immunogene Epitope zunehmend an Bedeutung. Die tumorspezifische Expression solcher Oberflächenmoleküle ermöglicht eine gezielte, antikörperbasierte Therapie. Möglicherweise liegen der antikörpervermittelten Zytotoxizität ähnliche Mechanismen zugrunde, wie sie bei der Erkennung der bakteriellen Antigene bekannt sind.

Der humane monoklonale IgM-Antikörper SAM-6 fungiert als Teil der tumorspezifischen Immunität. Er besitzt das Potential, die schützende Funktion des Hitzeschockproteins GRP78 zu inaktivieren. Dabei bindet er an die Carbohydrat-Epitope einer membranständigen und

tumorspezifischen Variante des Glykoproteins GRP78. Nach seiner Bindung induziert der Antikörper SAM-6 die unkontrollierte Anhäufung intrazellulärer Lipide, die letztendlich zur Apoptose führt. Die auf der Zellmembran lokalisierte Variante des GRP78 wird auf vielfältigen Tumorgeweben stabil exprimiert und infolge seines tumorassoziierten Auftretens wird es zur optimalen Zielstruktur der humoralen körpereigenen Immunantwort gegen Tumore.

V. Zusammenfassung

1 Zusammenfassung

Erste tumorassoziierte Veränderungen finden im Glykosilierungsmuster von Glykoproteinen und Glykolipiden statt. Die dabei entstehenden tumorassoziierten Carbohydrat-Antigene sind prominente Zielstrukturen der natürlichen Tumormunität (*Immune Surveillance*) und gewinnen in der Onkologie als immunogene Epitope zunehmend an Bedeutung.

Der humane monoklonale IgM-Antikörper SAM-6 ist Teil der tumorspezifischen Immunität. Er wurde mit Hilfe der konventionellen Hybridomatechnologie direkt aus einem an Magenkarzinom erkrankten Menschen isoliert. Neben der Erforschung seines außergewöhnlichen Apoptosemechanismus konnte innerhalb dieser Arbeit eine Zielstruktur des Antikörpers identifiziert und charakterisiert werden.

Der humane monoklonale IgM-Antikörper SAM-6 bindet an eine neue Isoform des Hitzeschockproteins GRP78 (GRP78^{SAM-6}). Das Antigen wurde über mehrstufige chromatographische Verfahren aus Tumorzellmembranextrakten aufgereinigt und nach tryptischen Verdau über die Methode des Peptidmassen-Fingerprinting eindeutig als humanes GRP78 identifiziert. Die auf der Zellmembran lokalisierte Variante des GRP78 besitzt ein Molekulargewicht von 82 kD und wird auf vielfältigen Tumorgeweben stabil exprimiert. GRP78^{SAM-6} liegt parallel zur 78 kD-Wildtyp-Variante co-exprimiert vor und konnte im Gegensatz zur Wildtyp-Variante nicht auf gesundem Gewebe nachgewiesen werden. Bei der SAM-6-spezifischen Variante des GRP78 handelt es sich um eine posttranslational modifizierte Form des GRP78, die spezifisch auf der Zellmembran lokalisiert ist, nicht jedoch intrazellulär zu finden ist. Sie unterscheidet sich durch zusätzliche Glykosilierungen vom GRP78-Wildtypen, wobei O-glykosidisch verknüpfte Glykane für die Bindung und die Reaktion mit dem SAM-6 Antikörper essentiell sind. Der SAM-6-Rezeptor stellt eine tumorspezifische Isoform des Hitzeschockproteins GRP78 dar, deren O-glykosilierte Carbohydrat-Regionen als Epitop fungieren.

Durch die Bindung an GRP78^{SAM-6} hemmt der Antikörper SAM-6 *in vitro* als auch *in vivo* konzentrationsabhängig das Wachstum von Magen- und Pankreaskarzinomzellen und induziert eine neue Art des apoptotischen Zelltodes, die sog. Lipoptose. Es handelt sich um einen durch den Antikörper vermittelten direkten Effekt, der sich ausschließlich auf malignes Gewebe beschränkt. Schlüsselpunkt der apoptotischen Wirkung ist die Akkumulation zytotoxischer Mengen an Cholesterol und Triglyceridestern, die nach Bindung an den Antikörper in Form von Lipoprotein-Partikeln in die Tumorzelle gelangen. Der pentamere IgM-Antikörper bindet neben membranständigem GRP78^{SAM-6} der Tumorzelle, die ApoB 100-haltigen Lipoproteine VLDL und LDL. Insbesondere oxidativ modifizierte Formen des LDL (oxLDL) zeigten dabei die höchste

Bindungsaffinität zum SAM-6 Antikörper. In deren Anwesenheit war ein maximaler lipotoxischer Effekt zu beobachten.

Im Rahmen dieser Arbeit ist es gelungen, weite Teile des Lipoptose-Mechanismus aufzuklären. Eigenen Immunfluoreszenzstudien zufolge wird der SAM-6 Antikörper über rezeptorvermittelte Endozytose internalisiert. Die GRP78-vermittelte Internalisierung von oxLDL-beladenem Antikörper scheint daher plausibel und für die tödliche Anhäufung der Lipide verantwortlich zu sein. Die SAM-6-induzierte Apoptose verläuft anschließend über einen spezifischen Signalweg, der Gemeinsamkeiten mit dem intrinsischen Signalweg aufweist, jedoch wie beim extrinsischen Signalweg über externe pro-apoptische Liganden angeregt wird. Infolge der unphysiologisch hohen intrazellulären Konzentration an oxLDL kommt es zur Induktion einer Caspasenkaskade, die nach der initialen Freisetzung von Cytochrom C aus den Mitochondrien über die Initiatorcaspasen 8 und 9 verläuft und letztendlich durch die Aktivierung der terminalen Caspasen 3 und 6 den apoptotischen Zelltod einleitet.

Die Entstehung maligner Zellen durch irreversible genetische Veränderungen ist ein allgegenwärtiger Prozess im menschlichen Organismus. Meist werden Stress- und Schutzmoleküle modifiziert, um das Überleben einer Tumorzelle in deren metabolischen Umfeld zu gewährleisten. Bei dem identifizierten Antigen GRP78 handelt es sich um ein sog. Chaperon, das normalerweise zelluläre Stressoren reduziert und damit das Überleben der (Tumor-) Zelle sichert. Maligne Zellen sind permanent zellulärem Stress ausgeliefert, sei es infolge verminderter Vaskularisation oder aufgrund von Angriffen immunologischer und/oder medikamentöser Art. Die natürliche Induktion der HSP-Expression ist daher nicht verwunderlich und in vielen Fällen mit Resistenzentwicklungen und schlechten Prognosen verbunden.

Die Entdeckung von extrazellulär exprimiertem GRP78 auf Tumorzellen bietet die Möglichkeit neuer Therapieansätze in der Onkologie. Die SAM-6-spezifische Variante des GRP78 bietet insbesondere die Möglichkeit eines gezielten Angriffs auf die Tumorzelle, ohne gesunde Zellen zu tangieren. Sie wird auf Tumorgeweben verschiedenster Ätiologie stabil exprimiert und infolge ihres tumorspezifischen Auftretens zur optimalen Zielstruktur der natürlichen körpereigenen Immunantwort gegen Tumore. Der natürliche IgM-Antikörper ist Teil der natürlichen Immunität. Diese verfügt über ein breites Repertoire an Rezeptoren und garantiert die permanente Überwachung und Reaktion gegen modifizierte körpereigene Zellen. Sie ist dafür verantwortlich, dass Tumore sich nur in Ausnahmefällen manifestieren.

2 Summary

Tumor-associated modifications occur first in the glycosylation pattern of glycoproteins and glycolipids. These *tumor-associated carbohydrate antigens* are prominent targets of the natural tumor immunity (*immune surveillance*) and as immunogen epitopes they become more important for oncology therapies.

The human monoclonal IgM antibody SAM-6 is part of this tumor specific immunity. It was isolated from a gastric cancer patient by using the conventional human hybridoma technology. Beside the investigation of its unique apoptosis mechanism, further goal of this study was the identification and characterization of the SAM-6 target.

The human monoclonal IgM antibody SAM-6 binds to a new isoform of the GRP78 heat-shock protein (GRP78^{SAM-6}). The SAM-6 antigen was purified from membrane extracts of stomach carcinoma cells using size exclusion and ion exchange chromatography. After tryptic digestion and peptide mass mapping it was definitely identified as human GRP78. The membrane bound variant of GRP78 has a molecular weight of 82 kD and is specifically over expressed in a wide range of cancer types. GRP78^{SAM-6} is co-expressed with wild-type GRP78 and is in contrast to its wild-type variant absent from normal tissues. The SAM-6 specific variant of GRP78 is a post-transcriptionally modified variant of GRP78, which is specifically expressed on the cell surface, but not found intracellularly. In contrast to the wild-type, GRP78^{SAM-6} is additionally glycosylated, whereas O-linked carbohydrates are essential for binding and reaction with the SAM-6 antibody. The SAM-6 receptor is a tumor specific isoform of the heat-shock protein GRP78, its epitopes are O-linked carbohydrate-moieties.

After binding to GRP^{SAM-6}, the antibody SAM-6 inhibits the growth of stomach and pancreas carcinoma cells *in vitro* and *in vivo* and induces a new kind of apoptotic cell death, the so-called lipoptosis. This direct and antibody induced effect is limited exclusively to malignant tissues. The crucial factor of the apoptotic effect is the accumulation of cytotoxic amounts of cholesterol and triglyceride esters, which get into the tumor cells in form of lipoprotein particles. The pentameric IgM antibody binds to GRP^{SAM-6} located on the tumor cell surface and to apoB 100, which is constituent of the lipoproteins VLDL and LDL. In particular, oxidatively modified LDL particles (oxLDL) showed the highest binding affinity to the SAM-6 antibody. In their presence the highest lipotoxic effect was observed.

Within this study, important parts of this tumor specific lipoptosis mechanism could be explored. Own immunofluorescence studies revealed that the SAM-6 antibody is internalized via receptor mediated endocytosis. GRP78 mediated internalization of oxLDL-loaded antibody might be feasible and responsible for the deadly accumulation of lipids. The SAM-6 antibody induces a

specific apoptotic pathway, which has similarities to the intrinsic pathway, but is activated by external pro-apoptotic ligands as it is known from the extrinsic pathway. Shortly after internalization of the antibody-LDL complex the unphysiologically high concentration of intracellular lipids initiates the release of mitochondrial cytochrome c followed by the activation of a cascade of caspases, such as initiator caspases 8 and 9 and finally the terminal caspases 3 and 6 leading to cell death.

The appearance of malignant cells due to irreversible genetic changes is an omnipresent process in human organisms. Stress and protection molecules are modified to enable tumor cells to survive in their metabolic environment. The identified antigen GRP78 is a so-called chaperone molecule, which normally reduces cellular stressors to maintain (tumor-) cell viability. Malignant cells are permanently exposed to cellular stress, induced by poor vascularization or immunological and/or medical treatment. The natural induction of HSP expression is therefore not surprising and often implicated with drug resistance and bad prognosis.

The discovery of extracellularly located GRP78 on tumor cells offers the opportunity of new oncological therapies. Especially the SAM-6 specific variant of GRP78 promises a targeted therapy against tumor cells, without hitting healthy cells. It is stably expressed on a variety of tumor tissues and in consequence of its tumor specific expression an ideal target of human innate immune responses against tumors. The natural IgM antibody SAM-6 is part of this natural immunity. It uses a broad repertoire of receptors and guarantees a permanent control and reaction against modified self-structures. Innate immunity is the reason that tumors only occur in exceptional cases.

VI. Abkürzungsverzeichnis

Es werden folgende Abkürzungen verwendet:

A	Absorption [nm]
ABTS	Diammonium-2,2'-azinobis-(3-ethylbenzthiazolin-6-sulfonsäure)
ADCC	<i>Antibody-Dependent Cell Mediated Cytotoxicity</i>
ADCP	<i>Antibody-Dependent Cell Mediated Phagocytosis</i>
ADP	Adenosindiphosphat
AFP	Alfa-1-Fetoprotein
ApoB	Apolipoprotein B
AK, mAK	Antikörper, monoklonaler Antikörper
ATP	Adenosintriphosphat
BCA	Bicinchoninsäure
BiP	<i>Immunglobulin Binding Protein</i>
BLAST	<i>Basic Local Alignment Search Tool</i>
Bp	Basenpaare
BSA	<i>Bovine Serum Albumin</i> (Rinderserumalbumin)
CA	<i>Cancer Antigen</i>
CD	<i>Cluster of Differentiation</i> (Differenzierungsantigen)
CDC	<i>Complement-Dependent Cytotoxicity</i>
cDNA	komplementäre DNA
CDR	<i>Complementarity Determining Regions</i>
CEA	Carcinoembryonales Antigen
CFR	<i>Cysteinerich Fibroblast Growth Factor-Receptor</i>
CHAPS	2-[(3-Cholamidopropyl)-dimethylammonio]-1-propansulfonat
CLL	Chronische Lymphatische Leukämie
CLR	<i>C-Type Lectin Receptor</i>
CO ₂	Kohlendioxid
cPLA ₂	zytosolische Phospholipase A ₂
DAB	Diaminobenzidin
DAF	<i>Decay-Accelerating Factor</i>
DAPI	4',6-Diamidino-2-phenylindol
DEPC-Wasser	Wasser versetzt mit Diethylpyrocarbonat, RNAsefrei
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTPs	Deoxynukleosidtriphosphate
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGF	<i>Epidermal Growth Factor</i>
ELISA	<i>Enzyme Linked Immunosorbent Assay</i> (enzymgekoppelter Immunoabsorptionstest)
EMBL	<i>European Molecular Biology Laboratory</i>
ER	Endoplasmatisches Retikulum
ErbB2	HER2/neu
ERSE	<i>Endoplasmic Reticulum Stress Response Element</i>
ExpPASy	<i>Expert Protein Analysis System</i>
FACS	<i>Fluorescence Activated Cell Sorting/ Scanning</i> (Durchflusszytometrie)

FcRn	neonataler Fc-Rezeptor
FCS	<i>Fetal Calf Serum</i> (Fötales Kälberserum)
FGFR	<i>Fibroblast Growth Factor Receptor</i>
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FPLC	<i>Fast Protein Liquid Chromatography</i>
FSC	<i>Forward Scatter</i> (Vorwärtsstreuung)
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase
GP	Glykoprotein
GPI	Glycosylphosphatidylinositol
GRP	<i>Glucose Regulated Protein</i>
h	Stunde
HAMA	<i>Human Anti Mouse Antibodies</i> (humane Anti-Maus-Antikörper)
HAT	Hypoxanthin-Aminopterin-Thymidin
HCC	Hepatozelluläres Karzinom
HDL	<i>High Density Lipoprotein</i>
HE	Hämatoxilin-Eosin
HEPES	4-(2-Hydroxyethyl)-piperazin-1-ethansulfonsäure
HER2/neu	<i>Human Epidermal Growth Factor Receptor 2</i> , ErbB2
HLA-DR	Humanes Leukozytenantigen DR (Klasse II Isotyp)
HRP	<i>Horseradish Peroxidase</i>
HSP	<i>Heat Shock Protein</i> (Hitzeschockprotein)
HSTCL	hepatosplenaes T-Zell-Lymphom
IEC	<i>Ion Exchange Chromatography</i> (Ionenaustauschchromatographie)
IEF	isoelektrische Fokussierung
IEP	Isoelektrischer Punkt
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
K5	Angiogenese-Inhibitor Kringel 5
kD	Kilodalton
LDL	<i>Low Density Lipoprotein</i>
LPS	Lipopolysaccharid (<i>E. coli</i>)
MALDI	<i>Matrix Assisted Laser Desorption Ionization</i> (matrix-unterstütztes Laserdesorptionsverfahren)
MS	Massenspektrometrie
M	Molare Masse
m/z	Verhältnis der molekularen Masse zur Ladung
mA	Milliampere
MHC	<i>Major Histocompatibility Complex</i>
Millipore®-Wasser	Wasser aufgereinigt mit der Wasseraufbereitungsanlage Milli-Q® - <i>Reagent Grade Water System</i>
M-MLV	Moloney Maus Leukämie Virus
mRNA	<i>messenger RNA</i>
MTT	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid
m/v	Gewichtsprozent
NADH	Nicotinamidadenindinukleotid
NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i>
NK	Negativkontrolle
NK-Zelle	Natürliche Killerzelle

NOD	<i>Nucleotide Binding and Oligmerization Domain</i>
NLR	<i>Nucleotide Binding and Oligmerization Domain-like Receptor</i>
NSCLC	nicht-kleinzelliges Lungenkarzinom
Oligo-dT15 Primer	Oligodeoxythymidylsäure-Primer
oxLDL	Oxidativ modifiziertes LDL
PAMP	<i>Pathogen Associated Molecular Pattern</i>
PBS	<i>Phosphate Buffered Saline</i>
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i> (Polymerasekettenreaktion)
PMA	12-Phorbol-13-myristat
PNH	Paroxymale nächtliche Hämoglobinurie
POD	Peroxidase
Ppm	<i>Parts Per Million</i>
PRR	<i>Pattern Recognition Receptor</i>
PSA	Prostataspezifisches Antigen
RIG-1	<i>Retinoic Acid Inducible Gene 1</i>
RISC	<i>RNA induced silencing complex</i>
RLR	<i>Retinoic Acid Inducible Gene 1-like Receptor</i>
RNA	Ribonukleinsäure
ROS	<i>Reactive Oxygen Species</i> (reaktive Sauerstoffspezies)
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	<i>Reverse Transcription PCR</i>
SCLC	kleinzelliges Lungenkarzinom
SDS	Natriumdodecylsulfat
SDS-PAGE	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese
SEC	<i>Size Exclusion Chromatography</i> (Größenausschlußchromatographie)
siRNA	<i>small interfering RNA</i>
SREBP	<i>Sterol Regulatory Element-Binding Protein</i>
SSC	<i>Sideward Scatter</i> (Seitwärtsstreuung)
TF-Antigen	Thomsen-Friedenreich-Antigen
TLR	<i>Toll-like Receptor</i>
Tn-Antigen	T-nouvelle-Antigen
TNF	<i>Tumor Necrosis Factor</i>
TNM-Klassifikation	Stadieneinteilung von Tumorerkrankungen nach Verhalten des (Primär-)Tumors, Befall von Lymphknoten (<i>Nodes</i>) u. Auftreten von Fernmetastasen
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
U	<i>Unit</i> (Enzymeinheit)
UICC	<i>Union internationale contre le cancer</i> (Intern. Organisation zur Erforschung, Behandlung und Prävention von Krebserkrankungen)
Upm	Umdrehung pro Minute
UPR	<i>Unfolded Protein Response</i>
VEGF	<i>Vascular Endothelial Growth Factor</i>
V _H	Variable Region der schweren Kette eines Immunglobulins
V _L	Variable Region der leichten Kette eines Immunglobulins
VLDL	<i>Very Low Density Lipoprotein</i>
v/v	Volumenprozent
7-AAD	7-Aminoactinomycin D
x g	Vielfaches der Erdbeschleunigung

VII. Literaturverzeichnis

- (1) Parkin DM, Bray F, Ferlay J, Pisani P. Global cancer statistics, 2002. *CA Cancer J Clin* 2005; 55: 74-108.
- (2) Robert-Koch-Institut, Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V. Krebs in Deutschland - Häufigkeiten und Trends, 2006.
- (3) Statistisches Bundesamt. Statistisches Jahrbuch 2007, 2007.
- (4) Deutsche Krebshilfe e.V. Klinische Studien. In: Deutsche Krebshilfe e.V., Hrsg. Der blaue Ratgeber. Bd. 10, 2006.
- (5) Biotech F. Hintergrundmaterial zur Entwicklung trifunktionaler Antikörper, ASCO 2007, 2007.
- (6) Murdoch D, Sager J. Will targeted therapy hold its promise? An evidence-based review. *Curr Opin Oncol* 2008; 20: 104-111.
- (7) Press MF, Lenz HJ. EGFR, HER2 and VEGF pathways: validated targets for cancer treatment. *Drugs* 2007; 67: 2045-2075.
- (8) Segota E, Bukowski RM. The promise of targeted therapy: cancer drugs become more specific. *Cleve Clin J Med* 2004; 71: 551-560.
- (9) Carter PJ. Potent antibody therapeutics by design. *Nat Rev Immunol* 2006; 6: 343-357.
- (10) FUTURE II Study Group. Quadrivalent vaccine against human papillomavirus to prevent high-grade cervical lesions. *N Engl J Med* 2007; 356: 1915-1927.
- (11) Bryan JT. Developing an HPV vaccine to prevent cervical cancer and genital warts. *Vaccine* 2007; 25: 3001-3006.
- (12) Wagner S, Jasinska J, Breiteneder H, et al. Delayed tumor onset and reduced tumor growth progression after immunization with a Her-2/neu multi-peptide vaccine and IL-12 in c-neu transgenic mice. *Breast Cancer Res Treat* 2007; 106: 29-38.
- (13) Flowers CR. BiovaxID idiotypic vaccination: active immunotherapy for follicular lymphoma. *Expert Rev Vaccines* 2007; 6: 307-317.
- (14) Trefzer U, Herberth G, Wohlan K, et al. Tumour-dendritic hybrid cell vaccination for the treatment of patients with malignant melanoma: immunological effects and clinical results. *Vaccine* 2005; 23: 2367-2373.
- (15) Kundig TM, Renner C, Knuth A. [Cancer immunotherapy--current status]. *Ther Umsch* 2006; 63: 262-266.
- (16) Finke LH, Wentworth K, Blumenstein B, Rudolph NS, Levitsky H, Hoos A. Lessons from randomized phase III studies with active cancer immunotherapies--outcomes from the 2006 meeting of the Cancer Vaccine Consortium (CVC). *Vaccine* 2007; 25 Suppl 2: B97-B109.
- (17) Giantonio BJ, Catalano PJ, Meropol NJ, et al. Bevacizumab in combination with oxaliplatin, fluorouracil, and leucovorin (FOLFOX4) for previously treated metastatic colorectal cancer: results from the Eastern Cooperative Oncology Group Study E3200. *J Clin Oncol* 2007; 25: 1539-1544.

- (18) McKeage K, Perry CM. Trastuzumab: a review of its use in the treatment of metastatic breast cancer overexpressing HER2. *Drugs* 2002; 62: 209-243.
- (19) Dinh P, de Azambuja E, Piccart-Gebhart MJ. Trastuzumab for early breast cancer: current status and future directions. *Clin Adv Hematol Oncol* 2007; 5: 707-717.
- (20) Glennie MJ, van de Winkel JG. Renaissance of cancer therapeutic antibodies. *Drug Discov Today* 2003; 8: 503-510.
- (21) Dickman S. Antibodies stage a comeback in cancer treatment. *Science* 1998; 280: 1196-1197.
- (22) Houghton AN, Scheinberg DA. Monoclonal antibody therapies-a 'constant' threat to cancer. *Nat Med* 2000; 6: 373-374.
- (23) Schrama D, Reisfeld RA, Becker JC. Antibody targeted drugs as cancer therapeutics. *Nat Rev Drug Discov* 2006; 5: 147-159.
- (24) Carter P. Improving the efficacy of antibody-based cancer therapies. *Nat Rev Cancer* 2001; 1: 118-129.
- (25) Ehrlich P. The general significance of the side-chain theory, and its importance in biology and therapy. *Special Pathology and Therapy* 1900; 8: 163-185.
- (26) Ehrlich P. On immunity with special reference to cell life. *Proc. R. Soc. Lond. (Biol.)* 1900; 66: 424-428.
- (27) Galfre G, Milstein C. Preparation of monoclonal antibodies: strategies and procedures. *Methods Enzymol* 1981; 73: 3-46.
- (28) Kohler G, Milstein C. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. 1975. *J Immunol* 2005; 174: 2453-2455.
- (29) Adams GP, Weiner LM. Monoclonal antibody therapy of cancer. *Nat Biotechnol* 2005; 23: 1147-1157.
- (30) Carter P, Smith L, Ryan M. Identification and validation of cell surface antigens for antibody targeting in oncology. *Endocr Relat Cancer* 2004; 11: 659-687.
- (31) van Oers MH, Klasa R, Marcus RE, et al. Rituximab maintenance improves clinical outcome of relapsed/resistant follicular non-Hodgkin lymphoma in patients both with and without rituximab during induction: results of a prospective randomized phase 3 intergroup trial. *Blood* 2006; 108: 3295-3301.
- (32) Borchmann P, Riethmuller G, Engert A. [Monoclonal antibodies: development and clinical prospects]. *Internist (Berl)* 2001; 42: 803-804, 807-814.
- (33) Tjandra JJ, Ramadi L, McKenzie IF. Development of human anti-murine antibody (HAMA) response in patients. *Immunol Cell Biol* 1990; 68 (Pt 6): 367-376.
- (34) Ober RJ, Radu CG, Ghetie V, Ward ES. Differences in promiscuity for antibody-FcRn interactions across species: implications for therapeutic antibodies. *Int Immunol* 2001; 13: 1551-1559.
- (35) Presta LG, Shields RL, Namenuk AK, Hong K, Meng YG. Engineering therapeutic antibodies for improved function. *Biochem Soc Trans* 2002; 30: 487-490.

- (36) Riethmuller G, Holz E, Schlimok G, et al. Monoclonal antibody therapy for resected Dukes' C colorectal cancer: seven-year outcome of a multicenter randomized trial. *J Clin Oncol* 1998; 16: 1788-1794.
- (37) Hartung G, Hofheinz RD, Dencausse Y, et al. Adjuvant therapy with edrecolomab versus observation in stage II colon cancer: a multicenter randomized phase III study. *Onkologie* 2005; 28: 347-350.
- (38) Boulianne GL, Hozumi N, Shulman MJ. Production of functional chimaeric mouse/human antibody. *Nature* 1984; 312: 643-646.
- (39) Jones PT, Dear PH, Foote J, Neuberger MS, Winter G. Replacing the complementarity-determining regions in a human antibody with those from a mouse. *Nature* 1986; 321: 522-525.
- (40) Riechmann L, Clark M, Waldmann H, Winter G. Reshaping human antibodies for therapy. *Nature* 1988; 332: 323-327.
- (41) Gonzales NR, De Pascalis R, Schlom J, Kashmiri SV. Minimizing the immunogenicity of antibodies for clinical application. *Tumour Biol* 2005; 26: 31-43.
- (42) Khzaeli MB, Conry RM, LoBuglio AF. Human immune response to monoclonal antibodies. *J Immunother Emphasis Tumor Immunol* 1994; 15: 42-52.
- (43) LoBuglio AF, Wheeler RH, Trang J, et al. Mouse/human chimeric monoclonal antibody in man: kinetics and immune response. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1989; 86: 4220-4224.
- (44) Steinman L. Blocking adhesion molecules as therapy for multiple sclerosis: natalizumab. *Nat Rev Drug Discov* 2005; 4: 510-518.
- (45) Puellmann K, Beham AW, Kaminski WE. Cytokine storm and an anti-CD28 monoclonal antibody. *N Engl J Med* 2006; 355: 2592-2593; author reply 2593-2594.
- (46) Verheul HM, Pinedo HM. Possible molecular mechanisms involved in the toxicity of angiogenesis inhibition. *Nat Rev Cancer* 2007; 7: 475-485.
- (47) Schellhaas E, Loddenkemper C, Schmittel A, Buhr HJ, Pohlen U. Bowel perforation in non-small cell lung cancer after bevacizumab therapy. *Invest New Drugs* 2009; 27: 184-187.
- (48) Roche Pharma AG. Rote-Hand-Brief zu Avastin® (Bevacizumab): Arzneimittelkommission der deutschen Ärzteschaft, 2007.
- (49) Roche Pharma AG. Rote-Hand-Brief zu Avastin® (Bevacizumab): Arzneimittelkommission der deutschen Ärzteschaft, 2009.
- (50) Abbott GmbH & Co. KG. Rote-Hand-Brief zu Humira® (Adalimumab): Arzneimittelkommission der deutschen Ärzteschaft, 2008.
- (51) Gibaldi M. Anatomy of an antibody, and related misadventures in developing an effective treatment for septic shock. *Pharmacotherapy* 1993; 13: 302-308.
- (52) Sharkey RM, Goldenberg DM. Targeted therapy of cancer: new prospects for antibodies and immunoconjugates. *CA Cancer J Clin* 2006; 56: 226-243.
- (53) Zangemeister-Wittke U. Antibodies for targeted cancer therapy -- technical aspects and clinical perspectives. *Pathobiology* 2005; 72: 279-286.

- (54) Stern M, Herrmann R. Overview of monoclonal antibodies in cancer therapy: present and promise. *Crit Rev Oncol Hematol* 2005; 54: 11-29.
- (55) Reichert JM, Rosensweig CJ, Faden LB, Dewitz MC. Monoclonal antibody successes in the clinic. *Nat Biotechnol* 2005; 23: 1073-1078.
- (56) Reichert JM, Valge-Archer VE. Development trends for monoclonal antibody cancer therapeutics. *Nat Rev Drug Discov* 2007; 6: 349-356.
- (57) Hoogenboom HR. Selecting and screening recombinant antibody libraries. *Nat Biotechnol* 2005; 23: 1105-1116.
- (58) Lonberg N. Human antibodies from transgenic animals. *Nat Biotechnol* 2005; 23: 1117-1125.
- (59) Wang HC, Yang MH, Shi YY, et al. [Screening and analysis of genes encoding hepatocellular carcinoma associated tumor antigens]. *Zhonghua Gan Zang Bing Za Zhi* 2005; 13: 343-346.
- (60) Zhou FL, Zhang WG, Chen G, et al. Serological identification and bioinformatics analysis of immunogenic antigens in multiple myeloma. *Cancer Immunol Immunother* 2006; 55: 910-917.
- (61) Brandlein S, Pohle T, Ruoff N, Wozniak E, Muller-Hermelink HK, Vollmers HP. Natural IgM antibodies and immunosurveillance mechanisms against epithelial cancer cells in humans. *Cancer Res* 2003; 63: 7995-8005.
- (62) Vollmers HP, O'Connor R, Muller J, Kirchner T, Muller-Hermelink HK. SC-1, a functional human monoclonal antibody against autologous stomach carcinoma cells. *Cancer Res* 1989; 49: 2471-2476.
- (63) Faller G, Vollmers HP, Weiglein I, et al. HAB-1, a new heteromyeloma for continuous production of human monoclonal antibodies. *Br J Cancer* 1990; 62: 595-598.
- (64) Vollmers HP, Dammrich J, Hensel F, et al. Differential expression of apoptosis receptors on diffuse and intestinal type stomach carcinoma. *Cancer* 1997; 79: 433-440.
- (65) Rauschert N, Brandlein S, Holzinger E, Hensel F, Muller-Hermelink HK, Vollmers HP. A new tumor-specific variant of GRP78 as target for antibody-based therapy. *Lab Invest* 2008; 88: 375-386.
- (66) Vollmers HP, Brandlein S. Nature's best weapons to fight cancer. Revival of human monoclonal IgM antibodies. *Hum Antibodies* 2002; 11: 131-142.
- (67) Vollmers HP, Zimmermann U, Krenn V, et al. Adjuvant therapy for gastric adenocarcinoma with the apoptosis-inducing human monoclonal antibody SC-1: first clinical and histopathological results. *Oncol Rep* 1998; 5: 549-552.
- (68) Brandlein S, Beyer I, Eck M, et al. Cysteine-rich fibroblast growth factor receptor 1, a new marker for precancerous epithelial lesions defined by the human monoclonal antibody PAM-1. *Cancer Res* 2003; 63: 2052-2061.
- (69) Brandlein S, Eck M, Strobel P, et al. PAM-1, a natural human IgM antibody as new tool for detection of breast and prostate precursors. *Hum Antibodies* 2004; 13: 97-104.
- (70) Brandlein S, Lorenz J, Ruoff N, et al. Human monoclonal IgM antibodies with apoptotic activity isolated from cancer patients. *Hum Antibodies* 2002; 11: 107-119.
- (71) Brandlein S, Pohle T, Vollmers C, et al. CFR-1 receptor as target for tumor-specific apoptosis induced by the natural human monoclonal antibody PAM-1. *Oncol Rep* 2004; 11: 777-784.

- (72) Hensel F, Brandlein S, Eck M, et al. A novel proliferation-associated variant of CFR-1 defined by a human monoclonal antibody. *Lab Invest* 2001; 81: 1097-1108.
- (73) Hensel F, Hermann R, Brandlein S, et al. Regulation of the new coexpressed CD55 (decay-accelerating factor) receptor on stomach carcinoma cells involved in antibody SC-1-induced apoptosis. *Lab Invest* 2001; 81: 1553-1563.
- (74) Hensel F, Hermann R, Schubert C, et al. Characterization of glycosylphosphatidylinositol-linked molecule CD55/decay-accelerating factor as the receptor for antibody SC-1-induced apoptosis. *Cancer Res* 1999; 59: 5299-5306.
- (75) Illert B, Otto C, Vollmers HP, Hensel F, Thiede A, Timmermann W. Human antibody SC-1 reduces disseminated tumor cells in nude mice with human gastric cancer. *Oncol Rep* 2005; 13: 765-770.
- (76) Hensel F, Knorr C, Hermann R, Krenn V, Muller-Hermelink HK, Vollmers HP. Mitogenic autoantibodies in Helicobacter pylori-associated stomach cancerogenesis. *Int J Cancer* 1999; 81: 229-235.
- (77) Vollmers HP, Brandlein S. Natural IgM antibodies: the orphaned molecules in immune surveillance. *Adv Drug Deliv Rev* 2006; 58: 755-765.
- (78) Milner EC, Anolik J, Cappione A, Sanz I. Human innate B cells: a link between host defense and autoimmunity? *Springer Semin Immunopathol* 2005; 26: 433-452.
- (79) Karin M, Lawrence T, Nizet V. Innate immunity gone awry: linking microbial infections to chronic inflammation and cancer. *Cell* 2006; 124: 823-835.
- (80) Nurnberger T, Brunner F, Kemmerling B, Piater L. Innate immunity in plants and animals: striking similarities and obvious differences. *Immunol Rev* 2004; 198: 249-266.
- (81) Du Pasquier L. The immune system of invertebrates and vertebrates. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol* 2001; 129: 1-15.
- (82) Pasare C, Medzhitov R. Toll-like receptors: linking innate and adaptive immunity. *Adv Exp Med Biol* 2005; 560: 11-18.
- (83) Medzhitov R. Toll-like receptors and innate immunity. *Nat Rev Immunol* 2001; 1: 135-145.
- (84) Kimbrell DA, Beutler B. The evolution and genetics of innate immunity. *Nat Rev Genet* 2001; 2: 256-267.
- (85) Cooper EL, Kauschke E, Cossarizza A. Digging for innate immunity since Darwin and Metchnikoff. *Bioessays* 2002; 24: 319-333.
- (86) Hoffmann JA, Reichhart JM. Drosophila innate immunity: an evolutionary perspective. *Nat Immunol* 2002; 3: 121-126.
- (87) Magor BG, Magor KE. Evolution of effectors and receptors of innate immunity. *Dev Comp Immunol* 2001; 25: 651-682.
- (88) Du Pasquier L. Meeting the demand for innate and adaptive immunities during evolution. *Scand J Immunol* 2005; 62 Suppl 1: 39-48.
- (89) Williams MJ. Regulation of antibacterial and antifungal innate immunity in fruitflies and humans. *Adv Immunol* 2001; 79: 225-259.

- (90) Rinkevich B. Invertebrates versus vertebrates innate immunity: In the light of evolution. *Scand J Immunol* 1999; 50: 456-460.
- (91) Parkin J, Cohen B. An overview of the immune system. *Lancet* 2001; 357: 1777-1789.
- (92) Zitvogel L. Dendritic and natural killer cells cooperate in the control/switch of innate immunity. *J Exp Med* 2002; 195: F9-14.
- (93) Bohn J. Are natural antibodies involved in tumour defence? *Immunol Lett* 1999; 69: 317-320.
- (94) MacPherson G, Kushnir N, Wykes M. Dendritic cells, B cells and the regulation of antibody synthesis. *Immunol Rev* 1999; 172: 325-334.
- (95) Boes M. Role of natural and immune IgM antibodies in immune responses. *Mol Immunol* 2000; 37: 1141-1149.
- (96) Ochsenbein AF, Zinkernagel RM. Natural antibodies and complement link innate and acquired immunity. *Immunol Today* 2000; 21: 624-630.
- (97) Greenberg S, Grinstein S. Phagocytosis and innate immunity. *Curr Opin Immunol* 2002; 14: 136-145.
- (98) Medzhitov R, Janeway CA, Jr. Innate immunity: impact on the adaptive immune response. *Curr Opin Immunol* 1997; 9: 4-9.
- (99) Hoebe K, Janssen E, Beutler B. The interface between innate and adaptive immunity. *Nat Immunol* 2004; 5: 971-974.
- (100) Iwasaki A, Medzhitov R. Toll-like receptor control of the adaptive immune responses. *Nat Immunol* 2004; 5: 987-995.
- (101) Mekori YA, Metcalfe DD. Mast cells in innate immunity. *Immunol Rev* 2000; 173: 131-140.
- (102) Moretta L, Biassoni R, Bottino C, Mingari MC, Moretta A. Natural killer cells: a mystery no more. *Scand J Immunol* 2002; 55: 229-232.
- (103) Kawai T, Akira S. Innate immune recognition of viral infection. *Nat Immunol* 2006; 7: 131-137.
- (104) Dunn GP, Old LJ, Schreiber RD. The three Es of cancer immunoediting. *Annu Rev Immunol* 2004; 22: 329-360.
- (105) Akira S, Uematsu S, Takeuchi O. Pathogen recognition and innate immunity. *Cell* 2006; 124: 783-801.
- (106) Weinberg RA. How cancer arises. *Sci Am* 1996; 275: 62-70.
- (107) Cohen HJ. Biology of aging as related to cancer. *Cancer* 1994; 74: 2092-2100.
- (108) Balducci L, Beghe C. Cancer and age in the USA. *Crit Rev Oncol Hematol* 2001; 37: 137-145.
- (109) Cohen SM, Ellwein LB. Genetic errors, cell proliferation, and carcinogenesis. *Cancer Res* 1991; 51: 6493-6505.
- (110) Brandlein S, Vollmers HP. Natural IgM antibodies, the ignored weapons in tumour immunity. *Histol Histopathol* 2004; 19: 897-905.
- (111) Vollmers HP, Brandlein S. Natural antibodies and cancer. *J Autoimmun* 2007; 29: 295-302.

- (112) Erttmann R, Schmitt C, Ollert MW, David K, Bredehorst R, Vogel CW. Naturally occurring humoral cytotoxicity against neuroblastoma (NB) cells in healthy persons and NB patients. *Pediatr Hematol Oncol* 1996; 13: 545-548.
- (113) Greaves M. Darwinian medicine: a case for cancer. *Nat Rev Cancer* 2007; 7: 213-221.
- (114) Brigl M, Brenner MB. CD1: antigen presentation and T cell function. *Annu Rev Immunol* 2004; 22: 817-890.
- (115) Janeway CA, Jr. Approaching the asymptote? Evolution and revolution in immunology. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 1989; 54 Pt 1: 1-13.
- (116) Janeway CA, Jr., Medzhitov R. Innate immune recognition. *Annu Rev Immunol* 2002; 20: 197-216.
- (117) Medzhitov R, Janeway C, Jr. The Toll receptor family and microbial recognition. *Trends Microbiol* 2000; 8: 452-456.
- (118) Armant MA, Fenton MJ. Toll-like receptors: a family of pattern-recognition receptors in mammals. *Genome Biol* 2002; 3: REVIEWS3011.
- (119) Palsson-McDermott EM, O'Neill LA. Building an immune system from nine domains. *Biochem Soc Trans* 2007; 35: 1437-1444.
- (120) Burnet FM. The concept of immunological surveillance. *Prog Exp Tumor Res* 1970; 13: 1-27.
- (121) Burnet M. Immunological Factors in the Process of Carcinogenesis. *Br Med Bull* 1964; 20: 154-158.
- (122) Thomas L. On immunosurveillance in human cancer. *Yale J Biol Med* 1982; 55: 329-333.
- (123) Medzhitov R, Janeway CA, Jr. Decoding the patterns of self and nonself by the innate immune system. *Science* 2002; 296: 298-300.
- (124) Vollmers HP, Brandlein S. The "early birds": natural IgM antibodies and immune surveillance. *Histol Histopathol* 2005; 20: 927-937.
- (125) Avrameas S. Natural autoantibodies: from 'horror autotoxicus' to 'gnothi seauton'. *Immunol Today* 1991; 12: 154-159.
- (126) Baumgarth N, Tung JW, Herzenberg LA. Inherent specificities in natural antibodies: a key to immune defense against pathogen invasion. *Springer Semin Immunopathol* 2005; 26: 347-362.
- (127) Casali P, Schettino EW. Structure and function of natural antibodies. *Curr Top Microbiol Immunol* 1996; 210: 167-179.
- (128) Coutinho A, Kazatchkine MD, Avrameas S. Natural autoantibodies. *Curr Opin Immunol* 1995; 7: 812-818.
- (129) Ochsenbein AF, Fehr T, Lutz C, et al. Control of early viral and bacterial distribution and disease by natural antibodies. *Science* 1999; 286: 2156-2159.
- (130) Vollmers HP, Brandlein S. Death by stress: natural IgM-induced apoptosis. *Methods Find Exp Clin Pharmacol* 2005; 27: 185-191.
- (131) Abastado JP. Apoptosis: function and regulation of cell death. *Res Immunol* 1996; 147: 443-456.
- (132) Suriano R, Ghosh SK, Ashok BT, et al. Differences in glycosylation patterns of heat shock protein, gp96: implications for prostate cancer prevention. *Cancer Res* 2005; 65: 6466-6475.

- (133) Vollmers HP, Brandlein S. Natural IgM antibodies: from parias to parvenus. *Histol Histopathol* 2006; 21: 1355-1366.
- (134) Vollmers HP, Hensel F, Hermann R, et al. Tumor-specific apoptosis induced by the human monoclonal antibody SC-1: a new therapeutical approach for stomach cancer. *Oncol Rep* 1998; 5: 35-40.
- (135) Mikesch JH, Schier K, Roetger A, Simon R, Buerger H, Brandt B. The expression and action of decay-accelerating factor (CD55) in human malignancies and cancer therapy. *Cell Oncol* 2006; 28: 223-232.
- (136) Vollmers HP, Dammrich J, Ribbert H, Wozniak E, Muller-Hermelink HK. Apoptosis of stomach carcinoma cells induced by a human monoclonal antibody. *Cancer* 1995; 76: 550-558.
- (137) Hermann R, Hensel F, Muller EC, et al. Deactivation of regulatory proteins hnRNP A1 and A2 during SC-1 induced apoptosis. *Hum Antibodies* 2001; 10: 83-90.
- (138) Vollmers HP, Timmermann W, Hensel F, Illert B, Thiede A, Muller-Hermelink HK. [Adjuvant immunotherapy of stomach carcinoma with antibody-induced apoptosis]. *Zentralbl Chir* 2000; 125 Suppl 1: 37-40.
- (139) Illert B, Timmermann W, Thiede A. [New concepts in treatment of gastric carcinoma]. *Rozhl Chir* 2005; 84: 432-435.
- (140) Timmermann W, Illert B, Vollmers HP, et al. [Induction of apoptosis by preoperative passive immunotherapy in resectable stomach carcinoma]. *Kongressbd Dtsch Ges Chir Kongr* 2002; 119: 396-397.
- (141) Siewert JR, Bottcher K, Stein HJ, Roder JD. Relevant prognostic factors in gastric cancer: ten-year results of the German Gastric Cancer Study. *Ann Surg* 1998; 228: 449-461.
- (142) Vollmers HP, Dammrich J, Ribbert H, et al. Human monoclonal antibodies from stomach carcinoma patients react with *Helicobacter pylori* and stimulate stomach cancer cells in vitro. *Cancer* 1994; 74: 1525-1532.
- (143) Pohle T, Brandlein S, Ruoff N, Muller-Hermelink HK, Vollmers HP. Lipoptosis: tumor-specific cell death by antibody-induced intracellular lipid accumulation. *Cancer Res* 2004; 64: 3900-3906.
- (144) Lauren P. The Two Histological Main Types of Gastric Carcinoma: Diffuse and So-Called Intestinal-Type Carcinoma. an Attempt at a Histo-Clinical Classification. *Acta Pathol Microbiol Scand* 1965; 64: 31-49.
- (145) Hermanek P, Hutter RV, Sobin LH, Wittekind C. International Union Against Cancer. Classification of isolated tumor cells and micrometastasis. *Cancer* 1999; 86: 2668-2673.
- (146) Hermanek P, Scheibe O, Spiessl B, Wagner G. [TNM classification of malignant tumors: the new 1987 edition]. *Rontgenblatter* 1987; 40: 200.
- (147) Elbashir SM, Lendeckel W, Tuschl T. RNA interference is mediated by 21- and 22-nucleotide RNAs. *Genes Dev* 2001; 15: 188-200.
- (148) Denizot F, Lang R. Rapid colorimetric assay for cell growth and survival. Modifications to the tetrazolium dye procedure giving improved sensitivity and reliability. *J Immunol Methods* 1986; 89: 271-277.
- (149) Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods* 1983; 65: 55-63.

- (150) Liu X, Kim CN, Yang J, Jemmerson R, Wang X. Induction of apoptotic program in cell-free extracts: requirement for dATP and cytochrome c. *Cell* 1996; 86: 147-157.
- (151) Hooper NM, Karran EH, Turner AJ. Membrane protein secretases. *Biochem J* 1997; 321 (Pt 2): 265-279.
- (152) Kheradmand F, Werb Z. Shedding light on sheddases: role in growth and development. *Bioessays* 2002; 24: 8-12.
- (153) Werb Z, Yan Y. A cellular striptease act. *Science* 1998; 282: 1279-1280.
- (154) Mott JD, Werb Z. Regulation of matrix biology by matrix metalloproteinases. *Curr Opin Cell Biol* 2004; 16: 558-564.
- (155) Smith PK, Krohn RI, Hermanson GT, et al. Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal Biochem* 1985; 150: 76-85.
- (156) Wiechelman KJ, Braun RD, Fitzpatrick JD. Investigation of the bicinchoninic acid protein assay: identification of the groups responsible for color formation. *Anal Biochem* 1988; 175: 231-237.
- (157) Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 1970; 227: 680-685.
- (158) Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. *Molecular cloning: a laboratory manual* Cold Spring Harbor, New York 1989.
- (159) Poehling HM, Neuhoff V. Visualization of proteins with a silver stain: A critical analysis. *Electrophoresis* 1981; 2: 141-147.
- (160) Towbin H, Staehelin T, Gordon J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1979; 76: 4350-4354.
- (161) Vierck JL, Bryne KM, Dodson MV. Evaluating dot and Western blots using image analysis and pixel quantification of electronic images. *Methods Cell Sci* 2000; 22: 313-318.
- (162) Maniratanachote R, Minami K, Katoh M, Nakajima M, Yokoi T. Chaperone proteins involved in troglitazone-induced toxicity in human hepatoma cell lines. *Toxicol Sci* 2005; 83: 293-302.
- (163) Mann M, Wilm M. Electrospray mass spectrometry for protein characterization. *Trends Biochem Sci* 1995; 20: 219-224.
- (164) Chomczynski P, Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* 1987; 162: 156-159.
- (165) Ormerod MG. *Flow Cytometry*. New York: Springer Verlag New York Inc. 1999; 2: 109.
- (166) Ormerod MG. Investigating the relationship between the cell cycle and apoptosis using flow cytometry. *J Immunol Methods* 2002; 265: 73-80.
- (167) Ormerod MG, Sun XM, Brown D, Snowden RT, Cohen GM. Quantification of apoptosis and necrosis by flow cytometry. *Acta Oncol* 1993; 32: 417-424.
- (168) Darzynkiewicz Z, Li X, Gong J. Assays of cell viability: discrimination of cells dying by apoptosis. *Methods Cell Biol* 1994; 41: 15-38.

- (169) Kroemer G, Petit P, Zamzami N, Vayssiere JL, Mignotte B. The biochemistry of programmed cell death. *Faseb J* 1995; 9: 1277-1287.
- (170) Chung NS, Wasan KM. Potential role of the low-density lipoprotein receptor family as mediators of cellular drug uptake. *Adv Drug Deliv Rev* 2004; 56: 1315-1334.
- (171) Binder CJ, Shaw PX, Chang MK, et al. The role of natural antibodies in atherogenesis. *J Lipid Res* 2005; 46: 1353-1363.
- (172) Miller YI, Chang MK, Binder CJ, Shaw PX, Witztum JL. Oxidized low density lipoprotein and innate immune receptors. *Curr Opin Lipidol* 2003; 14: 437-445.
- (173) Ashkenazi A. Targeting death and decoy receptors of the tumour-necrosis factor superfamily. *Nat Rev Cancer* 2002; 2: 420-430.
- (174) Fumarola C, Guidotti GG. Stress-induced apoptosis: toward a symmetry with receptor-mediated cell death. *Apoptosis* 2004; 9: 77-82.
- (175) Yang Y, Li Z. Roles of heat shock protein gp96 in the ER quality control: redundant or unique function? *Mol Cells* 2005; 20: 173-182.
- (176) Fu Y, Lee AS. Glucose regulated proteins in cancer progression, drug resistance and immunotherapy. *Cancer Biol Ther* 2006; 5: 741-744.
- (177) Li J, Lee AS. Stress induction of GRP78/BiP and its role in cancer. *Curr Mol Med* 2006; 6: 45-54.
- (178) Elbashir SM, Harborth J, Lendeckel W, Yalcin A, Weber K, Tuschl T. Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells. *Nature* 2001; 411: 494-498.
- (179) Blass S, Union A, Raymackers J, et al. The stress protein BiP is overexpressed and is a major B and T cell target in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 2001; 44: 761-771.
- (180) Bhattacharjee G, Ahamed J, Pedersen B, et al. Regulation of tissue factor--mediated initiation of the coagulation cascade by cell surface grp78. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2005; 25: 1737-1743.
- (181) Davidson DJ, Haskell C, Majest S, et al. Kringle 5 of human plasminogen induces apoptosis of endothelial and tumor cells through surface-expressed glucose-regulated protein 78. *Cancer Res* 2005; 65: 4663-4672.
- (182) Dube DH, Bertozzi CR. Glycans in cancer and inflammation--potential for therapeutics and diagnostics. *Nat Rev Drug Discov* 2005; 4: 477-488.
- (183) Fuster MM, Esko JD. The sweet and sour of cancer: glycans as novel therapeutic targets. *Nat Rev Cancer* 2005; 5: 526-542.
- (184) Little E, Ramakrishnan M, Roy B, Gazit G, Lee AS. The glucose-regulated proteins (GRP78 and GRP94): functions, gene regulation, and applications. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr* 1994; 4: 1-18.
- (185) Dwek MV, Brooks SA. Harnessing changes in cellular glycosylation in new cancer treatment strategies. *Curr Cancer Drug Targets* 2004; 4: 425-442.
- (186) Prattes S, Horl G, Hammer A, et al. Intracellular distribution and mobilization of unesterified cholesterol in adipocytes: triglyceride droplets are surrounded by cholesterol-rich ER-like surface layer structures. *J Cell Sci* 2000; 113 (Pt 17): 2977-2989.

- (187) Werstuck GH, Lentz SR, Dayal S, et al. Homocysteine-induced endoplasmic reticulum stress causes dysregulation of the cholesterol and triglyceride biosynthetic pathways. *J Clin Invest* 2001; 107: 1263-1273.
- (188) Delpino A, Piselli P, Vismara D, Vendetti S, Colizzi V. Cell surface localization of the 78 kD glucose regulated protein (GRP 78) induced by thapsigargin. *Mol Membr Biol* 1998; 15: 21-26.
- (189) Ahram M, Adkins JN, Auberry DL, Wunschel DS, Springer DL. A proteomic approach to characterize protein shedding. *Proteomics* 2005; 5: 123-131.
- (190) Calderwood SK, Mambula SS, Gray PJ, Jr. Extracellular heat shock proteins in cell signaling and immunity. *Ann N Y Acad Sci* 2007; 1113: 28-39.
- (191) Arribas J, Borroto A. Protein ectodomain shedding. *Chem Rev* 2002; 102: 4627-4638.
- (192) Hino T, Nakamura H, Abe S, et al. Hydrogen peroxide enhances shedding of type I soluble tumor necrosis factor receptor from pulmonary epithelial cells. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1999; 20: 122-128.
- (193) Hintz KA, Rassias AJ, Wardwell K, et al. Endotoxin induces rapid metalloproteinase-mediated shedding followed by up-regulation of the monocyte hemoglobin scavenger receptor CD163. *J Leukoc Biol* 2002; 72: 711-717.
- (194) Zhang Z, Oliver P, Lancaster JJ, et al. Reactive oxygen species mediate tumor necrosis factor alpha-converting, enzyme-dependent ectodomain shedding induced by phorbol myristate acetate. *Faseb J* 2001; 15: 303-305.
- (195) Suffredini AF, Hochstein HD, McMahon FG. Dose-related inflammatory effects of intravenous endotoxin in humans: evaluation of a new clinical lot of Escherichia coli O:113 endotoxin. *J Infect Dis* 1999; 179: 1278-1282.
- (196) Beutner U, Lorenz U, Illert B, et al. Neoadjuvant therapy of gastric cancer with the human monoclonal IgM antibody SC-1: impact on the immune system. *Oncol Rep* 2008; 19: 761-769.
- (197) Vollmers PH, Brandlein S. Natural monoclonal antibodies and cancer. *Recent Patents Anticancer Drug Discov* 2008; 3: 84-87.
- (198) Brandlein S, Rauschert N, Rasche L, et al. The human IgM antibody SAM-6 induces tumor-specific apoptosis with oxidized low-density lipoprotein. *Mol Cancer Ther* 2007; 6: 326-333.
- (199) Triantafilou K, Fradelizi D, Wilson K, Triantafilou M. GRP78, a coreceptor for coxsackievirus A9, interacts with major histocompatibility complex class I molecules which mediate virus internalization. *J Virol* 2002; 76: 633-643.
- (200) Misra UK, Gonzalez-Gronow M, Gawdi G, Pizzo SV. The role of MTJ-1 in cell surface translocation of GRP78, a receptor for alpha 2-macroglobulin-dependent signaling. *J Immunol* 2005; 174: 2092-2097.
- (201) Medzhitov R, Janeway C, Jr. Innate immunity. *N Engl J Med* 2000; 343: 338-344.
- (202) Du Pasquier L. Innate immunity in early chordates and the appearance of adaptive immunity. *C R Biol* 2004; 327: 591-601.
- (203) Boes M, Schmidt T, Linkemann K, Beaudette BC, Marshak-Rothstein A, Chen J. Accelerated development of IgG autoantibodies and autoimmune disease in the absence of secreted IgM. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000; 97: 1184-1189.

- (204) Dunn GP, Old LJ, Schreiber RD. The immunobiology of cancer immunosurveillance and immunoediting. *Immunity* 2004; 21: 137-148.
- (205) Moretta L, Biassoni R, Bottino C, et al. Human NK cells and their receptors. *Microbes Infect* 2002; 4: 1539-1544.
- (206) Janeway CA, Jr., Dinzani U, Portoles P, et al. Cross-linking and conformational change in T-cell receptors: role in activation and in repertoire selection. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 1989; 54 Pt 2: 657-666.
- (207) Medzhitov R, Janeway CA, Jr. How does the immune system distinguish self from nonself? *Semin Immunol* 2000; 12: 185-188; discussion 257-344.
- (208) Sharp SY, Prodromou C, Boxall K, et al. Inhibition of the heat shock protein 90 molecular chaperone in vitro and in vivo by novel, synthetic, potent resorcinolic pyrazole/isoxazole amide analogues. *Mol Cancer Ther* 2007; 6: 1198-1211.
- (209) Beg AA. Endogenous ligands of Toll-like receptors: implications for regulating inflammatory and immune responses. *Trends Immunol* 2002; 23: 509-512.
- (210) Chen K, Huang J, Gong W, Iribarren P, Dunlop NM, Wang JM. Toll-like receptors in inflammation, infection and cancer. *Int Immunopharmacol* 2007; 7: 1271-1285.
- (211) Okamura Y, Watari M, Jerud ES, et al. The extra domain A of fibronectin activates Toll-like receptor 4. *J Biol Chem* 2001; 276: 10229-10233.
- (212) Termeer C, Benedix F, Sleeman J, et al. Oligosaccharides of Hyaluronan activate dendritic cells via toll-like receptor 4. *J Exp Med* 2002; 195: 99-111.
- (213) Leadbetter EA, Rifkin IR, Hohlbaum AM, Beaudette BC, Shlomchik MJ, Marshak-Rothstein A. Chromatin-IgG complexes activate B cells by dual engagement of IgM and Toll-like receptors. *Nature* 2002; 416: 603-607.
- (214) Wallin RP, Lundqvist A, More SH, von Bonin A, Kiessling R, Ljunggren HG. Heat-shock proteins as activators of the innate immune system. *Trends Immunol* 2002; 23: 130-135.
- (215) Warger T, Hilf N, Rechtsteiner G, et al. Interaction of TLR2 and TLR4 ligands with the N-terminal domain of Gp96 amplifies innate and adaptive immune responses. *J Biol Chem* 2006; 281: 22545-22553.
- (216) Medzhitov R, Janeway CA, Jr. Innate immune induction of the adaptive immune response. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 1999; 64: 429-435.
- (217) Ollert MW, David K, Schmitt C, et al. Normal human serum contains a natural IgM antibody cytotoxic for human neuroblastoma cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996; 93: 4498-4503.
- (218) Livingston PO, Zhang S, Lloyd KO. Carbohydrate vaccines that induce antibodies against cancer. 1. Rationale. *Cancer Immunol Immunother* 1997; 45: 1-9.
- (219) Vollmers HP, Brandlein S. Tumors: too sweet to remember? *Mol Cancer* 2007; 6: 78.
- (220) Dono M, Cerruti G, Zupo S. The CD5+ B-cell. *Int J Biochem Cell Biol* 2004; 36: 2105-2111.
- (221) Tonegawa S. Somatic generation of immune diversity. *Biosci Rep* 1988; 8: 3-26.

- (222) Marchalonis JJ, Adelman MK, Robey IF, Schluter SF, Edmundson AB. Exquisite specificity and peptide epitope recognition promiscuity, properties shared by antibodies from sharks to humans. *J Mol Recognit* 2001; 14: 110-121.
- (223) Prabhakar BS, Saegusa J, Onodera T, Notkins AL. Lymphocytes capable of making monoclonal autoantibodies that react with multiple organs are a common feature of the normal B cell repertoire. *J Immunol* 1984; 133: 2815-2817.
- (224) Michel CC. Transport of macromolecules through microvascular walls. *Cardiovasc Res* 1996; 32: 644-653.
- (225) Mostov KE. Transepithelial transport of immunoglobulins. *Annu Rev Immunol* 1994; 12: 63-84.
- (226) Watts C, Powis S. Pathways of antigen processing and presentation. *Rev Immunogenet* 1999; 1: 60-74.
- (227) Cobb BA, Wang Q, Tzianabos AO, Kasper DL. Polysaccharide processing and presentation by the MHCII pathway. *Cell* 2004; 117: 677-687.
- (228) Zinkernagel RM, Doherty PC. The discovery of MHC restriction. *Immunol Today* 1997; 18: 14-17.
- (229) Cobb BA, Kasper DL. Coming of age: carbohydrates and immunity. *Eur J Immunol* 2005; 35: 352-356.
- (230) Dzhambazov B, Holmdahl M, Yamada H, et al. The major T cell epitope on type II collagen is glycosylated in normal cartilage but modified by arthritis in both rats and humans. *Eur J Immunol* 2005; 35: 357-366.
- (231) Gatenby RA. The potential role of transformation-induced metabolic changes in tumor-host interaction. *Cancer Res* 1995; 55: 4151-4156.
- (232) Gericke D, Drahovsky D. [Marker substances in the diagnosis of malignant diseases]. *MMW Munch Med Wochenschr* 1983; 125: 865-867.
- (233) Drahovsky D, Brzoska MJ, Werle A, Boehm TL. Suppression of malignant phenotype, changes in gene expression and DNA hypermethylation in human melanoma cells treated with arabinosyl cytosine. *Prog Clin Biol Res* 1985; 198: 271-278.
- (234) Kobata A, Amano J. Altered glycosylation of proteins produced by malignant cells, and application for the diagnosis and immunotherapy of tumours. *Immunol Cell Biol* 2005; 83: 429-439.
- (235) Kannagi R, Izawa M, Koike T, Miyazaki K, Kimura N. Carbohydrate-mediated cell adhesion in cancer metastasis and angiogenesis. *Cancer Sci* 2004; 95: 377-384.
- (236) Vlad AM, Finn OJ. Glycoprotein tumor antigens for immunotherapy of breast cancer. *Breast Dis* 2004; 20: 73-79.
- (237) Ohyama C. Glycosylation in bladder cancer. *Int J Clin Oncol* 2008; 13: 308-313.
- (238) Loeb S, Catalona WJ. Prostate-specific antigen in clinical practice. *Cancer Lett* 2007; 249: 30-39.
- (239) Loeb S, Catalona WJ. What to do with an abnormal PSA test. *Oncologist* 2008; 13: 299-305.
- (240) Welander CE. What do CA 125 and other antigens tell us about ovarian cancer biology? *Acta Obstet Gynecol Scand Suppl* 1992; 155: 85-93.

- (241) Osman N, O'Leary N, Mulcahy E, et al. Correlation of serum CA125 with stage, grade and survival of patients with epithelial ovarian cancer at a single centre. *Ir Med J* 2008; 101: 245-247.
- (242) Bramwell ME, Bhavanandan VP, Wiseman G, Harris H. Structure and function of the Ca antigen. *Br J Cancer* 1983; 48: 177-183.
- (243) Hogdall E. Cancer antigen 125 and prognosis. *Curr Opin Obstet Gynecol* 2008; 20: 4-8.
- (244) Medeiros LR, Rosa DD, da Rosa MI, Bozzetti MC. Accuracy of CA 125 in the diagnosis of ovarian tumors: A quantitative systematic review. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2008.
- (245) Kaur M, Verma IC. Serum alpha feto-protein screening in high risk pregnancies. *Indian J Pediatr* 1995; 62: 101-107.
- (246) St Laurent M, Esterl RM, Jr., Halff GA, Speeg KV. Gallbladder carcinoma producing alpha-fetoprotein. *J Clin Gastroenterol* 1999; 28: 155-158.
- (247) Adinolfi A, Adinolfi M, Lessof. Alpha-feto-protein during development and in disease. *J Med Genet* 1975; 12: 138-151.
- (248) Sato Y, Nakata K, Kato Y, et al. Early recognition of hepatocellular carcinoma based on altered profiles of alpha-fetoprotein. *N Engl J Med* 1993; 328: 1802-1806.
- (249) Block TM, Comunale MA, Lowman M, et al. Use of targeted glycoproteomics to identify serum glycoproteins that correlate with liver cancer in woodchucks and humans. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005; 102: 779-784.
- (250) Marrero JA, Romano PR, Nikolaeva O, et al. GP73, a resident Golgi glycoprotein, is a novel serum marker for hepatocellular carcinoma. *J Hepatol* 2005; 43: 1007-1012.
- (251) Drake RR, Schwegler EE, Malik G, et al. Lectin capture strategies combined with mass spectrometry for the discovery of serum glycoprotein biomarkers. *Mol Cell Proteomics* 2006; 5: 1957-1967.
- (252) Kolter T, Sandhoff K. Recent advances in the biochemistry of sphingolipidoses. *Brain Pathol* 1998; 8: 79-100.
- (253) Sonnino S, Mauri L, Chigorno V, Prinetti A. Gangliosides as components of lipid membrane domains. *Glycobiology* 2007; 17: 1R-13R.
- (254) Varki NM, Varki A. Diversity in cell surface sialic acid presentations: implications for biology and disease. *Lab Invest* 2007; 87: 851-857.
- (255) Morales A, Lee H, Goni FM, Kolesnick R, Fernandez-Checa JC. Sphingolipids and cell death. *Apoptosis* 2007; 12: 923-939.
- (256) Zheng W, Kollmeyer J, Symolon H, et al. Ceramides and other bioactive sphingolipid backbones in health and disease: lipidomic analysis, metabolism and roles in membrane structure, dynamics, signaling and autophagy. *Biochim Biophys Acta* 2006; 1758: 1864-1884.
- (257) Kannagi R, Yin J, Miyazaki K, Izawa M. Current relevance of incomplete synthesis and neo-synthesis for cancer-associated alteration of carbohydrate determinants--Hakomori's concepts revisited. *Biochim Biophys Acta* 2008; 1780: 525-531.
- (258) Hakomori S. Glycosylation defining cancer malignancy: new wine in an old bottle. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002; 99: 10231-10233.

- (259) Fredman P, Hedberg K, Brezicka T. Gangliosides as therapeutic targets for cancer. *BioDrugs* 2003; 17: 155-167.
- (260) Nakamura K, Tanaka Y, Shitara K, Hanai N. Construction of humanized anti-ganglioside monoclonal antibodies with potent immune effector functions. *Cancer Immunol Immunother* 2001; 50: 275-284.
- (261) Hakomori S. Traveling for the glycosphingolipid path. *Glycoconj J* 2000; 17: 627-647.
- (262) Chang WW, Lee CH, Lee P, et al. Expression of Globo H and SSEA3 in breast cancer stem cells and the involvement of fucosyl transferases 1 and 2 in Globo H synthesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008; 105: 11667-11672.
- (263) Le Pendu J, Marionneau S, Cailleau-Thomas A, Rocher J, Le Moullac-Vaidye B, Clement M. ABH and Lewis histo-blood group antigens in cancer. *Apmis* 2001; 109: 9-31.
- (264) Denda-Nagai K, Irimura T. MUC1 in carcinoma-host interactions. *Glycoconj J* 2000; 17: 649-658.
- (265) Chaturvedi P, Singh AP, Batra SK. Structure, evolution, and biology of the MUC4 mucin. *Faseb J* 2008; 22: 966-981.
- (266) Singh AP, Chauhan SC, Bafna S, et al. Aberrant expression of transmembrane mucins, MUC1 and MUC4, in human prostate carcinomas. *Prostate* 2006; 66: 421-429.
- (267) Singh AP, Senapati S, Ponnusamy MP, et al. Clinical potential of mucins in diagnosis, prognosis, and therapy of ovarian cancer. *Lancet Oncol* 2008; 9: 1076-1085.
- (268) Cao Y, Merling A, Karsten U, et al. Expression of CD175 (Tn), CD175s (sialosyl-Tn) and CD176 (Thomsen-Friedenreich antigen) on malignant human hematopoietic cells. *Int J Cancer* 2008; 123: 89-99.
- (269) Gil J, Alvarez R, Vinuela JE, et al. Inhibition of in vivo tumor growth by a monoclonal IgM antibody recognizing tumor cell surface carbohydrates. *Cancer Res* 1990; 50: 7301-7306.
- (270) Schwartz-Albiez R, Laban S, Eichmuller S, Kirschfink M. Cytotoxic natural antibodies against human tumours: an option for anti-cancer immunotherapy? *Autoimmun Rev* 2008; 7: 491-495.
- (271) Modak S, Cheung NK. Disialoganglioside directed immunotherapy of neuroblastoma. *Cancer Invest* 2007; 25: 67-77.
- (272) von Mensdorff-Pouilly S, Verstraeten AA, Kenemans P, et al. Survival in early breast cancer patients is favorably influenced by a natural humoral immune response to polymorphic epithelial mucin. *J Clin Oncol* 2000; 18: 574-583.
- (273) Davis LS, Patel SS, Atkinson JP, Lipsky PE. Decay-accelerating factor functions as a signal transducing molecule for human T cells. *J Immunol* 1988; 141: 2246-2252.
- (274) Macario AJ, Conway de Macario E. Sick chaperones, cellular stress, and disease. *N Engl J Med* 2005; 353: 1489-1501.
- (275) Ma Y, Hendershot LM. The role of the unfolded protein response in tumour development: friend or foe? *Nat Rev Cancer* 2004; 4: 966-977.
- (276) Lee AS. GRP78 induction in cancer: therapeutic and prognostic implications. *Cancer Res* 2007; 67: 3496-3499.

- (277) Munro S, Pelham HR. An Hsp70-like protein in the ER: identity with the 78 kd glucose-regulated protein and immunoglobulin heavy chain binding protein. *Cell* 1986; 46: 291-300.
- (278) Gething MJ. Role and regulation of the ER chaperone BiP. *Semin Cell Dev Biol* 1999; 10: 465-472.
- (279) Chevalier M, King L, Wang C, Gething MJ, Elguindi E, Blond SY. Substrate binding induces depolymerization of the C-terminal peptide binding domain of murine GRP78/BiP. *J Biol Chem* 1998; 273: 26827-26835.
- (280) Munro S, Pelham HR. A C-terminal signal prevents secretion of luminal ER proteins. *Cell* 1987; 48: 899-907.
- (281) Flynn GC, Pohl J, Flocco MT, Rothman JE. Peptide-binding specificity of the molecular chaperone BiP. *Nature* 1991; 353: 726-730.
- (282) Meunier L, Usherwood YK, Chung KT, Hendershot LM. A subset of chaperones and folding enzymes form multiprotein complexes in endoplasmic reticulum to bind nascent proteins. *Mol Biol Cell* 2002; 13: 4456-4469.
- (283) Hendershot LM, Ting J, Lee AS. Identity of the immunoglobulin heavy-chain-binding protein with the 78,000-dalton glucose-regulated protein and the role of posttranslational modifications in its binding function. *Mol Cell Biol* 1988; 8: 4250-4256.
- (284) Blond-Elguindi S, Fourie AM, Sambrook JF, Gething MJ. Peptide-dependent stimulation of the ATPase activity of the molecular chaperone BiP is the result of conversion of oligomers to active monomers. *J Biol Chem* 1993; 268: 12730-12735.
- (285) Freiden PJ, Gaut JR, Hendershot LM. Interconversion of three differentially modified and assembled forms of BiP. *Embo J* 1992; 11: 63-70.
- (286) Hartl FU. Molecular chaperones in cellular protein folding. *Nature* 1996; 381: 571-579.
- (287) Knarr G, Kies U, Bell S, Mayer M, Buchner J. Interaction of the chaperone BiP with an antibody domain: implications for the chaperone cycle. *J Mol Biol* 2002; 318: 611-620.
- (288) Zhang J, Herscovitz H. Nascent lipidated apolipoprotein B is transported to the Golgi as an incompletely folded intermediate as probed by its association with network of endoplasmic reticulum molecular chaperones, GRP94, ERp72, BiP, calreticulin, and cyclophilin B. *J Biol Chem* 2003; 278: 7459-7468.
- (289) Jorgensen MM, Jensen ON, Holst HU, et al. Grp78 is involved in retention of mutant low density lipoprotein receptor protein in the endoplasmic reticulum. *J Biol Chem* 2000; 275: 33861-33868.
- (290) Triantafilou M, Fradelizi D, Triantafilou K. Major histocompatibility class one molecule associates with glucose regulated protein (GRP) 78 on the cell surface. *Hum Immunol* 2001; 62: 764-770.
- (291) Hendershot LM. The ER chaperone BiP is a master regulator of ER function. *Mt Sinai J Med* 2004; 71: 289-297.
- (292) Ni M, Lee AS. ER chaperones in mammalian development and human diseases. *FEBS Lett* 2007; 581: 3641-3651.
- (293) Lee AS. The glucose-regulated proteins: stress induction and clinical applications. *Trends Biochem Sci* 2001; 26: 504-510.
- (294) Schroder M, Kaufman RJ. The mammalian unfolded protein response. *Annu Rev Biochem* 2005; 74: 739-789.

- (295) Lievremont JP, Rizzuto R, Hendershot L, Meldolesi J. BiP, a major chaperone protein of the endoplasmic reticulum lumen, plays a direct and important role in the storage of the rapidly exchanging pool of Ca²⁺. *J Biol Chem* 1997; 272: 30873-30879.
- (296) Liu H, Bowes RC, 3rd, van de Water B, Sillence C, Nagelkerke JF, Stevens JL. Endoplasmic reticulum chaperones GRP78 and calreticulin prevent oxidative stress, Ca²⁺ disturbances, and cell death in renal epithelial cells. *J Biol Chem* 1997; 272: 21751-21759.
- (297) Fu Y, Li J, Lee AS. GRP78/BiP inhibits endoplasmic reticulum BIK and protects human breast cancer cells against estrogen starvation-induced apoptosis. *Cancer Res* 2007; 67: 3734-3740.
- (298) Beere HM, Wolf BB, Cain K, et al. Heat-shock protein 70 inhibits apoptosis by preventing recruitment of procaspase-9 to the Apaf-1 apoptosome. *Nat Cell Biol* 2000; 2: 469-475.
- (299) Rao RV, Peel A, Logvinova A, et al. Coupling endoplasmic reticulum stress to the cell death program: role of the ER chaperone GRP78. *FEBS Lett* 2002; 514: 122-128.
- (300) Reddy RK, Mao C, Baumeister P, Austin RC, Kaufman RJ, Lee AS. Endoplasmic reticulum chaperone protein GRP78 protects cells from apoptosis induced by topoisomerase inhibitors: role of ATP binding site in suppression of caspase-7 activation. *J Biol Chem* 2003; 278: 20915-20924.
- (301) Delpino A, Castelli M. The 78 kDa glucose-regulated protein (GRP78/BIP) is expressed on the cell membrane, is released into cell culture medium and is also present in human peripheral circulation. *Biosci Rep* 2002; 22: 407-420.
- (302) Xiao G, Chung TF, Pyun HY, Fine RE, Johnson RJ. KDEL proteins are found on the surface of NG108-15 cells. *Brain Res Mol Brain Res* 1999; 72: 121-128.
- (303) Jindadamrongwech S, Thepparit C, Smith DR. Identification of GRP 78 (BiP) as a liver cell expressed receptor element for dengue virus serotype 2. *Arch Virol* 2004; 149: 915-927.
- (304) Misra UK, Deedwania R, Pizzo SV. Activation and cross-talk between Akt, NF-kappaB, and unfolded protein response signaling in 1-LN prostate cancer cells consequent to ligation of cell surface-associated GRP78. *J Biol Chem* 2006; 281: 13694-13707.
- (305) Feldman DE, Chauhan V, Koong AC. The unfolded protein response: a novel component of the hypoxic stress response in tumors. *Mol Cancer Res* 2005; 3: 597-605.
- (306) Koumenis C. ER stress, hypoxia tolerance and tumor progression. *Curr Mol Med* 2006; 6: 55-69.
- (307) Ramsay RG, Ciznadija D, Mantamadiotis T, Anderson R, Pearson R. Expression of stress response protein glucose regulated protein-78 mediated by c-Myb. *Int J Biochem Cell Biol* 2005; 37: 1254-1268.
- (308) Baumeister P, Luo S, Skarnes WC, et al. Endoplasmic reticulum stress induction of the Grp78/BiP promoter: activating mechanisms mediated by YY1 and its interactive chromatin modifiers. *Mol Cell Biol* 2005; 25: 4529-4540.
- (309) Koomagi R, Mattern J, Volm M. Glucose-related protein (GRP78) and its relationship to the drug-resistance proteins P170, GST-pi, LRP56 and angiogenesis in non-small cell lung carcinomas. *Anticancer Res* 1999; 19: 4333-4336.
- (310) Uramoto H, Sugio K, Oyama T, et al. Expression of endoplasmic reticulum molecular chaperone Grp78 in human lung cancer and its clinical significance. *Lung Cancer* 2005; 49: 55-62.

- (311) Song MS, Park YK, Lee JH, Park K. Induction of glucose-regulated protein 78 by chronic hypoxia in human gastric tumor cells through a protein kinase C-epsilon/ERK/AP-1 signaling cascade. *Cancer Res* 2001; 61: 8322-8330.
- (312) Zhang J, Jiang Y, Jia Z, et al. Association of elevated GRP78 expression with increased lymph node metastasis and poor prognosis in patients with gastric cancer. *Clin Exp Metastasis* 2006; 23: 401-410.
- (313) Fernandez PM, Tabbara SO, Jacobs LK, et al. Overexpression of the glucose-regulated stress gene GRP78 in malignant but not benign human breast lesions. *Breast Cancer Res Treat* 2000; 59: 15-26.
- (314) Gazit G, Lu J, Lee AS. De-regulation of GRP stress protein expression in human breast cancer cell lines. *Breast Cancer Res Treat* 1999; 54: 135-146.
- (315) Lee E, Nichols P, Spicer D, Groshen S, Yu MC, Lee AS. GRP78 as a Novel Predictor of Responsiveness to Chemotherapy in Breast Cancer. *Cancer Res* 2006; 66: 7849-7853.
- (316) Shuda M, Kondoh N, Imazeki N, et al. Activation of the ATF6, XBP1 and grp78 genes in human hepatocellular carcinoma: a possible involvement of the ER stress pathway in hepatocarcinogenesis. *J Hepatol* 2003; 38: 605-614.
- (317) Lim SO, Park SG, Yoo JH, et al. Expression of heat shock proteins (HSP27, HSP60, HSP70, HSP90, GRP78, GRP94) in hepatitis B virus-related hepatocellular carcinomas and dysplastic nodules. *World J Gastroenterol* 2005; 11: 2072-2079.
- (318) Arap MA, Lahdenranta J, Mintz PJ, et al. Cell surface expression of the stress response chaperone GRP78 enables tumor targeting by circulating ligands. *Cancer Cell* 2004; 6: 275-284.
- (319) Pootrakul L, Datar RH, Shi SR, et al. Expression of stress response protein Grp78 is associated with the development of castration-resistant prostate cancer. *Clin Cancer Res* 2006; 12: 5987-5993.
- (320) Daneshmand S, Quek ML, Lin E, et al. Glucose-regulated protein GRP78 is up-regulated in prostate cancer and correlates with recurrence and survival. *Hum Pathol* 2007; 38: 1547-1552.
- (321) Misra UK, Deedwania R, Pizzo SV. Binding of activated alpha2-macroglobulin to its cell surface receptor GRP78 in 1-LN prostate cancer cells regulates PAK-2-dependent activation of LIMK. *J Biol Chem* 2005; 280: 26278-26286.
- (322) Dong D, Ko B, Baumeister P, et al. Vascular targeting and antiangiogenesis agents induce drug resistance effector GRP78 within the tumor microenvironment. *Cancer Res* 2005; 65: 5785-5791.
- (323) Gonzalez-Gronow M, Cuchacovich M, Llanos C, Urzua C, Gawdi G, Pizzo SV. Prostate cancer cell proliferation in vitro is modulated by antibodies against glucose-regulated protein 78 isolated from patient serum. *Cancer Res* 2006; 66: 11424-11431.
- (324) Mintz PJ, Kim J, Do KA, et al. Fingerprinting the circulating repertoire of antibodies from cancer patients. *Nat Biotechnol* 2003; 21: 57-63.
- (325) Tsutsumi S, Gotoh T, Tomisato W, et al. Endoplasmic reticulum stress response is involved in nonsteroidal anti-inflammatory drug-induced apoptosis. *Cell Death Differ* 2004; 11: 1009-1016.
- (326) Tsutsumi S, Namba T, Tanaka KI, et al. Celecoxib upregulates endoplasmic reticulum chaperones that inhibit celecoxib-induced apoptosis in human gastric cells. *Oncogene* 2006; 25: 1018-1029.

- (327) Wu Y, Zhang H, Dong Y, Park YM, Ip C. Endoplasmic reticulum stress signal mediators are targets of selenium action. *Cancer Res* 2005; 65: 9073-9079.
- (328) Zu K, Bihani T, Lin A, Park YM, Mori K, Ip C. Enhanced selenium effect on growth arrest by BiP/GRP78 knockdown in p53-null human prostate cancer cells. *Oncogene* 2006; 25: 546-554.
- (329) Zhou Y, Lee AS. Mechanism for the suppression of the mammalian stress response by genistein, an anticancer phytoestrogen from soy. *J Natl Cancer Inst* 1998; 90: 381-388.
- (330) Ermakova SP, Kang BS, Choi BY, et al. (-)-Epigallocatechin gallate overcomes resistance to etoposide-induced cell death by targeting the molecular chaperone glucose-regulated protein 78. *Cancer Res* 2006; 66: 9260-9269.
- (331) Deng WG, Ruan KH, Du M, Saunders MA, Wu KK. Aspirin and salicylate bind to immunoglobulin heavy chain binding protein (BiP) and inhibit its ATPase activity in human fibroblasts. *Faseb J* 2001; 15: 2463-2470.
- (332) Montecucco C, Molinari M. Microbiology: death of a chaperone. *Nature* 2006; 443: 511-512.
- (333) Paton AW, Beddoe T, Thorpe CM, et al. AB5 subtilase cytotoxin inactivates the endoplasmic reticulum chaperone BiP. *Nature* 2006; 443: 548-552.
- (334) Dent P, Yacoub A, Grant S, Curiel DT, Fisher PB. MDA-7/IL-24 regulates proliferation, invasion and tumor cell radiosensitivity: a new cancer therapy? *J Cell Biochem* 2005; 95: 712-719.
- (335) Kim Y, Lillo AM, Steiniger SC, et al. Targeting heat shock proteins on cancer cells: selection, characterization, and cell-penetrating properties of a peptidic GRP78 ligand. *Biochemistry* 2006; 45: 9434-9444.
- (336) Muchowski PJ, Wacker JL. Modulation of neurodegeneration by molecular chaperones. *Nat Rev Neurosci* 2005; 6: 11-22.
- (337) Rao RV, Bredesen DE. Misfolded proteins, endoplasmic reticulum stress and neurodegeneration. *Curr Opin Cell Biol* 2004; 16: 653-662.
- (338) Hoozemans JJ, Veerhuis R, Van Haastert ES, et al. The unfolded protein response is activated in Alzheimer's disease. *Acta Neuropathol* 2005; 110: 165-172.
- (339) Yu Z, Luo H, Fu W, Mattson MP. The endoplasmic reticulum stress-responsive protein GRP78 protects neurons against excitotoxicity and apoptosis: suppression of oxidative stress and stabilization of calcium homeostasis. *Exp Neurol* 1999; 155: 302-314.
- (340) Hoshino T, Nakaya T, Araki W, Suzuki K, Suzuki T, Mizushima T. Endoplasmic reticulum chaperones inhibit the production of amyloid-beta peptides. *Biochem J* 2007; 402: 581-589.
- (341) Misra UK, Gonzalez-Gronow M, Gawdi G, Pizzo SV. Up-regulation of the alpha2-macroglobulin signaling receptor on rheumatoid synovial fibroblasts. *J Biol Chem* 1997; 272: 497-502.
- (342) Watson LM, Chan AK, Berry LR, et al. Overexpression of the 78-kDa glucose-regulated protein/immunoglobulin-binding protein (GRP78/BiP) inhibits tissue factor procoagulant activity. *J Biol Chem* 2003; 278: 17438-17447.
- (343) den Heijer M, Koster T, Blom HJ, et al. Hyperhomocysteinemia as a risk factor for deep-vein thrombosis. *N Engl J Med* 1996; 334: 759-762.
- (344) Ross R. Atherosclerosis--an inflammatory disease. *N Engl J Med* 1999; 340: 115-126.

- (345) Kokame K, Kato H, Miyata T. Homocysteine-respondent genes in vascular endothelial cells identified by differential display analysis. GRP78/BiP and novel genes. *J Biol Chem* 1996; 271: 29659-29665.
- (346) Zhou J, Lhotak S, Hilditch BA, Austin RC. Activation of the unfolded protein response occurs at all stages of atherosclerotic lesion development in apolipoprotein E-deficient mice. *Circulation* 2005; 111: 1814-1821.
- (347) Srivastava PK. Heat shock protein-based novel immunotherapies. *Drug News Perspect* 2000; 13: 517-522.
- (348) Basu S, Matsutake T. Heat shock protein-antigen presenting cell interactions. *Methods* 2004; 32: 38-41.
- (349) Nicchitta CV, Carrick DM, Baker-Lepain JC. The messenger and the message: gp96 (GRP94)-peptide interactions in cellular immunity. *Cell Stress Chaperones* 2004; 9: 325-331.
- (350) Asea A, Kraeft SK, Kurt-Jones EA, et al. HSP70 stimulates cytokine production through a CD14-dependant pathway, demonstrating its dual role as a chaperone and cytokine. *Nat Med* 2000; 6: 435-442.
- (351) Kakimura J, Kitamura Y, Taniguchi T, Shimohama S, Gebicke-Haerter PJ. Bip/GRP78-induced production of cytokines and uptake of amyloid-beta(1-42) peptide in microglia. *Biochem Biophys Res Commun* 2001; 281: 6-10.
- (352) Dello Sbarba P, Rovida E. Transmodulation of cell surface regulatory molecules via ectodomain shedding. *Biol Chem* 2002; 383: 69-83.
- (353) Nagase H, Woessner JF, Jr. Matrix metalloproteinases. *J Biol Chem* 1999; 274: 21491-21494.
- (354) Liu Y, Steiniger SC, Kim Y, Kaufmann GF, Felding-Habermann B, Janda KD. Mechanistic studies of a peptidic GRP78 ligand for cancer cell-specific drug delivery. *Mol Pharm* 2007; 4: 435-447.
- (355) Theriault JR, Adachi H, Calderwood SK. Role of scavenger receptors in the binding and internalization of heat shock protein 70. *J Immunol* 2006; 177: 8604-8611.
- (356) Salvayre R, Auge N, Benoist H, Negre-Salvayre A. Oxidized low-density lipoprotein-induced apoptosis. *Biochim Biophys Acta* 2002; 1585: 213-221.
- (357) Flood C, Gustafsson M, Pitas RE, Arnaboldi L, Walzem RL, Boren J. Molecular mechanism for changes in proteoglycan binding on compositional changes of the core and the surface of low-density lipoprotein-containing human apolipoprotein B100. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2004; 24: 564-570.
- (358) Dimmeler S, Haendeler J, Galle J, Zeiher AM. Oxidized low-density lipoprotein induces apoptosis of human endothelial cells by activation of CPP32-like proteases. A mechanistic clue to the 'response to injury' hypothesis. *Circulation* 1997; 95: 1760-1763.
- (359) Escargueil-Blanc I, Salvayre R, Negre-Salvayre A. Necrosis and apoptosis induced by oxidized low density lipoproteins occur through two calcium-dependent pathways in lymphoblastoid cells. *Faseb J* 1994; 8: 1075-1080.
- (360) Okura Y, Brink M, Itabe H, Scheidegger KJ, Kalangos A, Delafontaine P. Oxidized low-density lipoprotein is associated with apoptosis of vascular smooth muscle cells in human atherosclerotic plaques. *Circulation* 2000; 102: 2680-2686.

- (361) Hardwick SJ, Hegyi L, Clare K, et al. Apoptosis in human monocyte-macrophages exposed to oxidized low density lipoprotein. *J Pathol* 1996; 179: 294-302.
- (362) Panini SR, Sinensky MS. Mechanisms of oxysterol-induced apoptosis. *Curr Opin Lipidol* 2001; 12: 529-533.
- (363) Wintergerst ES, Jelk J, Rahner C, Asmis R. Apoptosis induced by oxidized low density lipoprotein in human monocyte-derived macrophages involves CD36 and activation of caspase-3. *Eur J Biochem* 2000; 267: 6050-6059.
- (364) Napoli C, Quehenberger O, De Nigris F, Abete P, Glass CK, Palinski W. Mildly oxidized low density lipoprotein activates multiple apoptotic signaling pathways in human coronary cells. *Faseb J* 2000; 14: 1996-2007.
- (365) Wu YL, Jiang XR, Newland AC, Kelsey SM. Failure to activate cytosolic phospholipase A2 causes TNF resistance in human leukemic cells. *J Immunol* 1998; 160: 5929-5935.
- (366) Akiba S, Yoneda Y, Ohno S, Nemoto M, Sato T. Oxidized LDL activates phospholipase A2 to supply fatty acids required for cholesterol esterification. *J Lipid Res* 2003; 44: 1676-1685.
- (367) Vieira O, Escargueil-Blanc I, Jurgens G, et al. Oxidized LDLs alter the activity of the ubiquitin-proteasome pathway: potential role in oxidized LDL-induced apoptosis. *Faseb J* 2000; 14: 532-542.
- (368) Li W, Yuan XM, Olsson AG, Brunk UT. Uptake of oxidized LDL by macrophages results in partial lysosomal enzyme inactivation and relocation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1998; 18: 177-184.
- (369) Jessup W, Kritharides L. Metabolism of oxidized LDL by macrophages. *Curr Opin Lipidol* 2000; 11: 473-481.
- (370) Li W, Yuan XM, Brunk UT. OxLDL-induced macrophage cytotoxicity is mediated by lysosomal rupture and modified by intralysosomal redox-active iron. *Free Radic Res* 1998; 29: 389-398.
- (371) Fossel ET, Zanella CL, Fletcher JG, Hui KK. Cell death induced by peroxidized low-density lipoprotein: endopepsis. *Cancer Res* 1994; 54: 1240-1248.
- (372) Schett G, Steiner CW, Groger M, et al. Activation of Fas inhibits heat-induced activation of HSF1 and up-regulation of hsp70. *Faseb J* 1999; 13: 833-842.
- (373) Di Sano F, Ferraro E, Tufi R, Achsel T, Piacentini M, Cecconi F. Endoplasmic Reticulum Stress Induces Apoptosis by an Apoptosome-dependent but Caspase 12-independent Mechanism. *J Biol Chem* 2006; 281: 2693-2700.
- (374) Morris JA, Dorner AJ, Edwards CA, Hendershot LM, Kaufman RJ. Immunoglobulin binding protein (BiP) function is required to protect cells from endoplasmic reticulum stress but is not required for the secretion of selective proteins. *J Biol Chem* 1997; 272: 4327-4334.