

# Identifizierung und Charakterisierung des BARB-4 Antigens



**Dissertation**

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

vorgelegt von

Nicole Schatz  
aus Radolfzell am Bodensee

Würzburg 2010



Eingereicht bei der Fakultät für Chemie und Pharmazie am:.....

Gutachter der schriftlichen Arbeit

1. Gutachter:.....

2. Gutachter:.....

Prüfer des öffentlichen Promotionskolloquiums

1. Prüfer:.....

2. Prüfer:.....

3. Prüfer:.....

Datum des öffentlichen Promotionskolloquiums:.....

Doktorurkunde ausgehändigt am:.....



*Meiner Familie*



---

## Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung</b>	<b>1</b>
1.1	Krebserkrankung des Menschen	1
1.2	Karzinogenese	2
1.3	Innate Immunität des Menschen	4
1.4	Tumorthherapie	6
1.5	Monoklonale Antikörper in der Tumorthherapie	7
1.5.1	Murine Antikörper	11
1.5.2	Chimäre und humanisierte Antikörper	13
1.5.3	Humane Antikörper	15
1.6	Humane Hybridomatechnologie	17
1.7	Natürliche Antikörper	19
1.7.1	Antikörper SC-1	21
1.7.2	Antikörper PAM-1	23
1.7.3	Antikörper SAM-6	24
1.7.4	Antikörper BARB-4	25
1.8	Ziel der Arbeit	26
<b>2</b>	<b>Material und Methoden</b>	<b>27</b>
2.1	Materialien	27
2.1.1	Verbrauchsmaterialien	27
2.1.2	Medien, Puffer, Lösungen	32
2.1.3	Geräte	39
2.1.4	Soft- und Hardware	40
2.1.5	Zelllinien	41
2.2	Zellkultur	42
2.2.1	Kultivierung von Karzinom- und Melanomzelllinien	42
2.2.2	Kultivierung von BARB-4 produzierenden Hybridomzellen	43
2.2.3	Kultivierung von Escherichia coli Bakterien	43
2.2.4	Kryokonservierung eukaryontischer Zellen	44
2.2.5	Einfrieren von Escherichia coli Bakterien	44
2.2.6	Auftauen eukaryontischer Zellen	44
2.2.7	Auftauen von Escherichia coli Bakterien	45

---

2.2.8	Zellzahlbestimmung .....	45
2.3	Zellbiologische Methoden.....	45
2.3.1	Ernten der Karzinomzellen für die Membranpräparation .....	45
2.3.2	Isolierung von Lymphozyten aus humanem Frischblut .....	46
2.3.3	Transfektion von Tumorzellen mit siRNA .....	47
2.3.4	MTT-Proliferationstest.....	49
2.3.5	Cell Death Detection ELISA <sup>PLUS</sup> Apoptosetest.....	50
2.3.6	Untersuchung der Tumorzelladhäsion unter Antikörpereinwirkung .....	51
2.3.7	Untersuchung der Tumorzellmotilität unter Antikörpereinwirkung .....	52
2.4	Immunhistochemische Methoden.....	52
2.4.1	Herstellung von Zytospinpräparaten .....	52
2.4.2	Herstellung von Paraffinschnitten.....	53
2.4.3	Immunperoxidasefärbung.....	53
2.4.3.1	Biotinylierung des BARB-4 Antikörpers .....	53
2.4.3.2	Immunperoxidasefärbung von Zytospinpräparaten .....	54
2.4.3.3	Immunperoxidasefärbung von Paraffinschnitten .....	55
2.5	Biochemische Methoden .....	57
2.5.1	Membranproteinpräparation von Karzinomzellen .....	57
2.5.2	Quantitative Bestimmung von Proteinen .....	58
2.5.3	Aufkonzentrierung von Proteinen .....	59
2.5.4	Sodiumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) .....	59
2.5.5	Coomassie-Färbung.....	60
2.5.6	Western Blot-Analysen.....	60
2.5.7	Immundetektion von Proteinen auf Nitrozellulosemembran .....	61
2.5.8	Aufreinigung von Proteinen .....	62
2.5.8.1	Aufreinigung des BARB-4 Antikörpers .....	62
2.5.8.2	Aufreinigung des BARB-4 Antigens .....	63
2.5.9	Massenspektrometrische Analyse von Proteinen.....	64
2.5.10	Enzymatischer Verdau des BARB-4 Antigens.....	65
2.6	Molekularbiologische Methoden.....	66
2.6.1	Isolierung von Gesamt-RNA.....	66
2.6.1.1	RNA-Isolierung aus Tumorzellen .....	66
2.6.1.2	RNA-Isolierung aus Geweben.....	67
2.6.2	Konzentrations- und Reinheitsbestimmung von Nukleinsäuren .....	67

---



---

2.6.3	Reverse Transkription von mRNA in cDNA.....	68
2.6.3.1	cDNA Synthese für die semiquantitative PCR.....	68
2.6.3.2	cDNA Synthese für die Sequenzanalyse.....	68
2.6.4	Polymerasekettenreaktion.....	69
2.6.4.1	Semiquantitative PCR mit GAPDH.....	70
2.6.4.2	PCR für die TAF15 Sequenzierung.....	70
2.6.5	Agarosegelelektrophorese.....	71
2.6.6	Aufreinigung von PCR-Produkten für die Klonierung.....	71
2.6.7	Anhängen des Adenosintriphosphatnukleotids am 3' Ende.....	72
2.6.8	Klonierung von PCR-Produkten mittels pEXP5-CT/TOPO Vektor.....	72
2.6.9	Transformation kompetenter Escherichia coli Bakterien.....	73
2.6.10	Isolierung des Expressionsvektors aus Escherichia coli.....	73
2.6.11	Restriktionsverdau des Expressionsvektors.....	74
2.6.12	DNA-Sequenzierung.....	74
2.7	Immunfluoreszenz.....	75
2.7.1	Durchflusszytometrie (FACS-Analyse).....	75
2.7.1.1	Messung und Auswertung der Fluoreszenz.....	76
2.7.1.2	Nachweis der Antigenexpression auf der Zelloberfläche.....	77
2.7.1.3	Nachweis von intrazellulärem Antigen.....	78
2.7.2	Fluoreszenzmikroskopie.....	79
2.7.2.1	Fluoreszenzmarkierung von Antikörpern.....	80
2.7.2.2	Endozytose fluoreszenzmarkierter Antikörper.....	81
2.7.2.3	Simultaninkubation von BARB-4 und Anti-TAF15 Antikörper.....	81
<b>3</b>	<b>Ergebnisse.....</b>	<b>83</b>
3.1	Charakterisierung des BARB-4 Antikörpers.....	83
3.1.1	Tumorspezifität des BARB-4 Antikörpers.....	84
3.1.1.1	Immunhistochemische Färbung auf Tumorgeweben.....	85
3.1.1.2	Immunhistochemische Färbung auf Normalgewebe.....	87
3.1.1.3	Resultat der immunhistochemischen Untersuchungen.....	89
3.1.2	Funktionelle Analysen des BARB-4 Antikörpers.....	89
3.1.2.1	Hemmung der Zellproliferation.....	90
3.1.2.2	Induktion von Apoptose.....	91
3.1.2.3	Hemmung der Tumorzelladhäsion.....	92

---

3.1.2.4	Hemmung der Tumorzellmotilität .....	93
3.1.3	Expression des BARB-4 Antigens .....	94
3.1.3.1	FACS-Analysen auf Tumorzellen .....	94
3.1.3.2	Endozytose des BARB-4 Antikörpers.....	95
3.2	Isolierung und Identifizierung des BARB-4 Antigens .....	96
3.2.1	Western Blot-Analyse auf Membranextrakten von Tumorzellen.....	96
3.2.2	Chromatographische Aufreinigung des BARB-4 Antigens .....	98
3.2.3	Identifizierung des BARB-4 Antigens .....	101
3.3	Validierung des BARB-4 Targets .....	103
3.3.1	Western Blot-Analysen mit Anti-TAF15 und BARB-4 Antikörper.....	104
3.3.2	FACS-Analysen mit Anti-TAF15 und BARB-4 Antikörper.....	105
3.3.3	Effekt der TAF15 Proteinregression auf die BARB-4 Antikörperbindung .	106
3.4	Überexpression von TAF15.....	111
3.4.1	Nachweis der Überexpression in Tumorgewebe auf mRNA-Ebene.....	111
3.4.2	Nachweis der Überexpression in Tumorzellen auf Proteinebene .....	111
3.5	Vergleich des BARB-4 Antigens mit dem TAF15 Wildtyp.....	113
3.5.1	Vergleich des BARB-4 und Anti-TAF15 Antikörperepitops.....	113
3.5.2	Lokalisation des BARB-4 Antigens und des TAF15-Wildtyps.....	114
3.5.2.1	Vergleich von FACS-Analysen auf Tumorzellen und gesunden Zellen	114
3.5.2.2	Koexpression des BARB-4 Antigens mit dem TAF15-Wildtyp.....	116
3.5.3	Sequenzvergleich der TAF15 cDNA aus Tumorzellen mit dem Wildtyp...	118
3.5.4	Analyse von TAF15 <sup>BARB-4</sup> auf posttranslationale Glykosilierung .....	119
3.5.5	Das potentielle BARB-4 Target .....	121
<b>4</b>	<b>Diskussion .....</b>	<b>125</b>
4.1	Der Antikörper BARB-4 .....	125
4.1.1	Eigenschaften und Funktionen des BARB-4 Antikörpers .....	125
4.1.2	Der natürliche IgG Antikörper BARB-4 .....	126
4.2	Innate Immunität des Menschen .....	127
4.2.1	Bedeutung und Funktionalität der innaten Immunabwehr .....	128
4.2.2	Zelluläre und humorale Komponenten der innaten Immunabwehr .....	130
4.3	Immunogenität transformierter Zellen.....	131
4.4	Charakteristische Eigenschaften natürlicher Antikörper .....	132
4.5	IgG Antikörper .....	133

---

---

4.5.1	Struktur und Subklassen der IgG Antikörper .....	133
4.5.2	Rolle der IgG Antikörper in der Immunabwehr .....	135
4.5.3	Natürliche, tumorspezifische IgG und IgM Antikörper im Vergleich.....	137
4.5.3.1	Genetik natürlicher Antikörper.....	137
4.5.3.2	Funktionalität natürlicher Antikörper.....	138
4.5.3.3	Epitope natürlicher Antikörper .....	140
4.5.3.4	Fazit des Vergleichs .....	141
4.6	TAF15 .....	142
4.6.1	Strukturelle Eigenschaften des TAF15 Wildtyps .....	142
4.6.2	Funktionelle Eigenschaften des TAF15 Wildtyps .....	144
4.6.3	Lokalisation des TAF15 Wildtyps .....	145
4.6.4	Translokation von TAF15 auf die Zelloberfläche .....	146
4.6.5	Lokalisation von TAF15 in Tumorzellen .....	148
4.6.6	Rolle von TAF15 in Tumorzellen .....	149
4.6.6.1	Expression von TAF15 Fusionsproteinen in Tumoren.....	150
4.6.6.2	N-terminale TAF15 Domäne als Transkriptionsverstärker.....	151
4.6.6.3	Überexpression von TAF15 in Tumorzellen .....	152
4.6.6.4	Involvierung des TAF15 Proteins in die Apoptose.....	153
4.6.6.5	Rolle von TAF15 in der Zelladhäsion und der Zellbeweglichkeit .....	155
4.6.7	Modifikationen von TAF15.....	157
4.6.8	Bedeutung des BARB-4 Antikörpers und des TAF15 <sup>BARB-4</sup> Antigens .....	159
<b>5</b>	<b>Zusammenfassung.....</b>	<b>163</b>
<b>6</b>	<b>Summary .....</b>	<b>165</b>
<b>7</b>	<b>Abkürzungsverzeichnis .....</b>	<b>167</b>
<b>8</b>	<b>Literaturverzeichnis .....</b>	<b>173</b>



# 1 Einleitung

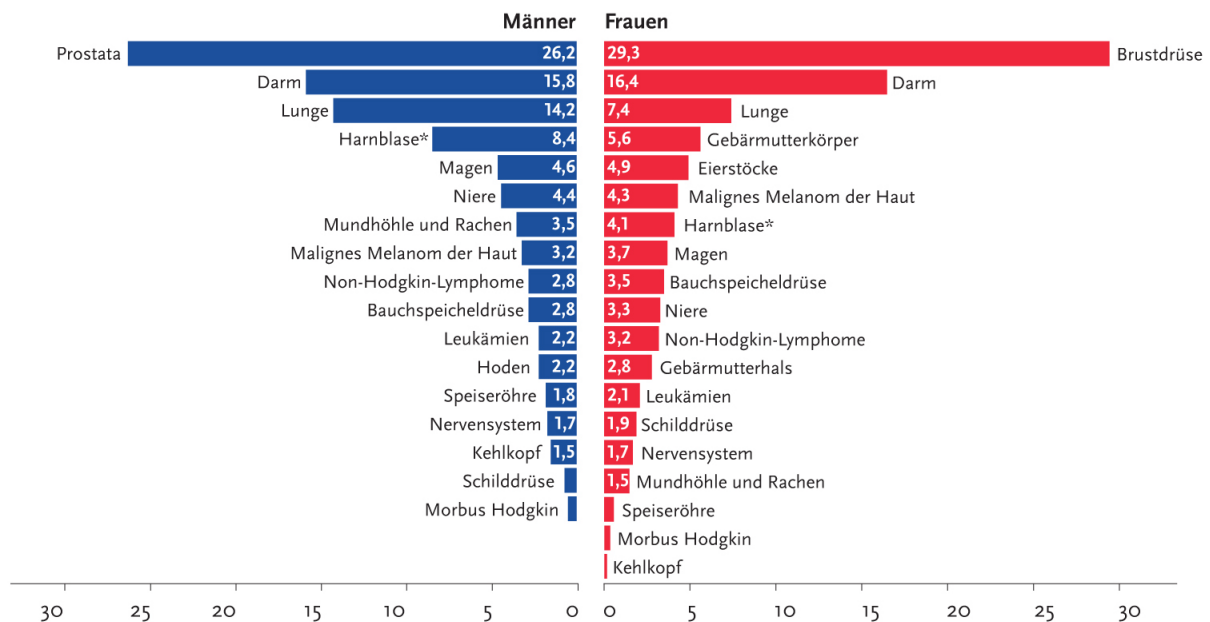
## 1.1 Krebserkrankung des Menschen

Krebs ist nach den Herz-Kreislauf-erkrankungen weltweit die zweithäufigste Todesursache [1]. Dies liegt vor allem an der hohen Todesrate der betroffenen Personen. Jährlich erkranken etwa 11 Mio. Menschen neu an Krebs, von denen mehr als 6 Mio. sterben [2]. Allein in Deutschland sind im Jahr 2010 schätzungsweise 450.000 Neuerkrankungen zu erwarten [3]. Neben dem Alter, welches eine erhebliche Rolle bei dieser Erkrankung spielt, gibt es eine Vielzahl weiterer Risikofaktoren, die die Entstehung von Krebs fördern. Hierzu zählen unter anderem physikalische Noxen wie ultraviolette und ionisierende Strahlung, chemische Noxen wie Asbest und Tabakrauch sowie biologische Noxen. Bei der letztgenannten Schadstoffgruppe handelt es sich um infektiöses Material wie bestimmte Viren (z.B. Hepatitis B Virus oder humanes Papilloma Virus (HPV)), Bakterien (z.B. *Helicobacter pylori*) oder Parasiten (z.B. Schistosomen) [3-7]. Neben den exogenen Risikofaktoren spielt auch die familiäre Disposition eine wesentliche Rolle für die Krebsentstehung [7-8].

Prinzipiell kann bei einer Krebserkrankung jedes Organ befallen werden. Die Häufigkeit, mit der ein entsprechendes Organ erkrankt, ist dabei jedoch abhängig von Alter, Geschlecht, der geographischen Region, bestimmten Ernährungsgewohnheiten und ähnlichen Faktoren. So erkranken beispielsweise Männer häufig an einem Lungen- oder Prostatakarzinom, während Frauen vor allem an Brustkrebs erkranken [2-3, 9]. Abbildung 1 zeigt hierzu eine Krebsstatistik für die Bundesrepublik Deutschland.

Der Verlauf einer solchen Erkrankung unterliegt hierbei keinen pauschalen Regeln, da sich der Krebs in unterschiedlichen Krankheitsbildern und Ausprägungen äußert. Es existieren über 100 verschiedene Arten von Krebserkrankungen, die sich zum Teil stark in ihren Behandlungsmöglichkeiten, ihrer Neigung zur Metastasierung und ihren Überlebenschancen unterscheiden. Es kann daher keine generelle Aussage über die Lebenserwartung oder die Heilungschancen getroffen werden [10]. Durch präventive Maßnahmen und eine frühe Erkennung des Krebses können diese jedoch, abhängig von der Krebsart, dem Alter des Patienten und dem Diagnosezeitpunkt, erheblich verbessert werden.

Trotzdem besteht weiterhin ein Bedarf an innovativen und effektiven Behandlungsmethoden, welche sich durch bestmögliche Wirksamkeit bei geringer Toxizität auszeichnen.



\*einschließlich bösartiger Neubildungen in situ und Neubildungen unsicheren Verhaltens

**Abbildung 1: Prozentualer Anteil ausgewählter Tumorlokalisationen an allen Krebsneuerkrankungen in Deutschland.** Es wurde hierbei nach Geschlecht unterschieden. Nicht melanotischer Hautkrebs wurde nicht berücksichtigt. Die Abbildung beruht auf der Schätzung der Dachdokumentation Krebs des Robert Koch-Instituts [3].

## 1.2 Karzinogenese

Bei Krebs bzw. malignen (bösartigen) Tumoren handelt es sich um Gewebeneubildungen (Neoplasien), die unkontrolliert wachsen, sich teilen und in gesundes Gewebe eindringen und dieses zerstören können [7].

Nach heutiger Sicht der Wissenschaft entsteht Krebs in einem mehrstufigen Vorgang. Tumoren bilden sich hierbei aus einer einzelnen, gesunden Zelle, die durch die Anhäufung von irreversiblen genetischen Veränderungen zur Entstehung hochmaligner Zellabkömmlinge führen kann. Krebs ist also nicht die Folge eines einmaligen fehlerhaften Ereignisses in der Zelle, sondern von mehrfachen Modifikationen auf Genebene. Man spricht in diesem Zusammenhang deshalb auch von einer malignen Transformation [11].

Eine der plausibelsten Theorien zur Karzinogenese (Krebsentstehung) besagt, dass solche malignen Transformationen vor allem durch Defekte der sogenannten Protoonkogene und Tumorsuppressorgene verursacht werden. Normalerweise sind diese für den korrekten Ablauf des Zellzyklus verantwortlich. Hierbei kodieren die Protoonkogene Proteine, die einen fördernden Effekt auf das Zellwachstum und die Zellteilung haben, während die Tumorsuppressorgene Proteine kodieren, die diese Prozesse hemmen. Ihr Zusammenspiel in gesunden Zellen ist dabei stets ausgewogen. Gerät dieses Gleichgewicht ins Wanken, indem eine Mutation in einem dieser Regulatorgene auftritt, kann dies zu weiteren genetischen Veränderungen führen. Ist davon ein Apoptosegen (z.B. p53) betroffen, kann die Apoptose nicht mehr ausgelöst werden und die Zelle wird unsterblich. Durch weitere Mutationen der DNA kann die Zelle zusätzlich Eigenschaften ausbilden, die es ihr ermöglichen aus dem bestehenden Zellverband auszuwandern und in fremdes Gewebe einzudringen. Erst hierdurch erlangt der Krebs seine tödliche Potenz. Protoonkogene und Tumorsuppressorgene stellen deshalb ein Krebsrisiko auf genetischer Ebene dar, welches durch äußere Einflüsse verstärkt werden kann [12]. Bei diesen inneren Faktoren spielt die genetische Prädisposition eine wichtige Rolle.

Die Tumorentstehung kann aber auch durch exogene, kanzerogene Substanzen initiiert oder beschleunigt werden. Die Exposition mit solchen in der Umwelt befindlichen Noxen kann dazu führen, dass diese direkt mit der DNA interagieren und dabei ebenfalls Veränderungen in der Genexpression hervorgerufen werden können [13]. Krebszellen sind häufig aneuploid, was bedeutet, dass sie eine andere Anzahl an Chromosomen aufweisen [14]. Ob dies Ursache oder Folge der Erkrankung ist, ist Gegenstand der aktuellen Forschung. In diesem Zusammenhang gibt es auch eine Theorie die besagt, dass Krebs nicht oder nicht nur auf die Entstehung einzelner Genmutationen zurückzuführen ist, sondern auf die Veränderung des Chromosomensatzes [15].

Aufgrund der Vielzahl an Zellen sind Transformationen im menschlichen Organismus keine Seltenheit. Nicht jede maligne Zellveränderung führt jedoch automatisch zur Entstehung eines Tumors. Dies liegt vor allem daran, dass der Mensch ein Immunsystem besitzt, welches in der Lage ist, die Entwicklung von Tumoren zu verhindern. Besonders die innate Immunabwehr spielt für das Unterbinden einer Tumormanifestation eine entscheidende Rolle [16-17]. Die Funktionsweise dieses Systems wird nachfolgend näher erläutert.

### 1.3 Innate Immunität des Menschen

Der menschliche Organismus verfügt über ein komplexes Immunsystem, welches für die Erkennung und Beseitigung von Pathogenen und transformierten Körperzellen verantwortlich ist. Hierbei ist die Fähigkeit Fremdartiges von eigenen, gesunden Zellen zu unterscheiden von großer Bedeutung. Die menschliche Immunabwehr kann in zwei unterschiedliche Systeme unterteilt werden. Sie setzt sich aus der innaten (angeborenen bzw. primären) und der adaptiven (erworbenen bzw. sekundären) Immunität zusammen. Die innate Immunität basiert dabei auf einer bestimmten Anzahl an genetisch determinierten Rezeptoren, die keiner weiteren Reifung unterliegen und für die Erkennung nicht körpereigener (*non-self*) Strukturen verantwortlich sind. Im Gegensatz dazu weist die sekundäre Immunität aufgrund von Reifung und Mutation eine höhere Variabilität ihrer Rezeptoren auf [18-22]. Beide Abwehrsysteme setzen sich sowohl aus zellulären als auch aus humoralen Komponente zusammen.

Im Laufe der Evolution hat sich die angeborene Immunabwehr schon früh entwickelt und als sehr effizient erwiesen. Einfache Lebewesen wie Invertebraten besitzen ausschließlich eine primäre Immunität, während höher entwickelte, komplexere Organismen wie Vertebraten zusätzlich eine sekundäre Immunität besitzen [23-24]. Die angeborene Immunität bildet die initiale Verteidigung (*first line defense*) und bekämpft den Großteil an Infektionen, ohne dass der Organismus zuvor mit den Erregern in Kontakt gekommen ist. Hierbei werden Krankheitserreger wie Pilze, Viren, Bakterien sowie einzellige und mehrzellige Parasiten spezifisch und frühzeitig erkannt. Auch körpereigene, pathogen veränderte Zellen können so zeitig erkannt und eliminiert werden [25-30].

Zur zellulären, innaten Immunantwort gehören vor allem phagozytierende Zellen wie Makrophagen, NK-Zellen, dendritische Zellen, Mastzellen sowie bestimmte antikörperproduzierende B-Lymphozyten (CD5-positive B-Zellen) [31-32]. Diese Zellen erkennen dabei über keimbahnkodierte Rezeptoren keine einzelnen spezifischen Strukturen, sondern sogenannte pathogenassoziierte, molekulare Muster (*pathogen associated molecular pattern*, PAMP) auf der Zelloberfläche [33-35]. Einige Familien dieser Erkennungsrezeptoren (*pattern recognition receptors*, PRRs) konnten bisher identifiziert werden. Zu ihnen gehören unter anderem die Interleukin-1 und Drosophila Toll-ähnliche Rezeptoren (*drosophila toll-like receptors*,



TLRs). Diese sind für die Erkennung von Bakterien, Viren, Pilzen und Protozoen zuständig und kommen extrazellulär oder in Endosomen vor [36]. Die TLRs arbeiten synergetisch mit weiteren im Cytosol befindlichen Rezeptoren zusammen. Hierzu zählen die NOD-ähnlichen Rezeptoren (*nucleotid binding and oligomerization domain-like receptors*), welche zur Erkennung bakterieller Bestandteile dienen, die Lektin-Rezeptoren vom C-Typ (*C-type lectin receptors*, CLR), die Pilze erkennen können und die RIG-1-ähnlichen Rezeptoren (*retinoic acid inducible gene 1-like receptors*, RLRs), die für die Erkennung der viralen Ribonukleinsäuren zuständig sind [37]. Durch die Bindung an die konservativen Strukturen, welche meist aus Polysacchariden und Polynukleotiden bestehen, kommt es zur Induktion unterschiedlicher Signalkaskaden, die bis zur Aktivierung von Zytokinen und weiteren Immunzellen führt [38]. Da die keimbahnkodierten Rezeptoren verwandte Muster und keine spezifischen Strukturen erkennen, reicht eine geringe Anzahl an Rezeptoren und Erkennungsmotiven aus, um ein breites Spektrum pathogener Substanzen zuverlässig abzudecken.

PAMPs sind auch bei der Erkennung von Tumorzellen durch die innate Immunität von Bedeutung. Der menschliche Organismus unterliegt ständig der Transformation eigener Zellen, die wie bereits in Abschnitt 1.2 beschrieben zu Tumoren führen kann [12-13, 39]. Hierbei werden jedoch nicht nur zelluläre Eigenschaften wie Wachstum, Zellregulation und Zellkontakte verändert, sondern auch die äußere Erscheinungsform der betroffenen Zellen. Es werden modifizierte Strukturen (PAMPs) unabhängig vom ursprünglichen Mutationsereignis auf der Zelloberfläche exprimiert, die für das Überleben der entarteten Zelle Vorteile aufweisen. Genau diese Strukturen können jedoch vom Immunsystem erkannt und als körperfremd eingestuft werden, da sie sich von den Zellstrukturen normaler Zellen unterscheiden. Die meisten neoplastischen Zellen werden hierdurch bekämpft und das Heranwachsen von soliden Tumoren wird somit präventiv verhindert. Trotz vorangegangener Transformation tritt hierdurch meist kein manifester Tumor auf [16, 35, 40-42]. Um eine rasche Immunabwehr zu gewährleisten, verläuft die innate Immunität unabhängig von antigenpräsentierenden T-Zellen [33, 43].

Bereits in den 70er Jahren war bekannt, dass immunologische Vorgänge maßgeblich an der Abwehr und Bekämpfung von Tumoren beteiligt sind [44-46]. Trotz einiger Hinweise, die darauf hindeuten, dass das innate Immunsystem einen entscheidenden Beitrag zur Abwehr von Pathogenen und malignen Zellen leistet,

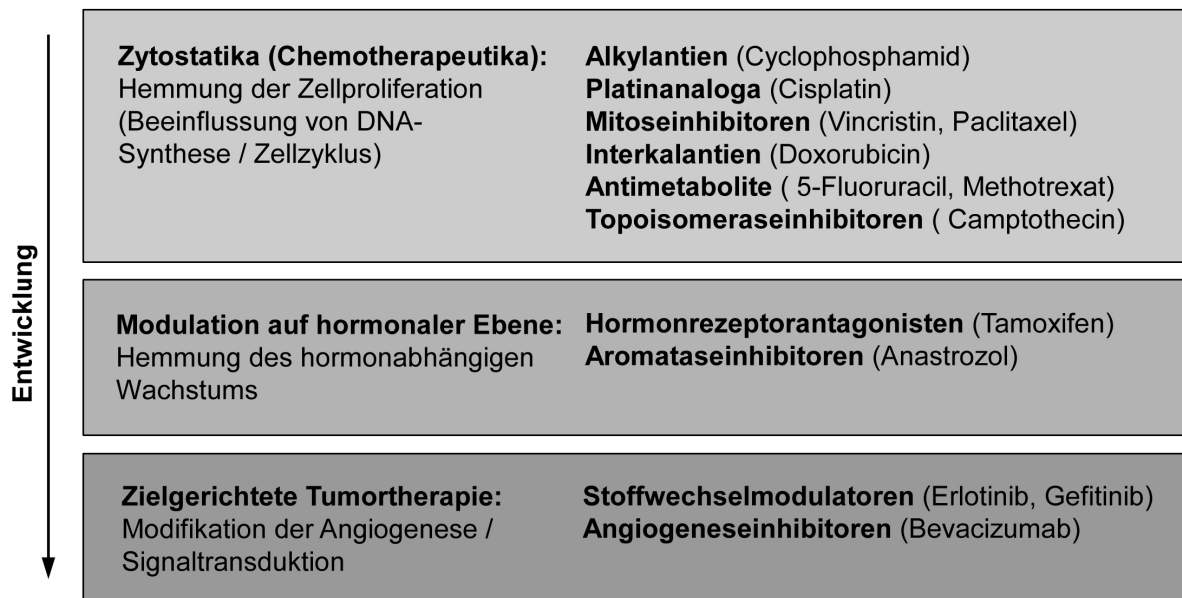
wurde die angeborene Immunität lange als unspezifisch deklariert. Aus immunologischer Sicht war sie sogar für autoreaktive Prozesse verantwortlich [35, 47]. Bis in die 90er Jahre wurde ausschließlich die erworbene Immunität für die Abwehr fremder Strukturen verantwortlich gemacht. Mittlerweile konnte diese Meinung widerlegt und die elementare Rolle der innten Immunabwehr wissenschaftlich bestätigt werden. Die innate Immunität ist nicht nur für die initiale Immunabwehr von pathogenen Eindringlingen und für die Erkennung und Elimination von Körperzellen nach den ersten Veränderungen zuständig, sondern induziert und stimuliert außerdem auch die adaptive Immunabwehr, welche im Bedarfsfall unterstützend bzw. verstärkend wirken kann [33, 48-55].

Trotz der hohen Effizienz dieses Systems, das meist die Entwicklung von soliden Tumoren verhindert, kann es immer wieder vereinzelt zu Neoplasien kommen. Die Therapie der Krebserkrankung ist nicht zuletzt wegen der hohen Todesrate bei Tumorpatienten von großem Interesse für Medizin und Wissenschaft.

## **1.4 Tumorthherapie**

Die klassischen Behandlungsformen von Krebserkrankungen stellen derzeit die chirurgische Tumorthherapie, die Strahlentherapie und die Chemotherapie dar. Für eine höhere Effizienz kommen meist Kombinationen aus den einzelnen Therapieformen zum Einsatz. Dieses sogenannte multimodale Therapieschema hängt dabei von mehreren Faktoren ab. Es spielen sowohl die Tumorart und -größe, die Lokalisation des Tumors, die Ausbreitung im Körper sowie der Allgemeinzustand des Patienten und dessen Alter eine große Rolle. Die Anwendung von Chemo- und Radiotherapeutika verursacht jedoch oft eine hohe toxische Schädigung des menschlichen Organismus [56]. Daher besteht ein ständiges Bestreben die vorhandenen Therapiemöglichkeiten zu verbessern. Dies führte über die Jahre hinweg zu optimierteren Operationstechniken sowie kontinuierlichen Fortschritten in Strahlen- und Chemotherapie. Neue Erkenntnisse in der Zell- und Molekularbiologie konnten dazu beitragen das Wirkstoffspektrum erheblich zu erweitern. Heutzutage existieren daher auch Krebstherapeutika, die zur sogenannten zielgerichteten Tumorthherapie (*targeted therapy*) zählen [57]. Sie binden spezifisch an ihre

Zielmoleküle (*targets*) und verändern hierdurch Zellprozesse, die an der Tumorentwicklung maßgeblich beteiligt sind [58]. Abbildung 2 zeigt die Entwicklung der Tumortheraeutika von den ursprünglichen Chemotherapeutika bis hin zu den zielgerichteten Wirkstoffen.



**Abbildung 2: Entwicklung der Tumortheraeutika.** Modifiziert nach [59]. Im Laufe der Zeit sind kontinuierlich neue Wirkstoffe entwickelt worden. Dies bewirkte, dass sich die Behandlungsmöglichkeiten von Krebspatienten zunehmend verbesserten. Die zielgerichteten Tumortheraeutika gehören zur neuesten Generation von Wirkstoffen. Sie sind bereits fest in der Behandlung von Krebserkrankungen etabliert.

## 1.5 Monoklonale Antikörper in der Tumortheraeutik

Monoklonale Antikörper, Vakzine und Zytokine (Interferone und Interleukine), die in der Tumortheraeutik eingesetzt werden, gehören zu den Krebsimmuntherapeutika. Neben den Vakzinen, die zur Immunstimulation dienen, rückte vor allem die therapeutische Behandlung mit monoklonalen Antikörper immer mehr in den Vordergrund [60-65]. Dies liegt hauptsächlich daran, dass Antikörper sehr effektive und spezifische Waffen des Immunsystems darstellen.

Die Existenz von Antikörpern ist dabei schon sehr lange bekannt. Bereits vor über 100 Jahren (1897) wurden die Immunglobuline von dem deutschen Wissenschaftler und Nobelpreisträger Paul Ehrlich entdeckt und in der sogenannte Seitenketten-Theorie (*side-chain theory*) beschrieben. Diese besagt, dass bestimmte Zellen über

Seitenketten (Rezeptoren) fremde Substanzen binden können, wodurch die Seitenketten anschließend vermehrt ins Blut frei gesetzt werden und dort zirkulieren [66]. Mehrere Jahrzehnte später (1975) gelang es den beiden Wissenschaftlern César Milstein und Georges Köhler antikörperproduzierende B-Zellen aus der Maus zu immortalisieren. Mit dieser Technik konnten murine Immunglobuline in monoklonaler Form hergestellt werden [67-68]. Im Vergleich zu den polyklonalen Antiseren besitzen monoklonale Antikörper den großen Vorteil, dass sie gegen ein bestimmtes Epitop in nahezu unbegrenzter und gleichbleibender Qualität und Spezifität erzeugt werden können [69]. In den letzten Jahren hat sich der Einsatz von monoklonalen Antikörpern auf wissenschaftlicher und therapeutischer Ebene fest etabliert. Daher gehören monoklonale Antikörper heutzutage zu der am schnellsten anwachsenden Substanzklasse humaner Therapeutika und zu der zweitgrößten Wirkstoffgruppe nach den Vakzinen. Es sind mittlerweile viele, monoklonale Antikörper für unterschiedliche Therapien zugelassen und es befinden sich mehr als 150 neue Antikörper in den klinischen Phasen. Monoklonale Antikörper werden unter anderem bei Autoimmunerkrankungen (z.B. Infliximab, Remicade®), kardiovaskulären Erkrankungen (z.B. Aciximab, ReoPro®) sowie bei der Abstoßung von Transplantaten (z.B. Basiliximab, Simulect®) therapeutisch eingesetzt. Sie können jedoch nicht nur zur Behandlung von Erkrankungen sondern auch zur Prophylaxe (z.B. Pavilizumab, Synagis®; virale Infektion) oder zur Diagnose (z.B. Arcitumomab, CEA-Scan®; kolorektales Karzinom) genutzt werden [70-75]. Monoklonale Antikörpern, die in den letzten Jahren für die Krebstherapie zugelassen wurden, sind in Tabelle 1 dargestellt.

Tabelle 1: Zur Krebstherapie zugelassene, monoklonale Antikörper

Antikörper	Typ	Antigen	Indikationsgebiet
Alemtuzumab (2001) MabCampathReplagal® MedacSchering	humanisiert IgG1	CD52	chronische, lymphatische Leukämie (CLL)
Bevacizumab (2005) Avastin® Hoffmann-La Roche	humanisiert IgG1	<i>vascular endothelia growth factor</i> (VEGF)	Darmkrebs, Brustkrebs, nicht- kleinzelliges Bronchialkarzinom, Nierenzellkarzinom, Glioblastom*
Catumaxomab (2009) Removab® Fresenius-Biotech	murin Ratte/Maus IgG2	<i>epithelial cell adhesion molecule</i> (EpCAM), CD3,intakte Fc-Region von akzessorischen Immuneffektorzellen	krebsbedingte Flüssigkeits- ansammlung in der Bauchhöhle (bei EpCAM-positiven Tumoren)
Cetuximab (2004) Erbix® Merck	chimär IgG1	<i>epidermal growth factor receptor</i> (EGFR)	Kolorektalkarzinom Kopf-Hals-Tumoren
Ofatumumab (2010) Arzerra® GSK	humanisiert IgG1	CD20	chronische, lymphatische Leukämie (CLL)
Ibritumomab-Tiuxetan (2004) Zevalin® MedacSchering	murin IgG1 Yttrium-90 markiert	CD20	Non-Hodgkin-Lymphome
Panitumumab (2008) Vectibix® Amgen	human IgG2	<i>epidermal growth factor receptor</i> (EGFR)	metastasierender Darmkrebs
Rituximab (1998) MabThera® Roche	chimär IgG1	CD20	Non-Hodgkin-Lymphome
Tositumomab* Bexxar®	murin IgG2 Iod-131 markiert	CD20	Non-Hodgkin-Lymphome
Trastuzumab (2000) Herceptin® Roche	humanisiert IgG1	HER2/neu Rezeptor	metastasierendes Mamakarzinom

Quelle: Pharmazeutische Zeitung/Wissenschaftliche Artikel/Herstellerangaben

\*Zulassung in den USA; in Deutschland bisher keine Zulassung

Noch nicht zugelassene, sich in der präklinischen oder einer klinischen Phase befindlichen Antikörper sind in Tabelle 2 aufgeführt. Bei den Immunglobulinen in den beiden Tabellen handelt es sich um Vertreter der Immunglobulinklasse G. Diese liegen zum Teil mit anderen Substanzen gekoppelt als Radioimmunkonjugate vor.

**Tabelle 2: In der Präklinischen oder der Klinischen Phase I-III befindliche monoklonale Antikörper für die Krebstherapie**

Antikörper	Typ	Antigen	Indikationsgebiet
<b>Klinische Phase III</b>			
Apolizumab (Remitogen®)	humanisiert	HLA-DR	solide Tumoren, akute und chronische Leukämie, Non-Hodgkin-Lymphome
Epratuzumab (LymphoCide®)	humanisiert	CD22	Non-Hodgkin-Lymphome, akute lymphatische Leukämie, Autoimmunerkrankung
Galiximab	chimär Makake/human)	CD80	Non-Hodgkin-Lymphome
Lumiliximab	chimär Makake/human)	CD23	chronische, lymphatische Leukämie (CLL)
Oregovomab (OvaRex®)	murin	CA-125	Ovarialkarzinom
Zanolimumab (HuMax-CD4)	human	CD4	T-Zell-Lymphome
<b>Präklinische Phase/Klinische Phase I und II</b>			
Labetuzumab (hMN14, CEA-CIDE®)	humanisiert Yttrium-90 markiert	karzinoembryonales Antigen (CEA)	Darmkrebs, Pankreaskarzinom
Nimotuzumab (TheraCim®)	humanisiert	<i>epidermal growth factor receptor</i> (EGFR)	metastasierendes Irinotecan-refraktäres Kolorektalkarzinom
Mapatumumab (HGS-ETR1)	human	TRAIL-Rezeptor ( <i>death receptor 4</i> )	Darmkrebs, nicht-kleinzelliges Lungenkarzinom
Matuzumab (EMD72000)	humanisiert	<i>epidermal growth factor receptor</i> (EGFR)	Magenkrebs, Darmkrebs, nicht-kleinzelliges Lungenkarzinom
Pertuzumab (Omnitarg®)	humanisiert	HER2/neu Rezeptor	Mamma-, Ovarial-, Bronchial- und Prostatakarzinom

Quelle: Wissenschaftliche Artikel/Herstellerangaben

Monoklonale Antikörper, die in der Krebstherapie eingesetzt werden, wirken über unterschiedliche Mechanismen. Einige induzieren direkt den Zelltod der Zielzelle durch Apoptose (z.B. Mapatumumab, Rituximab). Andere Antikörper, wie z.B. Alemtuzumab und Rituximab, lösen diesen indirekt durch die Aktivierung des Komplementsystems (*complement-dependent cytotoxicity*, CDC) aus. Eine weitere Möglichkeit zur indirekten Induktion des Zelltods stellt die antikörperabhängige Zytotoxizität (*antibody-dependent cellular cytotoxicity*, ADCC) dar, welche mit Hilfe bestimmter Abwehrzellen erfolgt. Hierzu sind Antikörper wie beispielsweise Cetuximab und Rituximab in der Lage. Des Weiteren können Antikörper auch die Proliferation und die Angiogenese der Tumorzellen hemmen (z.B. Bevacizumab, Cetuximab, Trastuzumab). Hierbei ist es möglich, dass ein Antikörper auf verschiedene Mechanismen zugreift (z.B. Rituximab). Der Wirkmechanismus des Antikörpers kann sowohl von dem zu bindenden Antigen (z.B. Mapatumumab; *tumor necrosis factor (TNF)-related, apoptosis-inducing ligand* (TRAIL)), als auch von dem Fc-Teil und dessen Affinität zu den Fc-Rezeptoren abhängig sein. Die Antikörper bewirken häufig eine Verlängerung der Lebenszeit des Patienten. Vereinzelt kann durch die Antikörpertherapie sogar eine Heilung erfolgen. Einen wichtigen Nutzen erfüllen die Antikörper auch hinsichtlich anderer therapeutischer Substanzen. Durch ihren Einsatz kann beispielsweise eine Sensibilisierung für die Radio- bzw. Chemotherapie erzielt werden, welche die Krebstherapie positiv beeinflussen kann [73, 76-78]. Die einzelnen Antikörpertypen, die zur Therapie eingesetzt werden, sind nachfolgend näher beschrieben.

### **1.5.1 Murine Antikörper**

Die ersten in der Tumorthherapie verwendeten, monoklonalen Antikörper wurden aus Mäusen isoliert, die zuvor mit menschlichen Tumorzellen immunisiert wurden. Hierbei sollte das Immunsystem der Maus auf tumorspezifische Oberflächenstrukturen humaner Krebszellen reagieren und gegen diese anschließend Immunglobuline bilden. Diese murinen Antikörper (Mausantikörper, erkennbar an der Endung „-omab“), die bei einer solchen Xenoimmunisierung entstehen, sind jedoch sehr häufig gegen Differenzierungsantigene (z.B. *epithelial cell adhesion/activating molecule* (EpCAM/CD326)) und nicht, wie gewünscht, gegen tumorspezifische

Antigene gerichtet. Dies ist für eine therapeutische Anwendung mit erheblichen Nachteilen verbunden. Viele dieser Differenzierungsantigene sind auf Tumorzellen nur überexprimiert. Das bedeutet, dass diese Strukturen nicht tumorspezifisch sind, da sie ebenfalls, wenn auch in geringerem Maße, auf gesunden Zellen vorhanden sind. Die Antikörper können daher nicht nur mit malignen, sondern auch mit gesunden Zellen reagieren [79].

Zusätzlich birgt die Anwendung eines Mausantikörpers im Menschen weitere Nachteile. Das Immunsystem des menschlichen Organismus reagiert mit einer Antikörperbildung auf die Fremdproteine. Die sogenannten *human anti-mouse antibodies* (HAMA) können an die Mausproteine binden und zur Aufhebung der beabsichtigten Wirkung sowie zur Elimination der murinen Antikörper führen. Sie erhöhen hierbei die Plasmaclearance muriner Antikörper. Eine mehrfache Applikation des murinen Fremdproteins kann dabei jedoch nicht nur mit einer verringerten Wirkung, sondern sogar mit schwerwiegenden Reaktionen, wie beispielsweise einem anaphylaktischen Schock, einhergehen [80-82].

Außerdem weisen die murinen Antikörper generell eine geringe Halbwertszeit im humanen Blutkreislauf auf. Dies beruht auf der niedrigen Affinität zum ubiquitär exprimierten, neonatalen Fc-Rezeptor (FcRn), welcher normalerweise den frühzeitigen Abbau von gebundenen Antikörpern verhindert [83-84]. Die Pharmakokinetik der murinen Antikörper wird daher sowohl durch die HAMA-vermittelte Clearance wie auch durch das Bindevormögen an den FcRn beeinflusst.

Des Weiteren können murine Antikörper nicht nur schwach mit den humanen Fc-Rezeptoren entsprechender Immunzellen interagieren, sondern folglich auch nur bedingt Effektorfunktionen ausüben. Hierdurch kommt es zu einer verminderten bzw. fehlenden Funktion der antikörperabhängigen, zellulären Phagozytose (*antibody-dependent cellular phagocytosis*, ADCP) und der antikörperabhängigen, zellulären Zytotoxizität (*antibody-dependent cellular cytotoxicity*, ADCC). Auch die komplementabhängige Zytotoxizität (*complement-dependent cytotoxicity*, CDC) ist davon betroffen und kann nicht oder nur unzureichend stattfinden [85]. Dies resultiert letztlich in einer weniger effizienten Beseitigung von Krebszellen. Die murinen Antikörper sind daher nur begrenzt für eine therapeutische Anwendung geeignet.

Der erste monoklonale Antikörper, der zur Krebstherapie eingesetzt wurde, war der murine mAb17-1A (später umbenannt in Edrecolomab, Panorex®). Er ist gegen EpCAM, das erste tumorassoziierte Differenzierungsantigen, das in diesem

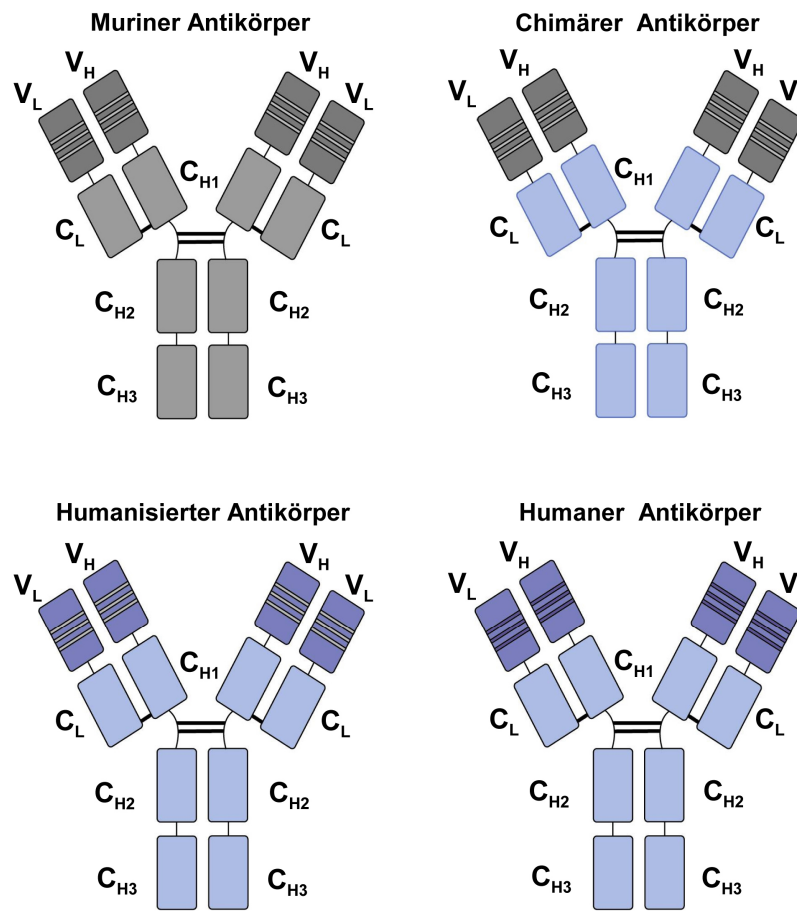


Zusammenhang gefunden wurde, gerichtet [79, 86-88]. Edrecolomab, der seine Zulassung im Jahr 1995 erhielt, wird heutzutage jedoch nicht mehr therapeutisch eingesetzt. Der murine Antikörper wurde bei Patienten mit kolorektalem Karzinom (Stadium: Dukes C bzw. III (UICC)) eingesetzt, wobei anfänglich eine verminderte Rezidivrate sowie eine Abnahme der Mortalität verzeichnet wurden [89]. Die Wirksamkeit von Edrecolomab konnte nachfolgend allerdings nicht weiter bestätigt werden. Der Antikörper wurde im Jahr 2000 vom Markt genommen, da er als Monotherapeutikum in einer Phase-III-Studie der 5-FU/Folinsäure-Therapie (Standardtherapie) unterlegen war [90].

Derzeit werden murine Antikörper hauptsächlich noch als radioaktive Immunkonjugate eingesetzt (z.B. Tositumomab, Bexxar® und Ibritumomab-Tiuxetan, Zevalin®). Aufgrund der erläuterten Nachteile werden heutzutage mehr humanisierte Antikörper entwickelt (siehe Tabelle 2).

### **1.5.2 Chimäre und humanisierte Antikörper**

Wie bereits in Abschnitt 1.5.1 beschrieben, stellt die hohe Immunogenität muriner Antikörper ein großes Problem für den therapeutischen Einsatz dieser Moleküle dar. Daher wird versucht, diese Problematik zu umgehen. Hierbei sollen murine Antikörper durch eine Chimärisierung bzw. Humanisierung verträglicher gemacht werden [91-92]. Mit Hilfe gentechnischer Verfahren werden die murinen Proteinsequenzen des Antikörpers dafür teilweise durch entsprechende humane Strukturen ersetzt. Bei der Chimärisierung (75% Humananteil; erkennbar an der Endung „-ximab“) werden die konstanten Domänen der schweren und leichten Ketten des Mausantikörpers gegen entsprechende humane Domänen ausgetauscht. Bei der Humanisierung (90% Humananteil, erkennbar an der Endung „-zumab“) werden zusätzlich variable Regionen, die nicht an der Antikörpererkennung beteiligt sind, sogenannte *framework regions* (FR; Stabilisierungselemente), ersetzt [65, 71]. Die Antigenbindestellen (*complementarity determining region, CDR*) sind weiterhin murin. Abbildung 3 zeigt eine schematische Darstellung der unterschiedlichen Antikörpertypen. Aufgrund ihres höheren Humananteils werden heutzutage meist humanisierte Antikörper auf den Markt gebracht (siehe Tabelle 2).



**Abbildung 3: Schematische Darstellung muriner, chimärer, humanisierter und humaner Antikörper.** Modifiziert nach [93]. Darstellung der murinen (grau) und humanen (blauviolett) Immunglobulinanteile der einzelnen Antikörper. Die Antigenbindestellen (*complementarity determining region, CDR*) sind als Streifen in den entsprechenden variablen Teilen der leichten (V<sub>L</sub>) und schweren (V<sub>H</sub>) Ketten markiert. Der konstante Teil der leichten Kette (C<sub>L</sub>), so wie die drei konstanten Teile der schweren Kette (C<sub>H</sub>) sind farblich etwas heller dargestellt als die entsprechenden variablen Bereiche. Bei der Herstellung von chimären Antikörpern werden die konstanten Domänen (C<sub>H</sub> und C<sub>L</sub>) von murinen Antikörpern gegen humane Domänen ausgetauscht, während bei der Synthese von humanisierten Antikörpern zusätzlich die variablen Regionen, die nicht an der Antikörpererkennung beteiligt sind, ersetzt werden [65, 71]. Die Antigenbindestellen sind daher sowohl bei dem chimären Antikörper als auch bei dem humanisierten Antikörper weiterhin murin. Die Antigenbindestellen machen somit den Unterschied zwischen humanisierten (murine CDR) und humanen (humane CDR) Antikörpern aus.

Die neuen Antikörpervarianten aus Maus und Mensch zeichnen sich durch eine geringere, jedoch immer noch vorhandene Immunogenität sowie durch eine längere Halbwertszeit aus [63, 94-95]. Dennoch weisen beide Hybridantikörper einen entscheidenden Nachteil auf. Chimäre und humanisierte Antikörper sind wie murine Antikörper meist gegen Differenzierungsantigene gerichtet. In diesem Zusammenhang sind der chimäre Antikörper Cetuximab (Erbix®) und die

humanisierten Antikörper Nimotuzumab (TherCim®) und Matuzumab (EMD7200) zu nennen, welche gegen den EGF-Rezeptor (EGFR) gerichtet sind. Da diese Differenzierungsantigene, wie bereits in Abschnitt 1.5.1 erwähnt, auch auf normalen Zellen vorhanden sind, können gesunde, humane Zellen ebenfalls mit den Antikörpern reagieren. Dies kann zu einem erhöhten Risiko hinsichtlich unerwünschter Wirkungen führen [71]. Des Weiteren können sich die Antikörperstrukturen der Hybride durch die gentechnische Veränderung so sehr von der ursprünglichen, murinen Struktur unterscheiden, dass dies zu einem Affinitätsverlust führt [95].

Obwohl chimäre und humanisierte Antikörper eine Verbesserung für die Therapie darstellen, kann es auch hier zu unerwünschten Reaktionen kommen. Der chimäre Antikörper Rituximab (MabThera®), der spezifisch an den CD20-Rezeptor bindet, bewirkte bei Patienten nach der ersten Verabreichung teilweise Fieberschübe und Hitzewallungen. Der Schweregrad und die Häufigkeit nahmen hierbei jedoch mit den nachfolgenden Dosierungen ab [73]. Auch bei humanisierten Antikörpern kann es zu entsprechenden Nebenwirkungen kommen. Dies verdeutlicht der Extremfall des humanisierten Antikörpers TGN1412 (TeGenero AG), dessen Entwicklung, aufgrund eines Zytokinsturms mit anschließendem Multiorganversagen in der klinischen Phase I, vor der Zulassung abgebrochen wurde [96].

Trotz der Reduktion des Fremdproteinanteils in den chimären bzw. humanisierten Antikörpern und der dadurch meist geringeren Toxizität besteht weiterhin der Bedarf an neuen Antikörpern, die noch besser verträglich sind und vor allem eine höhere Tumorspezifität aufweisen. Dieses Ziel kann jedoch nur mit rein humanen Antikörpern erreicht werden, die in der Lage sind tumorspezifische Antigene zu erkennen.

### **1.5.3 Humane Antikörper**

Lediglich ein kleiner Teil der derzeit therapeutisch eingesetzten Antikörper ist vollständig human, obwohl die ersten menschlichen Antikörper bereits 1977 hergestellt wurden. Dies gelang damals durch die Infektion eines humanen Lymphozyten mit dem Epstein-Barr-Virus [97]. Im Jahr 1980 entstand anschließend

die erste human-humane Hybridomzelle, die in der Lage war einen menschlichen Antikörper zu sezernieren [98]. In den 80er Jahren konnte somit eine Reihe menschlicher Antikörper isoliert und charakterisiert werden, die für die Therapie von Tumoren oder anderen Erkrankungen von großem Interesse waren [47, 99-102]. Die humanen Antikörper brachten dabei jedoch auch gewisse Probleme mit sich. Wegen Kreuzreaktionen, einer geringen Affinität, sowie Schwierigkeiten bei der technischen Handhabung in der Massenkultur und der Aufreinigung rückten sie einige Jahre später etwas aus dem wissenschaftlichen Fokus. Mittlerweile konnte die Problematik jedoch besser verstanden und technische Hindernisse beseitigt werden. Das Verfahren mit dem diese Antikörper hergestellt wurden, die humane Hybridomatechnologie, wird bis heute angewandt [47, 103-105].

Im Laufe der Jahre entwickelten sich weitere, wichtige Verfahren zur Gewinnung monoklonaler, humaner Antikörper. Heutzutage werden Immunglobuline meist über die Phagen-Display Methode oder die Immunisierung transgener Mäuse gewonnen. Außerdem können monoklonale, humane Antikörper auch mit Hilfe von mRNA-, Ribosomen- und Hefen-Displays sowie einer Klonierung von Antikörper-cDNA aus antigenselektierten Lymphozyten hergestellt werden. Diese Verfahren sind jedoch weitaus weniger verbreitet und werden im Folgenden nicht näher besprochen [55, 73, 106].

Die Herstellung humaner monoklonaler Antikörper durch das gentechnische Phagen-Display-Verfahren wurde erstmals von George P. Smith 1985 beschrieben [107]. Das Verfahren basiert auf dem Einsatz filamentöser Phagen, welche Immunglobulinstrukturen auf ihrer Oberfläche exprimieren können. Hierfür werden DNA-Sequenzen von scFv (*single chain variable fragment*) oder Fab-Fragment in das Phagen genom kloniert. Die entsprechende Immunglobulinstruktur wird anschließend als Fusionsprotein zusammen mit einem Oberflächenprotein des Phagens exprimiert [108]. Die gentechnisch hergestellten Antikörper können danach mit bestimmten Antigenen aus großen rekombinanten Phagen-Display-Bibliotheken identifiziert werden. Eine Bibliothek kann dabei über  $10^{11}$  unterschiedliche Gene enthalten. Die Gensequenz des Antikörpers eines entsprechenden Phagens kann anschließend isoliert und mit Hilfe eines bakteriellen oder eukariontischen Zellsystems exprimiert werden [109-111]. Diese gentechnische Methode ist besonders geeignet, um Antikörper gegen bekannte Antigene zu synthetisieren. Ein Beispiel hierfür ist der TNF-spezifische Antikörper Adalimumab (Humira®) [73]. Bisher

konnten lediglich Differenzierungsantigene mit dieser Technik erfasst werden, nicht jedoch ein wirklich tumorspezifisches Antigen.

Die Immunisierung transgener bzw. transchromosomaler Mäuse (*humAbmouse*) stellt eine alternative Methode zum Phagen-Display dar. Hierbei sind die immunglobulinkodierenden DNA-Abschnitte einer *humAbmouse* inaktiviert und werden durch entsprechende menschliche Sequenzen ersetzt [112-113]. Anschließend werden die Mäuse mit tumorösem Material immunisiert. Ihre B-Zellen werden danach, ähnlich wie bei der klassischen Herstellung muriner Antikörper, hybridisiert. Diese Methode liefert zwar humane Antikörper, jedoch ist die Ausbeute gering. Des Weiteren führt nur die Immunisierung mit bereits bekannten Antigenen zum gewünschten spezifischen Antikörper [112, 114-116]. Der durch diese Methode gefundene Antikörper ABX-EGF (Abgenix) ist ein Krebstherapeutikum. Er gehört zu den EGFR, die nicht tumorspezifisch sind, sondern lediglich auf Tumorzellen überexprimiert vorliegen. Somit besteht bei diesem Antikörper das gleiche Problem wie bei anderen bereits erwähnten chimären oder humanisierten Antikörpern gegen EGFR. Von Nachteil ist also offensichtlich nicht nur die geringe Ausbeute, sondern auch die Herstellung von Antikörpern gegen Differenzierungsantigene [117].

## **1.6 Humane Hybridomatechnologie**

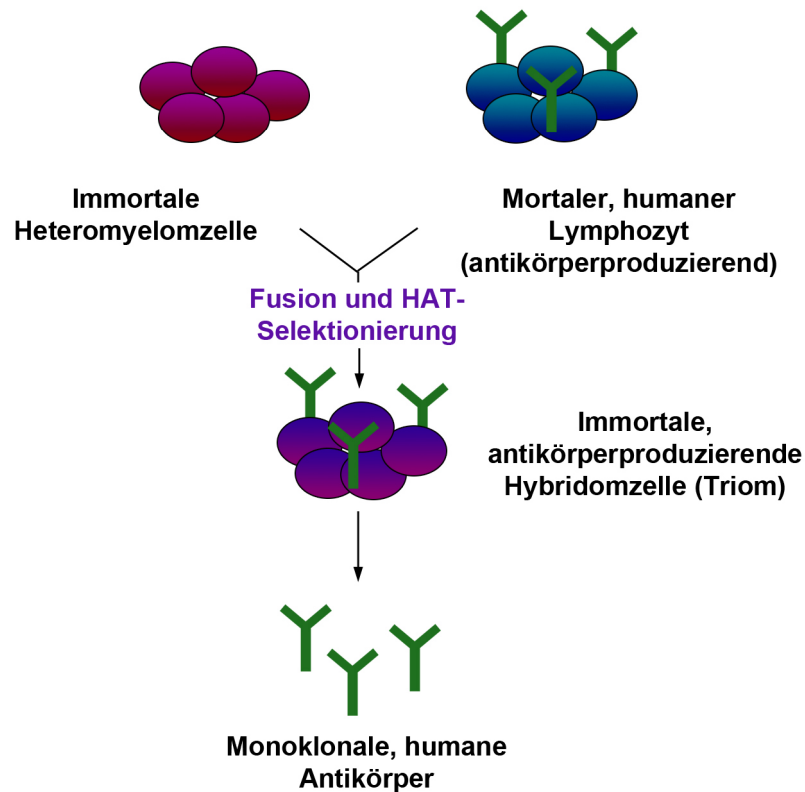
Die humane Hybridomatechnologie (Triomatechnologie) stellt ein wichtiges Verfahren zur Gewinnung humaner Antikörper dar. Diese Methode ermöglicht die Generierung von tumorspezifischen Antikörpern in beinahe unbegrenzten Mengen [118-119].

Den Grundstein für die Entwicklung der humanen Hybridomatechnologie legten 1975 César Milstein und Georges Köhler mit der Herstellung monoklonaler Antikörper. Beide Wissenschaftler erhielten im Jahr 1984 für diese Errungenschaft den Nobelpreis für Medizin. Durch die Entdeckung dieser Technik kam es zu einem enormen Anstieg und Einsatz von Antikörpern in Wissenschaft und Medizin. Das Verfahren basiert auf der Fusion von immortalen Mausmyelomzellen mit murinen antikörperproduzierenden B-Lymphozyten, bei welcher immortale Hybridome

entstehen. Die Methode ermöglicht hierbei die Produktion monoklonaler, muriner Antikörper mit bestimmter Spezifität in größeren Mengen [67, 73, 120].

Basierend auf dieser klassischen Hybridomatechnologie wurde am Pathologischen Institut der Julius-Maximilians-Universität Würzburg 1989 eine Methode entwickelt, um rein humane, monoklonale Antikörper zu generieren. Hierbei werden B-Zellen direkt aus dem lymphatischen Material von Krebspatienten oder gesunden Probanden isoliert und jeweils mit einer immortalisierten nicht-sezernierenden Heteromyelomzelle fusioniert. Durch die sogenannte Hypoxanthin-Aminopterin-Thymidin-Selektionierung entstehen immortale Hybridomzellen (Triome), die monoklonale, vollständig humane Antikörper produzieren können [47, 106]. Abbildung 4 zeigt eine Übersicht der humanen Hybridomatechnologie. Die Antikörperklasse wird anschließend mittels ELISA (*enzyme linked immunosorbent assay*) bestimmt, während die Tumorspezifität mit Hilfe von immunhistochemischen Methoden untersucht wird. Die tumorspezifischen Antikörper können anschließend weiter charakterisiert werden und ermöglichen gleichzeitig, mit Hilfe von biochemischen Methoden, tumorspezifische Antigene zu isolieren und zu identifizieren. Dies bietet einen enormen Vorteil gegenüber anderen Methoden. Bei transgenen Mäusen oder dem Phagen-Display können bisher nur monoklonale Antikörper gegen bereits bekannte Antikörperzielstrukturen hergestellt werden, welche zwar tumorassoziiert jedoch nicht tumorspezifisch sind [73, 117, 121]. Der Vorteil der Triomatechnologie liegt also darin, dass humane und gleichzeitig tumorspezifische Antikörper gewonnen werden, die dann eingesetzt werden können, um vorher unbekannte tumorspezifische Antigene zu identifizieren. Des Weiteren sind die hierbei gewonnenen, vollständig humanen Immunglobuline direkt in präklinischen oder klinischen Versuchen einsetzbar.

Durch das beschriebene Verfahren konnten mittlerweile mehrere humane, natürliche (zur angeborenen Immunabwehr angehörende) Antikörper isoliert und identifiziert werden [47, 104-105, 118, 122-130]. Genauere Untersuchungen dieser monoklonalen Antikörper und ihre Antigene ermöglichen zudem neue Einblicke in das innate Immunsystem und die Tumormunität des Menschen. Die hohe Tumorspezifität der Antikörper sowie die tumorspezifische Expression der entsprechenden Antigene sind für Diagnostik und Therapie von Tumoren von besonderer Bedeutung [54-55, 105, 131].



**Abbildung 4: Humane Hybridomatechnologie.** Die Abbildung zeigt die Fusion von immortalen Heteromyelomzellen mit mortalen, humanen, antikörperproduzierenden Lymphozyten. Mittels Hypoxanthin-Aminopterin-Thymidin- (HAT-) Selektionierung entstehen dabei immortale, antikörperproduzierende Hybridomzellen, welche monoklonale, humane Antikörper produzieren können.

## 1.7 Natürliche Antikörper

Neben den Zytokinen und dem Komplementsystem sind natürliche Antikörper für die humorale, innate Immunabwehr von großer Bedeutung. Sie sind nicht nur in der Lage, pathogene oder körperfremde Strukturen zu erkennen, sondern diese auch über bestimmte Mechanismen zu eliminieren. Natürliche Antikörper spielen besonders in der Initialphase der Detektion und Beseitigung krankhaft veränderter Körperzellen oder Fremdpartikeln eine wichtige Rolle, da sie ohne vorangegangene, externe Stimulation im Körper zirkulieren und das entsprechende Antigen sofort binden können [31, 132-134]. Sie sind dabei vor allem an der Erkennung und der Eliminierung von kanzerogenen Läsionen und deren Vorstufen beteiligt, so dass sich Tumoren aufgrund der immunkompetenten Abwehr und effizienter, zellulärer Reparaturmechanismen nur selten manifestieren [16, 41, 104, 127, 135]. Die zur

innaten Immunität gehörenden natürliche Antikörper weisen keine oder nur geringe Mutationen in ihren Keimbahngenen auf und unterscheiden sich somit von den affinitätsgereiften Antikörpern der adaptiven Immunabwehr [136].

Bisher konnte eine ganze Reihe an natürlichen Antikörpern unterschiedlicher Immunglobulinklassen mit Hilfe der humanen Hybridomatechnologie aus dem Menschen isoliert werden. Diese wurden anschließend, wie bereits in Abschnitt 1.6 beschrieben, in immunhistochemischen Analysen bezüglich ihres Bindungsverhaltens auf Tumorspezifität untersucht. Tumorspezifische Antikörper konnten hierbei sowohl aus krebserkrankten als auch aus gesunden Probanden gewonnen werden. Da natürliche Antikörper ein wichtiger Bestandteil der angeborenen Immunität sind, ist es durchaus verständlich, dass sie nicht nur in Krebspatienten vorkommen, sondern auch in gesunden Personen vorhanden sind [55, 134]. Es konnte beobachtet werden, dass der Großteil (etwa 99%) der tumorspezifischen Antikörper zur Immunglobulinklasse M gehört. Lediglich ein kleiner Anteil (<1%) konnte den Immunglobulinklassen A und G zugeordnet werden [55, 123]. Die natürlichen Antikörper werden dabei von bestimmten Keimbahngenen kodiert und exklusiv von CD5-positiven B-Lymphozyten produziert [136].

Untersuchungen mit tumorspezifischen, natürlichen Antikörpern zeigten zudem, dass diese in der Lage sind, Krebszellen durch die Induktion von Apoptose zu beseitigen [135]. Dieser Weg der Eliminierung gilt als schnell, effektiv und vor allem selektiv, da einzelne, unerwünschte Zellen ohne das Auslösen von inflammatorischen Reaktionen beseitigt werden können. Hierbei sorgen sehr komplexe, intrazelluläre Prozesse für den Abbau der Zellstruktur. Zelluläre Bestandteile wie Proteine und Nukleinsäuren werden durch Proteasen verdaut oder durch Endonukleasen fragmentiert. Die Bruchstücke werden vom Organismus letztendlich in sogenannten Membranvesikeln eingeschlossen und abgebaut [137].

Darüber hinaus konnte bei den isolierten Antikörpern ein poly- bzw. oligoreaktives Bindungsverhalten festgestellt werden. Dies bedeutet, dass sie in der Lage sind, nicht nur ein Antigen, sondern mehrere Antigene mit den gleichen konservativen Strukturen zu binden [134]. Untersuchungen zeigten dabei, dass IgM Antikörper vorwiegend an Carbohydratreste auf tumorspezifisch modifizierten Oberflächenrezeptoren binden [55, 122, 129, 138]. Solche posttranslationalen Modifikationen sichern der Tumorzelle meist das Überleben und das Zellwachstum. Daher werden häufig auch Wachstumsfaktoren oder Schutzmoleküle modifiziert bzw.



modifiziert überexprimiert. Diese modifizierten Moleküle existieren in Krebszellen dann häufig parallel zu dem ebenfalls in normalen Zellen enthaltenen Wildtyp [122, 138-139]. Obwohl diese Veränderungen zur Überlebensstrategie der Tumorzellen gehören, werden sie gerade durch die Expression solcher tumorspezifischen Moleküle zum Ziel der körpereigenen Immunabwehr. Die isolierten, natürlichen Antikörper ermöglichen durch ihre Tumorspezifität neue immuntherapeutische Ansätze für Krebspatienten. In den folgenden Abschnitten werden einige dieser humanen, tumorspezifischen Antikörper näher besprochen.

### 1.7.1 Antikörper SC-1

Der monoklonale, humane Antikörper SC-1 wurde durch die Fusion von Milzzellen aus einem Patienten mit Siegelringzellkarzinom (Magen) mit dem Heteromyelom SPM4-0 hergestellt [47]. Es handelt sich bei diesem Antikörper um ein IgM Immunglobulin der VH3-Familie, welches jedoch in einer leicht mutierten Form vorliegt [140]. Die Homologie zum Keimbahngen DP-49 beträgt 97%. In der Framework-Region (FR) der schweren Kette befinden sich vier Aminosäureaustauschmutationen und eine stille Mutation, während in der *complementarity determining region* (CDR) zwei Aminosäureaustauschmutationen vorhanden sind. Die leichte lambda ( $\lambda$ )-Kette ist zu 96,8% homolog zum Keimbahngen (DPL-23,V $\lambda$ III) und weist ebenfalls Mutationen in der FR (drei Aminosäureaustauschmutationen und zwei stille Mutationen) und der CDR (drei Aminosäureaustauschmutationen) auf.

Der Antikörper bindet an eine Isoform des *decay-accelerating factor* Proteins (DAF, auch bekannt als CD55), welche spezifisch auf Magenkarzinomzellen exprimiert wird und ein Molekulargewicht von 80-82 kDa besitzt [138]. Dieses Glykosylphosphatidylinositol- (GPI-) Protein schützt die Zelle vor dem autologen Komplement, indem es durch die Bindung an Faktor C3b und and die Untereinheit Bb des Faktor-B-Komplexes den klassischen Komplementweg inhibiert. Das besagte Molekül liegt beim Menschen in unterschiedlichen Isoformen vor (unter anderem auch als DAF B), und ist auf sehr vielen Tumoren überexprimiert [141]. Es handelt sich bei dem Antigen um eine modifizierte Form des Schutzmoleküls und nicht um

ein Molekül der CD95 Familie mit einem *death domain* Komplex. Experimente mit Endoglykosidasen zeigten einen Bindungsverlust des SC-1 Antikörpers nach Enzymverdau. Dies weist auf ein Carbohydratrest als Bindungsstelle des Antikörpers an seinem Antigen hin [118].

Der SC-1 Antikörper reagierte in Untersuchungen mit über 70% aller Magenadenokarzinome vom diffusen und intestinalen Typ. Getestete Karzinome anderer Organe, sowie maligne Melanome, Lymphome oder Normalgewebe zeigten keine Reaktion mit dem Antikörper [47, 118, 124, 141]. In vitro zeigte der Antikörper eine Inhibition von Magenkarzinomzellen in Weichagar und Zellkultur. In vivo führte SC-1 in Nacktmäusen zur Tumorrepression [126, 140]. Weitere Untersuchungen auf molekularbiologischer und zellbiologischer Ebene zeigten, dass der Antikörper bei den Tumorzellen spezifisch Apoptose auslöst [141-142]. Wenige Minuten nach der SC-1 vermittelten Apoptose kommt es zur Phosphorylierung eines Tyrosinrests von Proteinen mit einer Größe von 55 kDa und 110 kDa. Nach 15 min erfolgt eine weitere Thyrosin-Phosphorylierung eines 75 kDa Proteins, während der Serinrest eines 35 kDa großen Proteins dephosphoryliert wird [131, 138]. Weitere Charakteristika des SC-1 Antikörpers sind ein erhöhter Calciumspiegel in der Tumorzelle, verbunden mit einer Neusynthese seines Rezeptors nach der Endozytose, sowie ein Anstieg von c-myc und einer Aktivierung von Caspase 6. Im Gegensatz zu anderen Apoptosewegen findet keine Spaltung von Poly-(ADP-Ribose)-Polymerase (PARP) und kein Flip-Flop von Annexin statt [118, 142].

Des Weiteren wurde mit dem SC-1 Antikörper eine klinische Studie in der Chirurgischen Klinik der Universität Würzburg und der Missionsärztlichen Klinik Würzburg durchgeführt. Dabei stand das Ziel, Informationen über die Verteilung, Kreuzreaktionen sowie die Effekte auf Primärtumoren und Metastasen zu erlangen, im Vordergrund. Für die Studie wurden 50 Magenkarzinompatienten ausgewählt. Es konnte beobachtet werden, dass der Antikörper ausnahmslos gut vertragen wurde [143]. Des Weiteren zeigten die Untersuchungen eine Tumorregression von 60% bei SC-1 behandelten Patienten sowie eine erhöhte Apoptose bei 84% der Teilnehmer im Vergleich zum Zustand vor der Antikörpergabe. Nach drei Jahren konnte, verglichen mit der 3-Jahresüberlebensrate der deutschen Magenkarzinomstudie, eine erhöhte Überlebensrate festgestellt werden [126, 130, 144-146].

Das Beispiel des SC-1 Antikörpers zeigt, wozu humane, natürliche Antikörper in der Lage sind. Sowohl in vitro als auch in vivo Untersuchungen bestätigten das

apoptotische Potential und die Tumorspezifität des Antikörpers. SC-1 stellte somit die Weichen zu einer neuen alternativen Therapieform gegen Krebserkrankung. Er lieferte damit außerdem den Anstoß, weitere neue Antikörper und Rezeptoren zu identifizieren, um diese innovative Therapieform weiter zu entwickeln.

### **1.7.2 Antikörper PAM-1**

Der monoklonale, humane Antikörper PAM-1 konnte ebenfalls mit Hilfe der humanen Hybridomatechnologie aus einem Patienten mit Magenkarzinom isoliert werden. Die Milzzellen des Patienten wurden hierbei mit der Heteromyelomzelle HAB-1 fusioniert [103]. Es handelt sich genau wie bei SC-1 um einen IgM Antikörper. Im Gegensatz zum Antikörper SC-1 wird der PAM-1 Antikörper jedoch von einem nicht mutierten DP-49 Gen der VH3 Familie (IgHV3-30/3.30.5\*01) kodiert. Er zählt somit ebenfalls zur Gruppe der natürlichen Antikörper [55, 129, 131]. Die Homologie zum Keimbahngen der leichten Kette beträgt 98,7%, da dort drei Aminosäureaustauschmutationen in der FR und eine stille Mutation in der CDR vorliegen.

Der Antikörper PAM-1 interagiert mit dem 130 kDa großen CFR-1 Rezeptor (*cysteine-rich fibroblast growth factor receptor 1*). Auch hier bindet der Antikörper an einen Carbohydratrest des modifizierten Antigens. Dieses veränderte Zielmolekül wird exklusiv auf prämaligen und malignen epithelialen Tumoren exprimiert, wobei es aufgrund dieses Expressionsmusters hauptsächlich für diagnostische Zwecke im Rahmen einer Früherkennung von Interesse ist. Auf den untersuchten Normalgeweben konnte hingegen keine Expression des PAM-1 Antigens festgestellt werden [55, 129]. CFR-1 wurde ursprünglich in Hühnerfibroblasten identifiziert, wo er zur *fibroblast growth factor* (FGF)-Bindung dient [147]. Es handelt sich bei dem CFR-1 Molekül um ein multifunktionales Protein mit einer Homologie zu dem E-Selectin Liganden 1 (ESL-1) und zu MG-160 [148-151].

Untersuchungen mit PAM-1 zeigten unter anderem eine tumorspezifische Bindung des Antikörpers auf Karzinomen des Kolons, der Lunge und der Brust. Es konnten außerdem Präkanzerosen des Magens, des Ösophagus, der Zervix sowie weiteren Organen mit Hilfe von PAM-1 spezifisch erkannt werden, wohingegen der Antikörper keine Bindung an gesundes Gewebe aufwies [55, 129]. Durch die Bindung an das

tumorspezifische CFR-1 Wachstumsfaktormolekül ist der Antikörper in der Lage in vivo und in vitro die Apoptose auszulösen [128]. Die Besonderheit des PAM-1 Antikörpers, nicht nur tumorspezifisch Tumoren sondern, auch Präkanzerosen erkennen zu können, ist vor allem für die Tumorprävention von Bedeutung. Durch sein spezifisches Bindungsverhalten eignet sich der Antikörper möglicherweise nicht nur für diagnostische Untersuchungen maligner und prämaligener Erkrankungen, sondern könnte auch von therapeutischem Interesse sein.

### 1.7.3 Antikörper SAM-6

Der monoklonale, humane Antikörper SAM-6 wurde durch die Fusion von Milzzellen aus einem Magenkarzinom-Patienten und einer HAB-1 Heteromyelomzelle generiert. Auch dieser Antikörper gehört zu den Immunglobulinen der IgM Klasse. Wie SC-1 und PAM-1 zählt er zu den natürlichen Antikörpern. SAM-6 weist keine Mutationen in der Sequenz der Keimbahngene (Gen IgHV3-30.3\*01 und IgLV3-1\*01) auf [55].

Immunhistochemische Färbungen und FACS-Analysen zeigten, dass der Antikörper ausschließlich auf Tumorzellen nicht jedoch auf gesunden Zellen bindet [122, 152]. Er konnte somit ebenfalls den tumorspezifischen, natürlichen Antikörpern zugeordnet werden.

In weiteren Analysen wurde nachgewiesen, dass SAM-6 an eine tumorspezifisch modifizierte Form des GRP78 (*glucose-related protein 78 kDa*; auch bekannt als BiP (*immunglobulin binding protein*) oder HSPA5 (*heat shock 70 kDa protein 5*)) auf Tumorzellen bindet. Das Epitop ist dabei ebenso wie bei den beiden anderen IgM Antikörpern ein Carbohydrat [122]. Das GRP78<sup>SAM-6</sup> ist exklusiv auf der Zellmembran lokalisiert und wird zusammen mit dem Wildtyp GRP78 in Tumorzellen koexprimiert [122, 152]. GRP78 ist unter anderem als Schutzmolekül und wichtiges Chaperon des endoplasmatischen Retikulums bekannt [153-154].

Der Antikörper SAM-6 fiel darüber hinaus durch seine funktionellen Eigenschaften in Tumorzellen auf. In vitro Untersuchungen zeigten, dass der Antikörper sowohl konzentrationsabhängig das Wachstum von Tumorzellen inhibiert, als auch die Apoptose tumorspezifisch einleitet. Außerdem konnte in den mit SAM-6 behandelten Tumorzellen eine verstärkte Akkumulation von Fetteinlagerungen mittels

Sudanfärbung nachgewiesen werden. Dieser antikörpervermittelte Effekt führt letztendlich auch zur oben genannten Apoptose, welche aufgrund der neuartigen Induktion auch als Lipoptose bezeichnet wird [152]. Diese außergewöhnliche Art des induzierten Zelltods sowie die Tumorspezifität des Antikörpers und seiner Zielstruktur machen den SAM-6 Antikörper zu einem idealen Werkzeug, welches für die Tumorthherapie von großem Interesse sein könnte.

#### **1.7.4 Antikörper BARB-4**

Der monoklonale, humane Antikörper BARB-4 wurde durch die Fusion von Milzzellen aus einem an Magenkarzinom erkrankten Patienten und Heteromyelomen HAB-1 generiert. Der Antikörper gehört zur Immunglobulinklasse G und weist keine Mutationen in der Sequenz der Keimbahngene (IgHV3-30\*03 und IgLV2-11\*03) auf. BARB-4 unterliegt somit keiner Reifung und gehört wie die zuvor beschriebenen IgM Antikörper zu den natürlichen Antikörpern.

Erste immunhistochemische Untersuchungen innerhalb der Arbeitsgruppe zeigten eine tumorspezifische Reaktion des Antikörpers auf Geweben. Des Weiteren wurde in ersten Analysen die funktionelle Aktivität des Antikörpers bezüglich seiner Fähigkeit Apoptose zu induzieren untersucht. Die Analysen deuteten daraufhin, dass der Antikörper in der Lage ist, diesen programmierten Zelltod in Tumorzellen auszulösen.

BARB-4 ist somit einer der wenigen, natürlichen IgG Antikörper mit tumorspezifischem Bindungsverhalten. Er bietet daher die Möglichkeit einen besseren Einblick in die innate Immunität und ihre unterschiedlichen Antikörperklassen zu erlangen. Durch die Tumorspezifität und die Fähigkeit zur Induktion der Apoptose stellt der natürliche IgG Antikörper BARB-4 eine Besonderheit dar. Er könnte daher für den therapeutischen und den diagnostischen Einsatz von großem Interesse sein.

## 1.8 Ziel der Arbeit

Die humane Hybridomatechnologie stellt eine wichtige Methode zur Isolierung monoklonaler, tumorspezifischer Antikörper dar und ermöglicht hierdurch die Identifizierung neuer, exklusiv auf Tumorzellen exprimierter Antigene.

Innerhalb dieser Arbeit konnte der Antikörper BARB-4 sowie einige seiner tumorspezifischen Eigenschaften näher charakterisiert werden. Hierbei war vor allem die Auswirkung des Antikörpers auf die Tumorzelladhäsion und Tumorzellmotilität von Interesse.

Der Schwerpunkt dieser Arbeit lag jedoch auf der Identifizierung und Charakterisierung des BARB-4 Antigens. Dieses sollte mit Hilfe von gängigen, biochemischen Verfahren isoliert und anschließend identifiziert werden. Nachfolgend sollten mit Hilfe von BARB-4 und einem entsprechenden, kommerziell erhältlichen Antikörper gegen das identifizierte Protein diverse Analysen durchgeführt werden, um tumorspezifische Besonderheiten des BARB-4 Antigens genauer zu untersuchen. Es sollte außerdem geklärt werden, ob das Antigen, wie bei den bereits erwähnten IgM Antikörpern SC-1, PAM-1 und SAM-6, eine tumorspezifische Glykosylierung aufweist. Die im Rahmen dieser Arbeit erhaltenen Ergebnisse sollten abschließend mit den Daten von IgM Antikörpern aus der Arbeitsgruppe verglichen werden, um so eventuelle Unterschiede bzw. Gemeinsamkeiten zwischen den beiden Immunglobulinklassen feststellen zu können.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Materialien

#### 2.1.1 Verbrauchsmaterialien

**Tabelle 3: Chemikalien, Lösungen und Kits**

Chemikalien, Lösungen, Kits	Hersteller
β-Mercaptoethanol	Serva/Boehringer Ingelheim, Heidelberg
0,9%ige NaCl-Lösung	Fresenius Kabi, Bad Homburg
10-fach PCR Rxn Buffer	Invitrogen, Karlsruhe
DAPI	Sigma, Taufkirchen
5-fach first strand-buffer ( cDNA-Synthese)	Invitrogen, Karlsruhe
5-fach Phusion Buffer (PCR)	New England Biolabs, Ipswich, USA
6-fach Loading Dye Solution	Fermentas, St. Leon-Rot
Aceton	Roth, Karlsruhe
Agarose	Roth, Karlsruhe
Ampicillin	Sigma, Taufkirchen
APS	Roth, Karlsruhe
Aquatex (wasserlösliches Eindeckmedium)	Merck, Darmstadt
BCA Protein Assay Reagent A	Perbio Science Deutschland GmbH, Bonn
BigDye®Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit	Applied Biosystems Inc, Foster City, USA
Bromphenolblau	Roth, Karlsruhe
Cell Death Detection ELISA <sup>PLUS</sup> Kit	Roche Diagnostics, Mannheim
Chloroform	Roth, Karlsruhe
CNBr-activated Sepharose™ 4 fast flow	Sigma, Taufkirchen
Coomassie-Brillant-Blau R-250	Sigma, Taufkirchen
Complete/Complete mini Protease Inhibitor	Roche Diagnostics, Mannheim
Demaskierlösung G	Biologo, Kronshagen
DMSO	Merck, Darmstadt
Dithiothreitol (DTT)	AppliChem, Darmstadt
DTT (0,1 M, cDNA-Synthese)	Invitrogen, Karlsruhe
Dulbecco's phosphate buffer	Linaris, Wertheim-Bettingen
Essigsäure	Roth, Karlsruhe
Ethanol	Baker, Deventer, Niederlande
Ethidiumbromid	Sigma, Taufkirchen
EDTA	Sigma, Taufkirchen
EZ-Link Maleimide-PEO Solid Phase	Pierce, Rockford, USA
FACSFlow™	BD Biosciences, Heidelberg
FCS	PAA, Wien, Österreich

**Fortsetzung Tabelle 3: Chemikalien, Lösungen und Kits**

<b>Chemikalien, Lösungen, Kits</b>	<b>Hersteller</b>
FicoLite-H (Human)	Linaris, Wertheim-Bettingen
Fluorescent Mounting Medium	Dako-Cytomation, Carpinteria, USA
Fluorescent orange 548 reactive	Fluka, Buchs, Schweiz
Gene Ruler™ 1 kb Plus DNA Ladder	Fermentas, St. Leon-Rot
Gene Ruler™ 100 bp Plus DNA Ladder	Fermentas, St. Leon-Rot
Glutaraldehyd	Sigma, Taufkirchen
Glycerol 85%	Merck, Darmstadt
Glycin	Roth, Karlsruhe
HEPES-Puffer (1M)	Biochrom AG, Berlin
Hi Trap™ Protein A HP (1 ml)	GE Healthcare, München
Hi-Di™ Formamid	Applied Biosystems, Darmstadt
Isopropanol (2-Propanol)	Merck, Darmstadt
Jetsorb Kit	Genomed, Löhne
Kodak GBX Entwickler	Kodak, Rochester, USA
Kodak GBX Fixierer	Kodak, Rochester, USA
LB Pulver	Roth, Karlsruhe
L-Glutamin	PAA, Wien, Österreich
Methanol	Baker, Deventer, Niederlande
MgCl (50 mM, für PCR)	Invitrogen, Karlsruhe
MTT Reagenz	Sigma, Taufkirchen
Natriumdeoxycholat	Sigma, Taufkirchen
Nitrocellulose Protran® (0,2µm)	Schleicher & Schuell, Dassel
Nonidet P40	Fluka, Buchs, Schweiz
OptiMEM® I Reduced Serum Medium with GlutaMAX I	Invitrogen, Karlsruhe
PD10 Säulen	GE Healthcare, München
Penicillin/Streptomycin	Gibco, Karlsruhe
peqGOLD Plasmid Miniprep Kit I	PEQLAB, Erlangen
peqGOLD Protein Marker II	PEQLAB, Erlangen
pEXP5-CT/TOPO® TA Expression Kit	Invitrogen, Karlsruhe
Ponceau S-Lösung	Sigma, Taufkirchen
Rotiphorese® Gel 30	Roth, Karlsruhe
RPMI 1640 Medium	PAA, Wien, Österreich
Sephadex™ G50	GE Healthcare, München
Sephadex™ G25	GE Healthcare, München
SigmaFAST™ DAB Tablets	Sigma, München
siLentFect™ Lipid Reagent	Bio Rad, München
SuperSignal® West Pico Chemiluminescent Substrate	Pierce, Rockford, USA
Tango™ Puffer	Fermentas, St. Leon-Rot



**Fortsetzung Tabelle 3: Chemikalien, Lösungen und Kits**

<b>Chemikalien, Lösungen, Kits</b>	<b>Hersteller</b>
TEMED	Roth, Karlsruhe
Tissue Tek O.C.T™	Sakura, Zoeterwoude, Niederlande
Tris	Merck, Darmstadt
Triton X-100	Sigma, Taufkirchen
Trizol® Reagent	Invitrogen, Karlsruhe
Trypanblau	Sigma, Taufkirchen
Tween 20	Merck, Darmstadt

Weitere Chemikalien, die im Rahmen dieser Arbeit verwendet wurden, waren von den Firmen Sigma (Taufkirchen), Roth (Karlsruhe) oder Merck (Darmstadt). Es kamen ausschließlich Chemikalien in der höchsten Reinheitsstufe zum Einsatz.

**Tabelle 4: Materialien**

<b>Materialien,</b>	<b>Hersteller</b>
Blotting-Papier (0,37 mm, 190 g/m <sup>2</sup> )	Schleicher & Schuell, Dassel
Deckgläser	Hartenstein, Würzburg
EDTA-/Heparin-Röhrchen	Sarstedt, Nümbrecht
Eppendorf cups 1 ml/2ml	Hartenstein, Würzburg
FACS-Röhrchen	Greiner, Frickenhausen
Filterpapier	Schleicher und Schuell, Dassel
Fuji Medical X-Ray Filme Super RX	Hartenstein, Würzburg
Gel Drying Film (17,5 x 20 cm)	Promega, Mannheim
Handschuhe	Touch N Tuff®, Ansell Healthcare, Brüssel, Belgien
Objektträger	Langenbrinck, Emmendingen
Pipettenspitzen	Greiner, Frickenhausen
Röhrchen, steril 15ml/50 ml	Greiner, Frickenhausen
Spritzen 10 ml	BD Biosciences, San Jose, USA
Spritzen 1ml	Dispomed, Gelnhausen
24-/96-well Platten	Greiner, Frickenhausen
Zellkulturflaschen	Greiner, Frickenhausen
Zellkulturplatten	Greiner, Frickenhausen
Zytospinfilterkarten	Hartenstein, Würzburg
Ultrazentrifugenröhrchen	Beckmann, München
Sterilfilter (0,2µm)	Sartorius Stedim Biotech, Aubagne, Frankreich

Alle weiteren Plastikartikel wurden von der Fa. Greiner (Frickenhausen) bezogen.

**Tabelle 5: Antikörper**

<b>Antikörper</b>	<b>Hersteller</b>
<b>Unkonjugierte Antikörper</b>	
BARB-4, humaner IgG Antikörper	Eigenes Labor
Mouse anti human CD45 IgG	Dako, Hamburg
Mouse anti human CD55 IgG	Acris, Hiddenhausen
Mouse anti human Cytokeratin (CAM 5.2)	BD Biosciences, San Jose, USA
Mouse anti human Cytokeratin 18	Boehringer, Mannheim
Mouse anti human Cytokeratin 5/6	Dako, Hamburg
Mouse anti human Cytokeratin AE1/AE3	Dako, Hamburg
Mouse anti human PSA	Dako, Hamburg
Mouse anti human TAF15 IgG	Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, USA
Rabbit anti human TAF15 IgG	AVIVA Systems Biology, San Diego, USA Bethyl Laboratories, Montgomery, USA GeneTex, San Antonio, USA
<b>Isotypkontrollen</b>	
ChromPure human IgG	Dianova, Hamburg
Rabbit Serum IgG	Sigma, Taufkirchen
Mouse IgG	Immunostep, Salamanca, Spanien
<b>Konjugierte Antikörper</b>	
Goat anti human IgG, Cy3	Sigma, Taufkirchen
Goat anti rabbit IgG, FITC	Acris, Hiddenhausen
Goat anti rabbit IgG, HRP	Dianova, Hamburg
NeutrAvidin™, HRP	Dako, Hamburg
Rabbit anti human IgG, FITC	Dako, Hamburg
Rabbit anti human IgG, HRP	Dako, Hamburg
Rabbit anti human Kappa Light Chain, HRP	Dako, Hamburg
Rabbit anti human Lamda Light Chain, HRP	Dako, Hamburg
Rabbit anti mouse Ig, HRP	Dako, Hamburg
Rabbit anti mouse IgG, FITC	Dianova, Hamburg

**Tabelle 6: siRNAs für die Transfektion**

<b>Oligonukleotide für die Transfektion (siRNAs)</b>	<b>Hersteller</b>
siGENOME SMARTpool, human TAF15	Dharmacon, Lafayette, USA
<b>Kontroll-siRNA</b>	<b>Hersteller</b>
Silencer® Negative Control siRNA	Ambion, Cambridge, UK

**Tabelle 7: Enzyme**

<b>Enzyme</b>	<b>Hersteller</b>
N-Glykosidase F, rekombinant	Roche Diagnostics, Mannheim
O-Glykosidase	Roche Diagnostics, Mannheim
Pepstatin A	Sigma, Taufkirchen
Phusion™ High-Fidelity DNA Polymerase	New England Biolabs, Ipswich, USA
Recombinant RNasin® (RNase Inhibitor)	Promega, Mannheim
Super Script® II Reverse Transkriptase	Invitrogen, Karlsruhe
Super Script® III Reverse Transkriptase	Invitrogen, Karlsruhe
Taq Polymerase	Invitrogen, Karlsruhe
Trypsin-EDTA (1x)	PAA, Wien, Österreich
Complete	Roche Diagnostics, Mannheim
Complete mini	Roche Diagnostics, Mannheim
XbaI Restriktionsenzym	Fermentas, St. Leon-Rot

**Tabelle 8: Primer für die cDNA-Synthese und PCR-Amplifikation**

<b>Primer für die cDNA-Synthese</b>	<b>Hersteller</b>
Oligodeoxythymidin Primer (Oligo-dT15 Primer)	MWG Biotech, Ebersberg
Random Primer	Invitrogen, Karlsruhe
<b>Primer für die PCR-Amplifikation</b>	<b>Sequenz</b>
TAF15 Primer 1 (forward)	5'-GCC TGG CTT TCG TAT TCG TTG-3'
TAF15 Primer 1 (reverse)	5'-CGA CGG TCA TCT TGT GTG TGG-3'
TAF15 Primer 2 (forward)	5'-ATG GAC CCA GAA CAGATG CTG-3'
TAF15 Primer 2 (reverse)	5'-CCT CTG GTC TAG GCT CAT TGC-3'
TAF15 Primer 3 (forward)	5'-GCC ACC ATG TCG GAT TCT GGA ATG TAC GGT-3'
TAF15 Primer 3 (reverse)	5'-GTA TGG TCG GTT GCG CTG ATC-3'
T7 Primer (forward)	5'-TAA TAC GAC TCA CTA TAG GG-3'
T7 Term Primer (reverse)	5'-ATC CGG ATA TAG TTC CTC CTT TC-3'
<b>Kontroll-Primer (PCR)</b>	<b>Sequenz</b>
GAPDH Primer (forward)	5'-AAG GTC GGA GTC AAC GGA TTT-3'
GAPDH Primer (reverse)	5'-AGA TGA TGA CCC TTT TGG CTC-3'

### 2.1.2 Medien, Puffer, Lösungen

Zur Herstellung der nachfolgenden Lösungen und Puffer wurde Wasser aus der hausinternen Aufbereitungsanlage Milli-Qplus PF der Fa. Millipore verwendet. Es wird im weiteren Verlauf dieser Arbeit als Millipore®-Wasser bezeichnet.

#### **Medien:**

##### Kulturmedium für die Tumor-, Melanom- und Hybridomzellen:

RPMI 1640

1% (V/V) Glutamin

1% (V/V) Penicillin/Streptomycin

10% (V/V) FCS (Fetales Kälberserum, *fetal calf serum*)

Vor Gebrauch auf 37 °C erwärmen.

##### LB-Medium für die Kultivierung der Escherichia coli Bakterien (Schüttelkultur):

10 g LB-Pulver (Nährmediumpulver, *lysogeny broth*)

500 ml Millipore®-Wasser

Die Lösung anschließend autoklavieren. Vor Gebrauch Ampicillin (Endkonzentration: 100 µg/ml) hinzugeben.

##### LB-Kulturplatten für die Kultivierung der Escherichia coli Bakterien:

10 g LB-Pulver

6 g Agarose

Die Lösung anschließend autoklavieren und nach dem Abkühlen auf unter 60 °C Ampicillin (Endkonzentration: 100 µg/ml) dazu geben. Danach kann die Lösung in Kulturplatten ausgegossen werden. Die fertigen Platten werden bei 4 °C gelagert.

##### Einfriermedium für die Tumorzelllinien:

RPMI 1640

1% (V/V) Glutamin

1% (V/V) Penicillin/Streptomycin

20% (V/V) FCS

10% DMSO (Dimethylsulfoxid, C<sub>2</sub>H<sub>6</sub>OS)

Einfriermedium für die Escherichia coli Bakterien:

0,85 ml LB-Medium

0,15 ml Glycerol 85% (autoklaviert)

**Lösung für die Zellzahlbestimmung:**

Trypanblaulösung:

0,9%ige NaCl-Lösung (Fertiglösung Fresenius Kabi)

0,5% (m/V) Trypanblau

**Häufig verwendete Puffer:**

PBS:

0,137 M Natriumchlorid (NaCl)

0,027 M Kaliumchlorid (KCl)

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

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

PBS-Tween:

PBS

0,05% (V/V)Tween 20

**Lösung für die Isolierung von Lymphozyten:**

Erythrozytenlysepuffer (pH 7,3):

4,15 g Ammoniumchlorid ( $\text{NH}_4\text{Cl}$ )

0,50 g Kaliumhydrogencarbonat ( $\text{KHCO}_3$ )

0,019 g Dinatriummethylenediamintetraacetat-Dihydrat ( $\text{Na-EDTA} \times 2\text{H}_2\text{O}$ )

500 ml Millipore®-Wasser

**Lösungen für die Immunhistochemie:**

Demaskierlösung:

1 Volumenteil Demaskierlösung G

4 Volumenteile PBS pH 7,4

Blockierlösung I für die Immunperoxidasefärbung:

PBS pH 7,4

3% (m/V) Magermilchpulver

Blockierlösung II for die Immunperoxidasefärbung:

PBS pH 7,4

0,5% (m/V) BSA (bovines Serumalbumin)

Tris-NaCl (pH 7,4):

3 g Tris/HCl (Tris(hydroxymethyl)-aminomethan,  $C_4H_{11}NO_3$ )

40,5 g NaCl

5 l Millipore®-Wasser

DAB-Substratlösung:

SigmaFAST™ DAB Tablets

Kurz vor Gebrauch in der entsprechenden Menge Leitungswasser lösen.

**Lösungen für die Präparation von Zellmembranextrakten:**

Hypotoner Puffer/Quellpuffer:

20 mM HEPES (4-(2-Hydroxyethyl)-piperazin-1-ethansulfonsäure) pH7,4

3 mM KCl

3 mM Magnesiumchlorid-Hexahydrat ( $MgCl_2 \times 6H_2O$ )

Kurz vor Gebrauch Complete Tablette (Proteaseinhibitor-Cocktail) dazu geben.

Membranlysepuffer:

50 mM Tris/HCl, pH 7,4

1% (m/V) Nonidet P40 (Nonylphenyl-polyethylenglykol-Lösung)

0,25% (m/V) Natriumdeoxycholat

150 mM NaCl

1 mM Na-EDTA  $\times 2H_2O$

Kurz vor Gebrauch Pepstatin (Endkonzentration: 1  $\mu g/ml$ ) und Complete Tablette (Proteaseinhibitor-Cocktail) dazu geben.

**Lösung zur Proteinquantifizierung:**

Kupfersulfatlösung:

4% (m/V) Kupfersulfat-Pentahydrat ( $\text{CuSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$ )

BCA Protein Assay:

Reagenz A: BCA Protein Assay Reagent A

Reagenz B: Kupfersulfatlösung

Vor Gebrauch 49 Volumenanteile Reagenz A und 1 Volumenanteil Reagenz B vermischen.

**Lösung für die SDS-PAGE:**

Gelladepuffer (5-fach ohne DTT):

250 mM Tris/HCl pH 6,8

50% (m/V) Glycerol 85%

25% (m/V) SDS (Natriumdodecylsulfat, *sodium dodecylsulfate*)

0,05% (m/V) Bromphenolblau

Gelladepuffer (1-fach ohne DTT):

1 Teil 5-fach Gelladepuffer

4 Teile Millipore®-Wasser

Vor Gebrauch der Gelladepuffer (1 oder 5-fach) die entsprechende Menge DTT (Dithiothreitol) dazu geben.

Laemmli-Laufpuffer:

25 mM Tris

250 mM Glycin

0,1% (m/V) SDS

Sammelgelpuffer:

1 M Tris, pH 6,8

Trenngelpuffer:

1,5 M Tris, pH 8,8

Rotiphorese (30% Acrylamid, 0,8% Bisacrylamid)

10% (m/V) SDS

10% (V/V) APS (Ammoniumperoxodisulfat)

TEMED (N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin)

Geltrocknungspuffer:

40% (V/V) Methanol (CH<sub>3</sub>OH)

10% (V/V) Glycerol 85%

7,5% (V/V) Essigsäure (C<sub>2</sub>H<sub>4</sub>O<sub>2</sub>)

**Lösung für die Coomassie-Färbung:**

Coomassie-Brillant-Blau R-250 Färbelösung:

0,4% (m/V) Coomassie-Brillant-Blau R-250

40% (V/V) Ethanol (C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>OH)

7% (V/V) Essigsäure

Fixier- /Entfärbelösung:

25% (V/V) Methanol

12,5% (V/V) Essigsäure

**Lösungen für Western Blot-Analysen:**

Transferpuffer:

39 mM Glycin

48 mM Tris

0,037% (m/V) SDS

20% (V/V) Methanol

Blockierlösung für die Immundetektion:

PBS-Tween pH 7,4

5% (m/V) Magermilchpulver



**Lösungen für die Aufreinigung des BARB-4 Antikörpers:**

Bindungs-/Waschpuffer pH 7,0:

50 mM Natriumphosphat ( $\text{Na}_3\text{PO}_4$ )

1,5 M NaCl

0,1 M Arginin

10 mM Na-EDTA x  $2\text{H}_2\text{O}$

Elutionspuffer pH 3,8:

0,1 M Arginin

0,1 M NaCl

Neutralisationspuffer:

1 M Tris pH 8,0

**Lösungen für die Affinitätschromatographie zur Aufreinigung des BARB-4**

**Antigens:**

Kopplungspuffer pH 8,3:

0,1 M Natriumhydrogencarbonat ( $\text{NaHCO}_3$ )

0,5 M NaCl

Acetat-Puffer pH 4:

0,1 M Essigsäure,

0,5 M NaCl

Bindungs-/Waschpuffer:

PBS pH 7,4

Elutionspuffer:

0,1 M Glycin pH 2,2

Neutralisationspuffer:

1 M Tris pH 9,0

Lagerungspuffer für die Säule:

PBS pH 7,2

0,05% (m/V) Natriumacid ( $\text{NaN}_3$ )

**Reaktionspuffer für den enzymatischen Verdau mit Glykosidasen:**

Reaktionspuffer:

PBS pH 7,4

1% (V/V) Nonidet-P40

1% (V/V)  $\beta$ -Mercaptoethanol

**Lösungen für die Molekularbiologie:**

TBE-Puffer:

45 mM Tris

45 mM Borsäure

1 mM Na-EDTA x  $2\text{H}_2\text{O}$

Agarosegel mit 1  $\mu\text{g}/\text{ml}$  Ethidiumbromid (1%ig und 1,5%ig):

0,4 bzw. 0,6 g Agarose

4  $\mu\text{l}$  Ethidiumbromidlösung (10 mg/ml)

Ad 40 ml mit TBE-Puffer

**Lösung für FACS-Analysen:**

Permeabilisierungslösung:

PBS pH 7,4

0,5% (m/V) Saponin

**Lösungen für die Konfokalmikroskopie:**

0,1 M Carbonatpuffer zum Umpuffern pH 9,2:

Reagenz A: 0,2M Natriumcarbonat ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ )

Reagenz B: 0,2M Natriumhydrogencarbonat ( $\text{NaHCO}_3$ )

40ml Reagenz A und 460ml Reagenz B

Ad 1 l mit Millipore®-Wasser

Permeabilisierungslösung:

PBS pH 7,4

0,1% (V/V) Triton X-100

**2.1.3 Geräte****Tabelle 9: Geräte**

Gerät	Hersteller
Autoklav DX-45	Systec, Wettenberg
Autoklav V-75	Systec, Wettenberg
Bakterienschüttler/Incubator Shaker G25	New Brunswick Scientific, Edison, USA
Blotkammer (semi-dry)	Bio-Rad, München
Brutschränke Heracell	Heraeus Thermotech, Hanau
DNA-Sequencer 373	Applied Biosystems, Darmstadt
ELISA-Microplate-Reader 550	Bio-Rad, München
FACScan	BD Biosciences, San Jose, USA
Feinwaage Adventurer™	Ohaus, Nänikon Schweiz
<u>FPLC System:</u>	Pharmacia, Freiburg
Pump P-500	
Pump P-50	
Liquid Chromatography Controller LCC-550	
Single Path Monitor UV-1 (Control/Optical Unit)	
Motor Valve MV-7	
Superloop 30 ml	
Recorder REC-112	
Fraction Collector FRAC-100	
Gelelektrophoresekammern, Minigel Twin	Biometra, Göttingen
<u>Konfokales System:</u>	
Leica DMRE/UV Mikroskop	Leica Microsystems AG, Wetzlar
Innova® Ion Laser System	Coherent Inc., Santa Clara, USA
Kryostat 2800 Frigocut E	Reichert-Jung, Nussloch
Lyserad	Hartenstein, Würzburg
Magnetrührer GLW M23	Hartenstein, Würzburg
Mikroskop Leica DMLB	Leica Microsystems, Wetzlar
Mikroskop Olympus BX50	Olympus GmbH, Hamburg
Mikrotom SM 2000R	Leica Microsystems, Wetzlar
Mikrozentrifuge Eppendorf 5415 D	Eppendorf, Hamburg
Minifuge T	Heraeus, Hanau

Fortsetzung Tabelle 9: Geräte

Gerät	Hersteller
PCR-Mastercycler gradient	Eppendorf, Hamburg
pH-Meter inolab pH Level 1	WTW, Weilheim i.OB
Photometer GeneQuantPro	Amersham Biosciences, Freiburg
Photometer Uvikon 810	Kontron Instrument, Eching
Pipette 10 µl	Eppendorf, Hamburg
Pipetten 20, 100, 200, 1000 µl	Gilson, Middleton, USA
Pipettierhelfer accu-jet	Brand, Wertheim/Main
Reinstwassersystem Milli-Qplus PF	Millipore, Eschborn
Röntgenkassette (13 x 18)	Dr. Goos-Suprema GmbH, Heidelberg
Rüttler/Schüttler Unimax 1010	Heidolph Instruments, Schwabach
Shandon Histocentre®	Shandon, Frankfurt
Sonifikator Labsonic V	B. Braun, Melsungen
Spannungsgeräte Gene Power Supply GPS	Pharmacia, Freiburg
Sterilbank Lamin Air HLB 2448	Heraeus, Hanau
Thermoblock neoBlock 1	Neolab, Heidelberg
Tissue Tek VIP	Sakura, Zoeterwoude, Niederlande
Ultrazentrifuge L8-M	Beckmann, München
<u>UV-Transilluminator System :</u>	
UV-Transilluminator UVT-28 SE	Herolab, Wiesloch
Herolab ICU-1	Herolab, Wiesloch
Herolab SU-1	Herolab, Wiesloch
Monitor CDM-1003	Monacor, Zwischenwasser, Österreich
Druckersystem Print P91	Mitsubishi, Tokio, Japan
Videokamera 3CCD	Sony, Köln
Vortex Mixer 7-2020	Neolab, Heidelberg
Waage	Satorius, Göttingen
Wasserbad, WB10	Memmert, Schwabach
Wippschüttler	Neolab, Heidelberg
Zentrifuge Biofuge 15R	Heraeus Sepatech, Osternode
Zytospin Zentrifuge Cytospin 2	Shandon, Frankfurt

#### 2.1.4 Soft- und Hardware

Immunhistochemische Färbungen wurden mit einem Olympus Mikroskop und einer Sony Videokamera über das Programm Image Access 3.02 aufgenommen.

Abbildungen von Western Blots, Polyacrylamidgelen und ethidiumbromidgefärbten Agarosegelen wurden mittels Scanner (HP psc1350) im Durchlicht mit einer Auflösung von 300 dpi digitalisiert.

DNA- und Aminosäuresequenzanalysen wurden mit dem Programm DNAMAN 5.2 (Lynnon Biosoft®) durchgeführt. Sequenzvergleiche erfolgten über die NCBI-Datenbank.

FACS-Analysen wurden mit Hilfe des BD FACScan™ unter Verwendung der CellQuest Pro Software (Becton Dickinson, BD) durchgeführt. Die Datenauswertung erfolgte anschließend auf einem MS Windows NT-Rechner mit der WinMDI 2.8 Software.

Graphische Darstellungen, sowie statistische Auswertungen erfolgten mittels EXCEL (Microsoft). Des Weiteren wurde für die Statistik die Software R verwendet [155].

Immunfluoreszenzfärbungen wurden mit Hilfe eines konfokalen Systems aufgenommen, bestehend aus einem Leica UV-Mikroskop und einem Innova® Ionen Laser-System.

### 2.1.5 Zelllinien

Tabelle 10: Zelllinien

Zelllinie	Organ	Karzinomtyp	Wachstum	Verdopplungszeit [h]	Subkultivierung
A549	Lunge	Adenokarzinom	adhärent	40	1:10 alle 3Tage
BxPC-3	Bauchspeicheldrüse	Adenokarzinom	adhärent	40	1:10 alle 3 Tage
23123/87	Magen	Adenokarzinom	adhärent	30	1:8 alle 5-6 Tage
CRL-1424	Haut	Melanom	adhärent	40-60	1:10 alle 3-4 Tage
HTB-96	Haut	Melanom	adhärent	40-60	1:10 alle 3-4Tage

Die verwendeten Zelllinien wurden von der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ, Braunschweig) bezogen oder stammten ursprünglich aus dem Pathologischen Institut des Universitätsklinikums Würzburg (Arbeitsgruppe Vollmers). In Tabelle 10 sind die Daten zu den einzelnen Zelllinien aufgeführt. Diese umfassen die Verdopplungszeit sowie die Angaben zur

Subkultivierung. Die verwendeten Lymphozyten wurden nicht kultiviert. Sie wurden frisch aus humanem Blut mittels Ficoll isoliert (siehe Abschnitt 2.3.2). Die Escherichia coli Bakterienzellen, die innerhalb dieser Arbeit verwendet wurden, waren in dem pEXP5-CT/TOPO® TA Expression Kit (Invitrogen, Karlsruhe) enthalten.

## **2.2 Zellkultur**

### **2.2.1 Kultivierung von Karzinom- und Melanomzelllinien**

Die Anzucht der Zelllinien erfolgte in Zellkulturflaschen oder großen Gewebekulturschalen bei 37 °C und 7% CO<sub>2</sub> im Brutschrank. Die Zellen wurden in RPMI 1640 Medium, versetzt mit 10% (V/V) FCS, 1% (V/V) L-Glutamin (20 mM) und 1%(V/V) Penicillin/Streptomycin kultiviert. Die Karzinom- und Melanomzellen wurden, wie in Tabelle 10 beschrieben, in den Kulturflaschen subkultiviert, während die Karzinomzellen in den Gewebekulturschalen bis zur Konfluenz für die Membranpräparation herangezogen wurden. Beim Splitten unter der Sterilwerkbank wurde dabei das alte Kulturmedium abgesaugt und durch 5 ml Trypsin-EDTA-Lösung ersetzt. Dies löste die adhärenen Zellen innerhalb von wenigen Minuten vom Kulturflaschenboden ab. Durch Zugabe von 10 ml Kulturmedium wurde der Ablösevorgang gestoppt. Die Zellsuspension wurde 5 min bei 1500 upm zentrifugiert. Der entstandene Überstand wurde abgesaugt und verworfen, während das Zellpellet in einer entsprechenden Menge neuem Kulturmedium aufgenommen und resuspendiert wurde. 1 ml dieser Suspension wurde zusammen mit frischem Kulturmedium für die weitere Anzucht der Zelllinie in der Kulturflasche verwendet. Die Zellen wurden hierbei höchstens 4-6 Wochen in Kultur gehalten. Etwa alle 2 Wochen wurde eine neue Zellkulturflasche verwendet. Bei der Anzucht der Pankreaskarzinomzellen (BxPC-3) in Gewebekulturschalen wurde die beim Splitten übrig gebliebene Zellsuspension mit Hilfe von Kulturmedium auf ihr ursprüngliches Volumen verdünnt. Hiervon wurde dann je 1 ml in eine große Kulturschale mit 50 ml neuem Kulturmedium gegeben und kultiviert.

### **2.2.2 Kultivierung von BARB-4 produzierenden Hybridomzellen**

Die Kultivierung der BARB-4 Antikörper produzierenden Hybridomzellen 106/104-14 erfolgte im gleichen Kulturmedium und unter den gleichen Bedingungen wie bei den Karzinom- bzw. Melanomzellen (siehe Abschnitt 2.2.1). Die Hybridomzellen wurden hierbei bis zu einer Zelldichte von  $1 \times 10^8$  Zellen/ml herangezogen. Zur Subkultivierung wurden die Zellen in ein Zentrifugenröhrchen überführt und bei 1500 upm für 5 min zentrifugiert. Nach dem Entfernen des Überstandes wurde das Zellpellet in frischem Kulturmedium aufgenommen.  $\frac{1}{5}$  dieser Zellsuspension wurde für die weitere Kultivierung verwendet. Die Kulturüberstände mit den darin enthaltenen BARB-4 Antikörpern wurden gesammelt. Die Bestimmung der Antikörperkonzentration erfolgte anschließend mittels Nephelometrie in einem externen Labor (Neurologie, Universitätsklinikum Würzburg). Die Kulturüberstände wurden bis zu ihrer Verwendung bei  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  gelagert. Zwischen 8 und 10 Wochen wurden die Hybridomzellen dafür durchschnittlich in Kultur gehalten.

### **2.2.3 Kultivierung von Escherichia coli Bakterien**

Die im pEXP5-CT/TOPO® TA Expression Kit (Invitrogen, Karlsruhe) enthaltenen kompetenten Escherichia coli Zellen wurden nach den Angaben des Herstellers transformiert (siehe Abschnitt 2.6.9) und herangezogen. Für die Anzucht frisch transformierter Zellen wurden LB-Platten mit  $100\text{ }\mu\text{g/ml}$  Ampicillin verwendet. Diese wurden vor Gebrauch für 30 min bei  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  im Inkubator erwärmt. Anschließend wurden die transformierten Zellen mit  $250\text{ }\mu\text{l}$  SOC Medium (ebenfalls im Kit enthalten) versetzt. Um sicher zustellen, dass eine Platte die gewünschte Koloniedichte aufweist, wurden unterschiedliche Volumina ( $50\text{ }\mu\text{l}$  und  $200\text{ }\mu\text{l}$ ) der Escherichia coli Zellsuspension ausplattiert. Für eine bessere Verteilung der Bakteriensuspension auf den LB-Platten wurde vor dem Ausplattieren erneut  $20\text{ }\mu\text{l}$  SOC Medium dazugegeben. Die beimpften LB-Platten wurden über Nacht bei  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  inkubiert. Für weitere Analysen wurden mehrere einzelne Kolonien gepickt.

Für Plasmidminipräparationen und zum Einfrieren wurden Escherichia coli Schüttelkulturen angesetzt. Hierfür wurden die gepickten Kolonien in jeweils  $25\text{ }\mu\text{l}$  Millipore®-Wasser resuspendiert.  $20\text{ }\mu\text{l}$  dieser Zellsuspension wurden in  $3\text{ ml}$  LB-

Kulturmedium mit 100 µg/ml Ampicillin überführt und über Nacht im Schüttler bei 37 °C und 200 upm inkubiert.

### **2.2.4 Kryokonservierung eukaryontischer Zellen**

Die einzufrierenden Zellen wurden abzentrifugiert und auf Eis gestellt. Mit kaltem Kulturmedium (RPMI 1640, PAA, Wien) wurde das Pellet anschließend resuspendiert und auf eine Zellkonzentration von  $5 \times 10^6$  Zellen pro ml eingestellt. Zur Zellsuspension wurden anschließend 10% (V/V) FCS und 10% (m/V) DMSO dazu gegeben. Je 1 ml Suspension wurde in ein Kryoröhrchen (Nalgene 2 ml) überführt und bei -80 °C eingefroren. Nach zwei Wochen konnten die eingefrorenen Zellen in einen Stickstofftank überführt werden. Dort wurden die Zellen bis zu ihrer erneuten Verwendung gelagert.

### **2.2.5 Einfrieren von Escherichia coli Bakterien**

Aus einer Escherichia coli bewachsenen LB-Kulturplatte wurde eine einzelne Bakterienkolonie isoliert und in 3 ml flüssigem LB-Medium mit 100 µg/ml Ampicillin Zusatz kultiviert. Je 0,85 ml dieser Bakterienkultur wurden in ein Kryoröhrchen überführt und mit 0,15 ml sterilem Glycerin (85%) versetzt. Der Ansatz wurde bis zum erneuten Gebrauch bei -80 °C gelagert.

### **2.2.6 Auftauen eukaryontischer Zellen**

Die Zellen wurden aus dem Stickstofftank entnommen und vorsichtig aufgetaut. Kurz bevor das gesamte Eis geschmolzen war, wurde die Zellsuspension mittels Pipette resuspendiert, sofort in 10 ml Kulturmedium überführt und bei 1500 upm zentrifugiert. Der Überstand wurde anschließend abgesaugt, während das Zellpellet in frischem Kulturmedium in eine Zellkulturflasche überführt wurde.



### **2.2.7 Auftauen von Escherichia coli Bakterien**

Das bei  $-80\text{ °C}$  gelagerte Kryoröhrchen wurde bei Raumtemperatur aufgetaut. Die Escherichia coli Zellsuspension konnte anschließend in flüssigem LB-Medium oder in Kulturschalen kultiviert werden.

### **2.2.8 Zellzahlbestimmung**

Die Zellzahlbestimmung erfolgte unter dem Lichtmikroskop mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer. Hierfür wurden  $20\text{ }\mu\text{l}$  einer Zellsuspension mit  $180\text{ }\mu\text{l}$  einer 0,5%igen (m/V) Trypanblaulösung vermischt und in die Zählkammer pipettiert. Der Farbstoff ermöglicht dabei zwischen lebenden und toten Zellen zu unterscheiden. Während lebende Zellen nicht in der Lage sind den Farbstoff aufzunehmen und dadurch hell erscheinen, können tote Zellen den Farbstoff absorbieren und sind dadurch dunkelblau gefärbt. Bei der Zellzahlbestimmung wurde die Lebendzellzahl einer Probe bestimmt. Hierfür wurden vier große Quadrate (bestehend aus 16 kleinen Quadraten) für jeweils eine Probe ausgezählt. Anschließend wurde die Durchschnittszellzahl ermittelt. Diese wurde danach mit dem Umrechnungsfaktor  $10^4$  (Kammerfaktor) multipliziert. Der Faktor resultiert dabei aus der Umrechnung des Volumens eines großen Quadrats von  $0,1\text{ }\mu\text{l}$  auf  $1\text{ ml}$  Zellsuspensionsvolumen. Zusätzlich musste noch der Verdünnungsfaktor von 10 mit einbezogen werden. Der dadurch erhaltene Wert stellt die Anzahl der lebenden Zellen pro ml Suspension dar.

## **2.3 Zellbiologische Methoden**

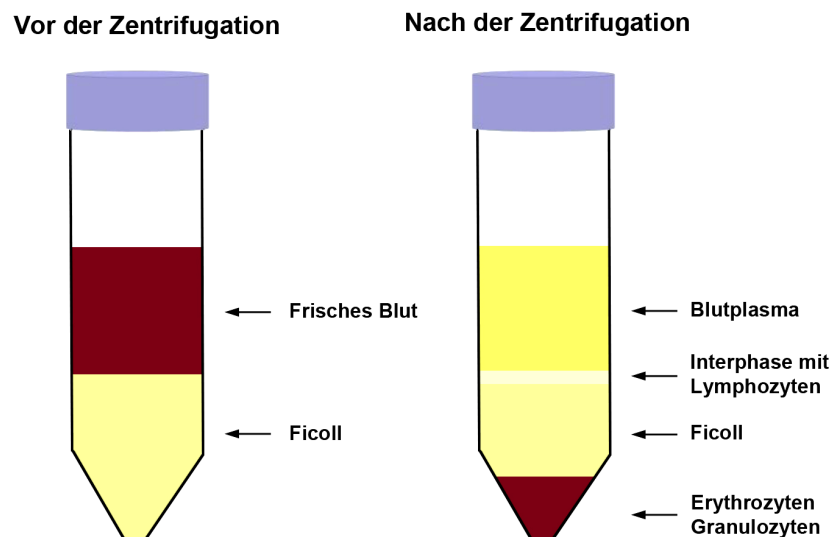
### **2.3.1 Ernten der Karzinomzellen für die Membranpräparation**

Nach erreichter Konfluenz wurde der Überstand der Zellkulturschalen abgegossen und verworfen. Die adhärenenten Pankreaskarzinomzellen BXPC-3 wurden zweimal großzügig mit PBS gewaschen und anschließend mit einem Gummischaber vom Kulturschalenboden abgelöst. Um den Zellverlust möglichst gering zu halten, wurde die Zellkulturschale erneut mit PBS gewaschen und abgeschabt. Die entstandene

Zellsuspension wurde bei 1500 upm 5 min zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, während das Zellpellet wieder in PBS resuspendiert und gewaschen wurde. Die Suspension wurde anschließend nochmals bei 1500 upm 5 min zentrifugiert. Nach dem Entfernen des Überstands wurde das Zellpellet direkt für die Membranpräparation eingesetzt, oder zur Lagerung bei  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  tiefgefroren. Dabei wurden für ein Pellet 10 Kulturplatten verwendet.

### 2.3.2 Isolierung von Lymphozyten aus humanem Frischblut

Die Isolierung der Lymphozyten aus dem humanen Frischblut erfolgte mittels Ficoll. Dies ist ein leicht wasserlösliches Polysaccharid aus Epichlorhydrin und Saccharose, welches vorwiegend zur Isolierung von mononukleären Zellen eingesetzt wird [156-158]. Das Separationsmedium FicoLite-H (Linaris, Wertheim-Bettingen) wurde hierfür mit der gleichen Menge humanem Frischblut überschichtet und für 30 min bei 1800 upm zentrifugiert. Dadurch bildet sich ein Dichtegradient aus, bei dem sich die Blutbestandteile ihrer Dichte entsprechend in unterschiedlichen Phasen (siehe Abbildung 5) ansammeln.



**Abbildung 5: Dichtegradientenzentrifugation mit Hilfe von Ficoll.** Die linke Abbildung zeigt den Probenansatz vor der Zentrifugation, die rechte Abbildung stellt die Probe nach der Zentrifugation (1800 upm, 30 min) dar. Durch die Zentrifugation entstehen vier unterschiedliche Phasen. Die oberste Phase enthält das Blutplasma. Darunter liegt die Interphase mit den Lymphozyten. Unter der Interphase befindet sich eine Schicht mit der Ficoll-Lösung. Die unterste Phase bilden die Zellen mit der höchsten Dichte, die Erythrozyten und Granulozyten.

Die Lymphozyten, die sich in der Interphase befinden, wurden anschließend mit einer Pasteurpipette vorsichtig abgesaugt und in einem 50 ml Röhrchen mit 10 ml PBS-Puffer vermischt. Die Zellsuspension wird erneut zentrifugiert (1800 upm, 10 min). Der Überstand wurde verworfen, während das entstandene Zellpellet anschließend zweimal mit jeweils 10 ml PBS gewaschen und zentrifugiert (1800 upm, 10 min) wurde. Das Zellpellet wurde danach in 10 ml Erythrozytenlysepuffer resuspendiert und für 15 min auf Eis inkubiert. Hierdurch wurden die in der Interphase verbliebenen Erythrozyten lysiert. Die Lymphozytensuspension wurde mit 10 ml PBS aufgefüllt und für 10 min bei 300 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde anschließend verworfen und das Pellet in 10 ml PBS resuspendiert und erneut zentrifugiert (10 min, 300 x g). Das dadurch entstandene Pellet wurde nach Entfernen des Überstandes nochmals in 10 ml PBS resuspendiert. Die Zellzahlbestimmung erfolgte mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer unter dem Lichtmikroskop (siehe Abschnitt 2.2.8).

### 2.3.3 Transfektion von Tumorzellen mit siRNA

Die Validierung des BARB-4 Targets erfolgte mit Hilfe der RNA-Interferenz (RNAi). Eine kleine, aus 21-23 Nukleotiden bestehende, doppelsträngige siRNA (*small interfering RNA*) induziert hierbei den Abbau einer entsprechenden mRNA. Dabei interagiert die siRNA nach dem Einschleusen in die Zelle mit dem sogenannten *RNA induced silencing complex* (RISC). Dies führt dazu, dass der Komplex die zur siRNA komplementäre Ziel-mRNA bindet und diese fragmentiert. Es kommt somit zum Abbau der mRNA und zu einer transienten (vorübergehenden) Regression der Proteinexpression des entsprechenden Zielmoleküls [159-162].

Für die Transfektion wurden BxPC-3 Zellen verwendet. Diese wurden durch eine sogenannte Lipofektion mit siRNA transfiziert. Einen Tag vor der Transfektion wurden in einer 24-well Zellkulturplatte pro Ansatz  $5 \times 10^4$  Zellen in 0,5 ml Kulturmedium ausgesät und über Nacht bei 37 °C und 7% CO<sub>2</sub> anwachsen gelassen. Die adhärennten Zellen wurden nach Erreichen einer Konfluenz von ca. 70% mit siLentFect™ (Bio-Rad Laboratories) entsprechend den Herstellerangaben transfiziert. Kurz vor Beginn der Transfektion wurde das verbrauchte Kulturmedium vorsichtig abgesaugt und durch frisches RPMI 1640 (versetzt mit Glutamin und FCS) ersetzt. Es wurden hierbei pro Ansatz 250 µl frisches Medium zu den Zellen gegeben. In der

zu untersuchenden Probe waren zusätzlich 50 µl der Transfektionsmischung enthalten. Dieser Transfektionsmix setzte sich aus 25 µl siLentFect™ in serumfreiem OptiMEM Medium so wie 25 µl einer entsprechenden siRNA-Verdünnung in OptiMEM zusammen und wurde in mehreren Arbeitsschritten hergestellt. Zuerst wurde die Stammlösung (2 µM) der siRNA mit dem serumfreien Medium OptiMEM versetzt, gut gemischt und 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurden 0,5 µl des Transfektionsreagenz siLentFect™ in 24,5 µl des serumfreien OptiMEM Mediums gemischt und ebenfalls 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden beide Mischungen zusammen pipettiert, vorsichtig gemischt und für 20 min bei Raumtemperatur stehen gelassen. Nach der Herstellung der Transfektionsmischung wurde diese zu den Zellen pipettiert und vorsichtig mit dem bereits vorhandenen Medium gemischt. Die Zellen wurden anschließend über einen Zeitraum von 48 h im Brutschrank bei 37 °C und 7% CO<sub>2</sub> inkubiert. Die Endkonzentration der siRNA lag bei 100 nM. Um zellschädigende Nebeneffekte zu vermeiden, wurde einen Tag nach der Transfektion bei jedem Ansatz das Medium gewechselt. Zusätzlich wurden Kontrollen durchgeführt. Unspezifische Effekte, die durch die siRNA in der Zelle verursacht werden können, wurden mit Hilfe von *Silencer*® Negative Control siRNA (Ambion) kontrolliert. Diese siRNA ist nicht in der Lage den RISC zu aktivieren und kann somit auch nicht das Zerschneiden einer entsprechenden mRNA bewirken. Sie wurde in der gleichen Konzentration eingesetzt wie die siRNA in der zu analysierenden Probe. Als weitere Kontrollen dienten Ansätze mit unbehandelten Zellen und Mocktransfektanten. Bei der Mocktransfektion wurden die Zellen mit allen Transfektionsbestandteilen außer mit siRNA versetzt. Hierdurch konnten zytotoxische Effekte, die durch das Transfektionsreagenz hervorgerufen werden, ausgeschlossen werden. Unbehandelte Zellen wurden ohne siRNA und ohne Transfektionsreagenz in 300 µl Medium (RPMI 1640 versetzt mit Glutamin und FCS) kultiviert. Die Auswirkungen der Transfektion auf die Expression des Zielmoleküls wurden anschließend mittels Western Blot, FACS-Analyse und immunhistochemischer Färbung von Zytospinpräparaten untersucht.

Die siRNAs, die für die Transfektion verwendet wurden, waren von Ambion oder Dharmacon. Es handelt sich dabei um siRNAs die über Datenbanken validiert wurden und eine Herabregulierung des Zielproteins garantieren.

### 2.3.4 MTT-Proliferationstest

Die Auswirkung des Antikörpers BARB-4 auf die Proliferation von Krebszellen wurde mit Hilfe des MTT-Proliferationstests analysiert [163]. Hierbei handelt es sich um einen quantitativen Test, bei dem die Stoffwechselaktivität lebender Zellen nachgewiesen werden kann. Dieser Test ermöglicht somit Rückschlüsse auf die Überlebensrate von Zellen bzw. den antiproliferativen Effekt des Antikörpers auf Zellen, die zuvor mit BARB-4 Antikörper behandelt wurden. Er liefert somit einen Hinweis auf die Anzahl der lebenden, proliferierenden Zellen.

Lebende Zellen wandeln gelbes Methyltetrazolium-Salz (MTT; 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid) in einer NADH und NADPH abhängigen Reaktion zu einem blauvioletten Formazanfarbstoff um. Dabei sind Farbintensität und Vitalität einander direkt proportional. Untersuchungen in den letzten Jahren deuteten darauf hin, dass die Reduktion des Tetrazoliums (MTT-Reagenz) hauptsächlich von den Enzymen des endoplasmatischen Retikulums abhängig ist und nicht, wie früher angenommen, von den mitochondrialen Succinat-Dehydrogenasen. Diese Dehydrogenasen (Reduktasen) stoffwechselaktiver Mitochondrien sind zwar partiell an der Reduktion beteiligt, spielen aber eher eine untergeordnete Rolle. Die Menge des gemessenen Farbstoffs entspricht somit eher der Glykolyserate der Zellen als der Zellatmung. Das Ausmaß der blauvioletten Färbung wird spektrometrisch quantitativ erfasst [164-166].

Für die Analyse wurden die zu untersuchenden Zellen auf eine Zellzahl von  $1 \times 10^6$  Zellen pro ml Zellsuspension eingestellt. Auf einer 96-well Platte wurde pro Loch eine Zellzahl von  $4 \times 10^5$  Zellen angesetzt, wobei jeweils 50  $\mu$ l der eingestellten Zellsuspension in die einzelnen Löcher pipettiert wurden. Der Antikörper BARB-4 und die entsprechende Isotypkontrolle (ChromPure IgG) wurden anschließend auf eine Konzentration von 200  $\mu$ g/ml eingestellt. Als Negativkontrolle diente Kulturmedium ohne Antikörperzusatz. Von den entsprechenden Lösungen wurden je 50  $\mu$ l zu den Zellen gegeben, so dass jeweils ein Gesamtvolumen von 100  $\mu$ l vorlag. Die antikörperhaltigen Ansätze enthielten somit eine Endkonzentration von 100  $\mu$ g/ml Antikörper. Für die Analyse wurden jeweils 4-fach Bestimmungen der Ansätze durchgeführt. Die 96-well Platten wurden hierfür bei 37 °C und 7% CO<sub>2</sub> für 48 h im Brutschrank inkubiert. Anschließend wurden pro Loch 50  $\mu$ l einer MTT-Lösung (5 g MTT in 1 ml PBS) zugegeben. Die Ansätze wurden danach erneut für 30 min im

Brutschrank inkubiert und anschließend zentrifugiert (2800 upm, 10 min). Nachfolgend konnte der Überstand vorsichtig aus den einzelnen Löchern abgesaugt werden. Die Zellen wurden anschließend in 150 µl Dimethylsulfoxid (DMSO) lysiert, wobei der kristalline Formazanfarbstoff freigesetzt wurde und in löslicher Form vorlag. Die Farbintensität der einzelnen Lösungen wurde mittels ELISA-Microplate-Reader bestimmt. Für den Nullabgleich (Hintergrundkontrolle) wurde die Absorption eines Ansatzes bestimmt, der nur die jeweiligen Lösungen und Kulturmedium, jedoch keine Zellen enthielt. Die Absorption wurde hierbei sowohl bei einer Messwellenlänge von 540 nm wie auch der Referenzwellenlänge von 690 nm gemessen. Die Differenz (540 nm - 690 nm) der beiden gemessenen Absorptionen spiegelte den Einfluss des Antikörpers auf das Zellwachstum wieder.

### **2.3.5 Cell Death Detection ELISA<sup>PLUS</sup> Apoptosetest**

Der Einfluss des BARB-4 Antikörpers auf die Apoptose von Tumorzellen wurde mit Hilfe des Cell Death Detection ELISA<sup>PLUS</sup> Kits (Roche, Mannheim) gemessen. Der Test funktioniert dabei nach dem Prinzip eines quantitativen Sandwich-Enzym-Immunassays. Es werden hierfür peroxidasekonjugierte, murine, monoklonale Antikörper eingesetzt. Diese sind gegen Histon- bzw. DNA-Komponenten von Mono- und Oligonukleosomen gerichtet, die bei einer Apoptose entstehen. Durch eine enzymatische Umsetzung des farblosen Substrates entsteht ein grüner Farbstoff. Anhand der Farbintensität des grünen Reaktionsprodukts kann die Menge der vorhandenen Nukleosomen und somit die Anzahl an apoptotischen Zellen photometrisch bestimmt werden.

Für den Versuch wurde eine 96-well Zellkulturplatte angesetzt. Dabei wurden in jedes Loch 100 µl mit  $1 \times 10^4$  Zellen pipettiert. Die Zellen wurden anschließend mit dem BARB-4 Antikörper oder der Isotypkontrolle (ChromPure IgG) versetzt und im Brutschrank bei 37 °C und 7% CO<sub>2</sub> für 48 h inkubiert. Die Antikörper wurden auf eine Konzentration von jeweils 20 µg/ml verdünnt. Nach Zugabe von jeweils 100 µl dieser Verdünnung ergab sich eine Antikörperkonzentration von 10 µg/ml pro Loch. Als weitere Kontrolle dienten Zellen mit der gleichen Menge an Kulturmedium. Für die Analyse wurde eine doppelte Bestimmung der einzelnen Ansätze durchgeführt. Der

Versuch erfolgte nach den Angaben des Herstellers. Die dafür verwendeten Reagenzien waren alle im Cell Death Detection ELISA<sup>PLUS</sup> Kit vorhanden.

Nach 48 h Inkubation wurden die Tumorzellen bei 200 x g für 10 min zentrifugiert. Der Überstand wurde anschließend abgesaugt und 200 µl des Lysepuffers wurde zu den Zellen dazugegeben. Die Zellyse erfolgte dann für 30 min bei Raumtemperatur. Nach einer erneuten Zentrifugation wurden jeweils 20 µl des Überstandes in streptavidinbeschichtete Mikrotiterplatten pipettiert und anschließend 80 µl des Immunreagenzes hinzugefügt. Das Reagenz war dabei aus  $1/20$  Anti-Histon-Biotin,  $1/20$  Anti-DNA-POD sowie  $18/20$  Inkubationspuffer zusammengesetzt. Neben den Proben wurde außerdem eine im Kit enthaltene Positivkontrolle sowie ein Leerwert angesetzt. Nachdem die Platten 2 h bei ca. 250 upm auf dem Rüttler gut vermischt worden waren, wurden sie dreimal mit Inkubationspuffer (250 µl/well) gewaschen. Danach wurden 100 µl Substrat, bestehend aus einer ABTS-Tablette in 5 ml Substratpuffer, in jedes Loch pipettiert. Die einzelnen Ansätze wurden danach nochmals gut durchmischt. Die Farbentwicklung erfolgte bei Raumtemperatur innerhalb von 15 min und wurde anschließend durch die Addition von 100 µl Stopplösung beendet. Die Intensität dieser grünen Färbung lässt dabei Rückschlüsse auf den Grad der antikörperinduzierten Apoptose zu. Die Platte wurde im Anschluss daran sofort bei einer Messwellenlänge von 405 nm sowie der Referenzwellenlänge von 490 nm vermessen. Die spektrometrische Analyse erfolgte dabei im ELISA-Microplate-Reader.

### **2.3.6 Untersuchung der Tumorzelladhäsion unter Antikörpereinwirkung**

Für den Versuch wurden Pankreaskarzinomzellen (BxPC-3) mit Hilfe einer Trypsin-EDTA-Lösung von der Kulturflasche abgelöst und nach Abstoppen der Reaktion in neuem Kulturmedium resuspendiert. Der Ansatz wurde anschließend für 30 min auf Eis inkubiert. 200 BxPC-3 Zellen wurden danach sofort in 50 µl BARB-4 Antikörperlösung mit einer Konzentration von 200 µg/ml auf Objektträger überführt. Als Negativkontrollen dienten Zellen, die nur in Kulturmedium oder einem Isotypen mit der selben Konzentration inkubiert wurden. Nach einem Inkubationszeitraum von 30, 45 oder 60 min wurden die adhärennten Zellen mit 60% (V/V) Isopropanol fixiert

und mit Hämalaun 5 min angefärbt. Die gefärbten Zellen wurden danach unter dem Lichtmikroskop gezählt.

### **2.3.7 Untersuchung der Tumorzellmotilität unter Antikörpereinwirkung**

Es wurden jeweils  $1 \times 10^5$  BxPC-3 Zellen in eine 24-well Platte überführt und für 6 h bei 37 °C und 7% CO<sub>2</sub> inkubiert. Dadurch wurde eine Konfluenz von etwa 80% erreicht. In den vorhandenen Zellrasen wurde mit Hilfe einer Pipettenspitze ein Kreuz gekratzt. Anschließend wurde dem Ansatz sofort 400 µg/ml BARB-4 Antikörper zugesetzt. ChromPure IgG (400 µg/ml; Isotypkontrolle) und frisches Kulturmedium dienten dabei als Kontrollen. Die Pankreaskarzinomzellen wurden mit 5% (V/V) Glutaraldehyd fixiert und mit Hämalaun für 5 min angefärbt. Die Zellen wurden anschließend unter dem Lichtmikroskop hinsichtlich ihrer Zellmotilität ausgewertet.

## **2.4 Immunhistochemische Methoden**

### **2.4.1 Herstellung von Zytospinpräparaten**

Die Tumorzellen wurden mit 5 ml Trypsin-EDTA-Lösung von der Kulturflasche abgelöst und zusammen mit 10 ml Kulturmedium bei 1500 x g 5 min zentrifugiert. Danach wurde der Überstand abgesaugt und das Zellpellet in 10 ml neuem Kulturmedium resuspendiert. Die Zellzahl wurde anschließend auf  $4 \times 10^5$  Zellen/ml eingestellt und für 30 min auf Eis gestellt. Dies stellte die Regeneration der Oberflächenproteine nach dem Trypsinverau sicher. Je 100 µl der Zellsuspension wurden auf die entsprechend beschrifteten Objektträger zentrifugiert. Dies erfolgte mittels Zytospinzentrifuge bei 35 upm für 2 min. Die Objektträger wurden anschließend mindestens 2 h trocknen gelassen. Die fertigen Zytospins wurden entweder sofort immunhistochemisch angefärbt oder bei -20 °C gelagert.



### **2.4.2 Herstellung von Paraffinschnitten**

Zur Anfertigung von Paraffingewebeblöcken wurden humane Gewebeproben mit 4% (V/V) Formalin fixiert und anschließend maschinell entwässert (Tissue Tek VIP, Sakura). Das Gewebe wurde danach in flüssiges Paraffin überführt und mittels Histocentergerät (Shandon) eingebettet. Nach dem Erkalten des Paraffins bei -20 °C für 30 min konnten mit Hilfe eines Mikrotoms 2 µm dicke Gewebsschnitte hergestellt werden. Die Gewebsschnitte wurden direkt nach dem Schneiden zur Entspannung in ein Wasserbad mit Raumtemperatur überführt und anschließend zum Strecken in ein 30 °C warmes Wasserbad gelegt. Die gestreckten Schnitte wurden anschließend auf Objektträger aufgetragen. Bis zur Weiterverarbeitung konnten die Schnitte unter trockenen Bedingungen bei Raumtemperatur gelagert werden.

### **2.4.3 Immunperoxidasefärbung**

Mit Hilfe von Immunperoxidasefärbungen ist es möglich, bestimmte zelluläre Strukturen farblich zu kennzeichnen. Die Färbung basiert dabei auf der Erkennung spezifischer Antigenepitope durch Primärantikörper. Durch den Einsatz peroxidasekonjugierter Sekundärantikörper, welche gegen den Fc-Teil dieser spezifischen Immunglobulinen gerichtet sind, färben sich die von den Primärantikörpern gebundenen Gewebeareale nach enzymatischer Substratumsetzung braun. Der BARB-4 Antikörper sowie die entsprechende Isotypkontrolle (ChromPure IgG) wurden für diese Färbungen teilweise biotinyliert verwendet. Dies bewirkt zwar eine verstärkte Färbung, ändert an der Spezifität des Primärantikörpers jedoch nichts.

#### **2.4.3.1 Biotinylierung des BARB-4 Antikörpers**

Die Biotinylierung erfolgte mit Hilfe des EZ-Link Maleimide-PEO Solid Phase Biotinylation Kit (Pierce, Rockford, USA) nach den Angaben des Herstellers. Die verwendeten Reagenzien und Materialien waren im Kit enthalten.

Für die Analyse wurde die Antikörperkonzentration auf 1 mg/ml eingestellt. Je 500 µl dieser Lösung wurden mit einer Swell-Gel Disc versetzt und vermischt (ohne Vortex). Anschließend wurde der Ansatz für 10 min auf dem Rüttler inkubiert und bei 500 x g 30 s zentrifugiert. Der Überstand wurde entfernt, während das Pellet zweimal mit 1 ml TBE gewaschen wurde. Danach wurde das Pellet in 300 µl TBS resuspendiert und in eine *Spin-Column* überführt. Der Ansatz wurde bei 500 x g 30 s zentrifugiert. Der Überstand wurde wieder verworfen, während das Pellet in einer TCEP-TBS-Lösung (pro Reaktionsgefäß 120 µl TCEP und 80 µl TBS) resuspendiert und 30 min inkubiert wurde. Nach erneuter Zentrifugation (500 x g, 30 s) wurde das Pellet fünfmal mit 400 µl TBS gewaschen und anschließend in 100 µl TBS aufgenommen. Der Inhalt eines Biotin-Microtubes wurde vorsichtig mit 200 µl TBS vermischt. Davon wurden dann je 100 µl zu dem resuspendierten Pellet gegeben und für 30 min inkubiert. Der Ansatz wurde im Anschluss wieder zentrifugiert und fünfmal mit TBS gewaschen. Das Pellet wurde dann in 200 µl Elutionspuffer (9,5% Stock Solution in TBS) resuspendiert und für 10 min inkubiert. Der Durchfluss mit den biotinylierten Antikörpern wurde während eines weiteren Zentrifugationsschritts aufgefangen. Der Elutionsvorgang wurde zweimal wiederholt. Der im Durchlauf vorhandene Antikörper konnte direkt für die Färbung verwendet oder bei -20 °C für längere Zeit gelagert werden. Für immunhistochemische Analysen wurde sowohl BARB-4 als auch ChromPure IgG (Isotypkontrolle) biotinyliert.

### **2.4.3.2 Immunperoxidasefärbung von Zytospinpräparaten**

Die Zytospinpräparate wurden mittels Aceton in Objektträgerküvetten zuerst 10 min fixiert und anschließend 30 min getrocknet. Danach wurden die Präparate mit Tris-NaCl-Puffer gewaschen. Dieser Vorgang wurde dreimal wiederholt, wobei die Präparate nach dem dritten Waschen für 5 min in dieser Lösung verblieben. Zur Feuchthaltung der Zellen wurden die weiteren Schritte in einer Sättigungskammer durchgeführt. Die Objektträger wurden zur Beseitigung unspezifischer Bindungsstellen 30 min in 3%iger (m/V) Magermilchpulverlösung (Blockierlösung I für Immunperoxidasefärbung) inkubiert. Nach erneutem, dreimaligem Waschen mit Tris-NaCl wurden die Zytospinpräparate mit 100 µl der jeweiligen Erstantikörperlösung

30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Beim Auftragen des Zweitantikörpers nach drei weiteren Waschgängen wurde ebenso verfahren. Die Präparate wurden anschließend noch dreimal mit Tris-NaCl-Puffer gewaschen bevor sie für 10 min in PBS inkubiert wurden. Eine 3,3'-Diaminobenzidin- (DAB-) und eine Wasserstoffperoxidtablette (SigmaFAST™ DAB Tablets) wurden zusammen in 1 ml Leitungswasser aufgelöst. Dies verhindert, dass die Zellen durch den osmotischen Druck von destilliertem Wasser platzen. 100 µl dieser Lösung wurden unverzüglich auf die Objektträger pipettiert. Der Ansatz wurde für 10 min dunkel gehalten und anschließend mit destilliertem Wasser abgespült. Die Zellen wurden 5 min in Hämalaun inkubiert. Die überschüssige Färbelösung wurde etwa 15 min lang unter fließendem Wasser abgespült. Die fertig gefärbten Zytospinpräparate wurden bis zum Eindeckeln in destilliertes Wasser gestellt. Anschließend wurden lichtmikroskopische Analysen durchgeführt. Die für die immunhistochemische Färbung verwendeten Antikörper sind nachfolgend in Abschnitt 2.4.3.3 Tabelle 11 zusammengefasst.

### **2.4.3.3 Immunperoxidasefärbung von Paraffinschnitten**

Vor der immunhistochemischen Färbung wurden die Paraffinschnitte entparaffinisiert. Dazu wurden die Schnitte nacheinander in folgenden Lösemitteln inkubiert:

- 2 x 5 min 100% Xylol
- 2 x 5 min 100% Ethanol
- 1 x 5 min Methanol (70 ml + 500 µl H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)
- 2 x 3 min 90% Ethanol
- 2 x 3 min 80% Ethanol
- 2 x 3 min 70% Ethanol

Die entparaffinisierten Schnitte wurden anschließend mit einer Demaskierungslösung (Demaskierungslösung G, Biologo, Kronshagen) behandelt, da in formalinfixierten Geweben viele Antigene durch Quervernetzung der Proteine für die entsprechenden Antikörper nicht mehr zugänglich sind. Die Demaskierungslösung auf Glykolbasis wirkt dem entgegen und verbessert somit die Detektierbarkeit der Antigene. Die Schnitte wurden, nachdem sie kurz in Tris-Puffer gesammelt wurden, für 20 min in

Demaskierungslösung G (1:4 in PBS) gekocht (Wasserbad, 99 °C). Anschließend wurden die Objektträger für 5 min in Tris-NaCl-Puffer inkubiert. Die nachfolgende immunhistochemische Färbung wurde nach dem gleichen Protokoll wie unter Abschnitt 2.4.3.2 beschrieben durchgeführt. Im Unterschied zur Färbung von Zytospins, wurden bei den Paraffinschnitten die jeweiligen Primärantikörper 2½ Stunden bei 37 °C und die jeweiligen Sekundärantikörper 45 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die für die immunhistochemische Färbung eingesetzten Antikörper sind in Tabelle 11 aufgelistet.

**Tabelle 11: Antikörper für die immunhistochemische Färbung**

	<b>Antikörper</b>	<b>Konzentration/ Verdünnung</b>
<b>Primärantikörper</b>	BARB-4 IgG, Human	100 µg/ml*
	BARB-4 IgG biotinyliert, Human	50-100 µg/ml*
	Anti-TAF15, IgG, Rabbit (GeneTex)	40 µg/ml *
<b>Isotypkontrollen</b>	Chrompure IgG, Human	100 µg/ml*
	Chrompure IgG biotinyliert , Human	50-100 µg/ml*
	Serum IgG, Rabbit	40 µg/ml*
<b>Positivkontrollen</b>		
Pankreas (Adeno)	Anti human Cytokeratin CAM 5.2 IgG, Mouse	1:10*
Lunge (Adeno)		
Blase (Urothel)	Anti human Cytokeratin 18 IgG, Mouse	1:10*
Hoden (Keimzellen)		
Kolon (Adeno)	Anti human Cytokeratin AE1/AE3 IgG, Mouse	1:50*
Magen (Adeno)		
Prostata (Adeno)	Anti human PSA IgG, Mouse	1:20*
Lunge (Plattenepithel)	Anti human Cytokeratin 5/6 IgG, Mouse	1:50*
Ösophagus (Plattenepithel)		
<b>Sekundärantikörper</b>	Rabbit anti human, HRP-gekoppelt	1:50**
	NeutrAvidin™, HRP-gekoppelt	1:100****
	Goat anti rabbit, HRP-gekoppelt	1:50***
	Rabbit anti mouse, HRP-gekoppelt	1:50***
* Verdünnt in 0,5% (m/V) BSA/ PBS		
** Verdünnt in PBS und 30% (V/V) Kaninchenserum		
*** Verdünnt in PBS und 30% (V/V) Humanserum		
**** Verdünnt in PBS		

## 2.5 Biochemische Methoden

### 2.5.1 Membranproteinpräparation von Karzinomzellen

Frisch geerntete BxPC-3 Pankreaskarzinomzellen, welche für die Membranpräparation in Zellkulturschalen kultiviert wurden (siehe Abschnitt 2.3.1), konnten gleich verarbeitet werden. Gefrorene Zellpellets, die mit Hilfe dieser Methode gewonnen wurden, mussten vor Gebrauch bei Raumtemperatur erst aufgetaut werden. Ein Zellpellet aus 10 Kulturschalen wurde in 10 ml Quellpuffer resuspendiert und 30 min auf Eis gestellt. Dabei quollen die Zellen aufgrund des osmotischen Drucks auf. Anschließend wurde die Suspension bei 4 °C und höchster Frequenz für 5 min sonifiziert (Sonifikator Labsonic V, B. Braun, Melsungen). Durch die Behandlung mit Ultraschall kam es zum Aufbrechen der Zellen. Die Suspension wurde anschließend bei 4 °C und 13.000 upm für 10 min zentrifugiert. Der hierbei entstandene Überstand wurde vorsichtig abpipettiert und in Ultrazentrifugenröhrchen gleichmäßig verteilt (maximale Abweichung untereinander: 0,02 g). Anschließend wurde mit Hilfe des SW55-Rotors und einer entsprechenden Ultrazentrifuge (Beckmann, München) der Überstand unter Vakuum zentrifugiert (10 °C, 40.000 upm, 45 min). Der dabei entstandene, neue Überstand wurde verworfen. Die Zellpellets, welche die gewünschten Membranproteine beinhalteten, wurden mit 1 ml Quellpuffer vorsichtig gewaschen. Danach wurde jedes Pellet mit 1 ml Membranlysepuffer versetzt und resuspendiert. Diese Membranproteinfraktionen wurden dann in ein Eppendorfgefäß überführt und für 1 h am Lyserad bei 4 °C inkubiert. Sie wurden während der Lyse mehrfach durch feine Kanülen (G19, G26) gedrückt. Das Lysat wurde, um unlösliche Partikel zu entfernen, abschließend bei 4 °C und 13.000 upm 5 min zentrifugiert. Der Überstand des Lysats wurde aliquotiert und bei -20 °C eingefroren. Alle Arbeitsschritte wurden dabei bei 4 °C oder auf Eis durchgeführt. Die mit Hilfe dieser Methode erhaltenen Membranproteinlysate wurden anschließend für die Gelelektrophorese, Western Blot-Analysen und die Aufreinigungen mittels Affinitätschromatographie verwendet.

### 2.5.2 Quantitative Bestimmung von Proteinen

Die Bestimmung einer Proteinkonzentration erfolgte je nach Beschaffenheit der Probe durch unterschiedliche Verfahren. Antikörperkonzentrationen wurden extern (Neurologie des Universitätsklinikums Würzburg) mit Hilfe der Nephelometrie bestimmt.

Zur Bestimmung der Proteinkonzentration von Membranextrakten wurde die Bicinchoninsäure- (*bicinchoninic acid*, BCA-) Methode nach Smith (1985) angewandt [167]. Diese Methode besitzt den Vorteil, dass mit ihr in Gegenwart von vielen Puffern und Detergenzien die Proteinkonzentration gut quantifiziert werden kann. Sie wird daher bei Probelösungen eingesetzt, die beispielsweise SDS oder Triton X-100 enthalten. Das Prinzip dieses Nachweises beruht dabei auf der Bildung eines violetten Komplexes, dessen Absorptionsmaximum bei 562 nm liegt. Hierbei reagieren zwei Moleküle Bicinchoninsäure mit einem einwertigen Kupferion unter Bildung eines Chelatkomplexes. Dieses einwertige Kupferion wird im alkalischen Milieu aus einem zweiwertigen Kupferion gebildet, welches durch bestimmte Aminosäuren (Cystein, Trypsin und Tryptophan) sowie die Peptidbindung reduziert wird [168-169].

Für die Analyse wurden 49 Teile BCA-Protein Assay Reagent A mit einem Teil 4%iger (m/V) Kupfersulfatlösung vermischt. Diese Mischung wurde kurz vor Gebrauch frisch hergestellt. Sie diente bei der spektroskopischen Bestimmung als Verdünnungslösung oder als Nullabgleich. Es wurde eine Verdünnungsreihe mit fünf unterschiedlichen BSA-Konzentrationen erstellt (1, 2, 5, 10 und 20 µl einer 1 mg/ml konzentrierten BSA-Lösung in 1 ml Verdünnungslösung). Sie wurde zur Ermittlung der Absolutwerte mittels Eichgerade benötigt. Die Proben für die Proteinbestimmung wurden zwischen 1:50 und 1:200 (Verhältnis von Probe zu Verdünnungslösung) verdünnt. Die Ansätze kamen anschließend sofort für 30 min bei 37 °C in den Inkubator. Dabei kommt es zu einem Farbumschlag von grün zu violett. Die Absorption der Ansätze wurde sofort bei einer Wellenlänge von 562 nm gemessen. Die Proben wurden bei dieser Analyse mindestens doppelt bestimmt.

### 2.5.3 Aufkonzentrierung von Proteinen

Je nach Menge der enthaltenen Proteine wurden die Proteinlösungen mit Hilfe von Aceton aufkonzentriert. Hierzu wurde 1 Teil der Proteinlösung mit 3 Teilen eiskaltem Aceton versetzt. Der Ansatz lagerte anschließend bei  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  über Nacht im Gefrierschrank. Dabei kam es zur Ausfällung der Proteine. Die Suspension wurde anschließend bei  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  und  $13.000\text{ upm}$  10 min abzentrifugiert, wobei der Überstand verworfen wurde. Das Zellpellet wurde bei Raumtemperatur so lange getrocknet, bis kein Acetongeruch mehr wahrnehmbar war. Danach wurde das Pellet in der entsprechenden Menge Membranlysepuffer oder Ladepuffer mit DTT (1 M) resuspendiert. Das Verhältnis von DTT zu Ladepuffer betrug dabei 1:10.

### 2.5.4 Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die Auftrennung von Proteinen erfolgte elektrophoretisch durch eine vertikale Flachgelelektrophorese nach der Methode von Laemmli (1970) [170]. Für die Analyse wurden  $1,0\text{ mm}$  dicke,  $10\%$ ige (V/V) Polyacrylamidgele (Zusammensetzung gemäß Sambrook et al. (1989)) eingesetzt [171]. Die Auftrennung der Proteine erfolgt bei dieser Methode über die Proteingröße [172]. Um den Einfluss von Proteinladungen zu minimieren, welche die Wandergeschwindigkeit beeinflussen können, wurde Natriumdodecylsulfat (*sodium dodecyl sulfate*, SDS) eingesetzt. Das Detergenz bindet an die Proteine, überdeckt deren Eigenladung und sorgt somit für eine gleichmäßig negative Ladung und Wandergeschwindigkeit der Proteine. Die zu untersuchenden Proteinlösungen wurden für die Analyse je nach Konzentration mit 1-fach oder 5-fach Gelladepuffer und entsprechender Menge DTT (1M) aufgenommen und bei  $95\text{ }^{\circ}\text{C}$  für 5 min erhitzt. Dabei wurden die Proteine durch die Hitze denaturiert und durch DTT reduziert. Die Probenlösungen wurden nach dem Befüllen der Elektrophoreseapparatur mit Laemmli-Laufpuffer und der Befestigung des Gels in der Kammer in die einzelnen Geltaschen pipettiert (max.  $20\mu\text{l}$  pro Probe). Die Proteine wurden danach für ca. 1,5 h bei 20 mA pro Gel mit Hilfe der Apparatur aufgetrennt. Durch den peqGOLD Proteinmarker II (Trennbereich: 10 bis 200 kDa), der ebenfalls auf das Gel mitaufgetragen wurde, konnten anschließend Aussagen

über die Größe einzelner Proteine gemacht werden. Die Gele wurden nachfolgend für die Coomassie-Färbung oder Western Blot-Analysen verwendet.

### **2.5.5 Coomassie-Färbung**

Zum Sichtbarmachen und Fixieren der mittels SDS-PAGE aufgetrennten Proteine wurde das Gel nach der Gelelektrophorese für mindestens 15 min in eine Coomassie-Brillant-Blau R-250 Färbelösung gelegt. Hierbei lagert sich der Farbstoff an den hydrophoben Aminosäuren (Arginin, Lysin und Histidin) des Proteins an. Neben den hydrophoben Wechselwirkungen können des Weiteren auch Van-der-Waals-Kräfte an der Adsorption an das Protein beteiligt sein [173]. Nach dem Anfärben wurde das Gel mehrfach mit Fixier-/Entfärbelösung gewaschen, wobei es zwischen den einzelnen Waschschrritten jeweils ca. 15-30 min in dieser Lösung auf dem Rüttler inkubiert wurde. Dieser Vorgang wurde so lange wiederholt, bis sich der Hintergrund des Gels entfärbt hatte und die blauvioletten Proteinbanden gut sichtbar waren. Mit Hilfe der Coomassie-Färbung ist es möglich, Proteine auch in geringen Konzentrationen (50-100 ng) nachzuweisen [174].

### **2.5.6 Western Blot-Analysen**

Die durch SDS-PAGE aufgetrennten Proteine wurden nach der Methode von Towbin et al. (1979) mittels Western Blot-Apparatur (semi-dry; Bio-Rad, München) vom Gel auf eine Nitrozellulosemembran übertragen [175]. Hierzu wurden Filterpapiere und Membran entsprechend zurechtgeschnitten und genau wie das Polyacrylamidgel kurz im Transferpuffer inkubiert. In der Blot-Kammer wurden die einzelnen Materialien dann nach dem Sandwich-Prinzip zusammengesetzt. Es wurde dabei ein Stapel aus 3 Schichten Filterpapier, der Membran, dem Gel und anschließend nochmals 3 Schichten Filterpapier erstellt. Der Proteintransfer erfolgte anschließend bei 70 mA für 1 h. Zur Kontrolle des Transfers wurden die Proteine auf der Nitrozellulose mit Ponceau S-Lösung angefärbt. Der Membranmarker wurde dabei mittels Kugelschreiber nachgezogen, um nach dem Entfärben eine dauerhafte



Markierung zu erhalten. Anschließend wurde die Membran mit PBS-Tween komplett entfärbt und direkt für die Immundetektion verwendet oder bis zur weiteren Verwendung bei  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  gelagert.

### **2.5.7 Immundetektion von Proteinen auf Nitrozellulosemembran**

Die durch SDS-PAGE aufgetrennten Proteine wurden nach Transfer auf die Nitrozellulosemembran mit Hilfe von Antikörpern immunologisch nachgewiesen. Die eingesetzten Primär- und Sekundärantikörper wurden dabei in einer 5%igen (m/V) Magermilchpulverlösung (Magermilchpulver in PBS-Tween) verdünnt. Um unspezifische Bindungsstellen auf der Membran abzusättigen, wurde diese zuerst für 1 h in Blockierlösung (5%iger (m/V) Magermilchpulverlösung) inkubiert. Anschließend erfolgte eine Inkubation mit Primärantikörpern (BARB-4 200-300  $\mu\text{g/ml}$ , TAF15 3  $\mu\text{g/ml}$ ) für 1 h. Nach dreimaligem Waschen mit PBS-Tween für je 10 min wurde die Nitrozellulosemembran mit einem entsprechenden Meerrettichperoxidase (*horseradish peroxidase*, HRP-) gekoppelten Sekundärantikörper (Verdünnung 1:1000) inkubiert. Nach erneutem Waschen (3 x 5 min) erfolgte die Detektion mittels Chemolumineszenz. Hierfür wurde ein Kit (SuperSignal® West Pico Chemiluminescent Substrate) der Fa. Pierce verwendet. Die beiden im Kit enthaltenen Lösungen wurden dabei im Verhältnis 1:1 (je 2 ml) gemischt. Die Membran wurde anschließend für 3 min in der Mischung inkubiert und danach in eine Röntgenkassette überführt. Zur Detektion der Chemolumineszenz wurden Fuji Medical X-Ray Filme Super RX verwendet. Abhängig von dem zu detektierenden Protein wurden sie zwischen 30 s und 10 min belichtet und mit Kodak GBX Entwickler- und Fixierlösung in den vom Hersteller empfohlenen Verdünnungen entwickelt. Die Chemolumineszenz der Proteindetektion war als schwarze Bande auf dem Blot zu erkennen.

### 2.5.8 Aufreinigung von Proteinen

Die Proteingemische wurden mit Hilfe einer *fast protein liquid chromatography* (FPLC-) Anlage (Pharmacia, Freiburg) gereinigt. Hierfür wurden die jeweiligen Affinitätschromatographie-Säulen mit dem entsprechenden Bindungspuffer äquilibriert. Anschließend wurde das zu trennenden Proteingemisch über eine Pumpe (Pumpe C) auf die Säule aufgetragen. Die gewünschten Proteine trennten sich dabei ihrer Affinität entsprechend von dem restlichen Proteingemisch ab und wurden nach der Elution mit Hilfe eines Fraktionssammlers aufgefangen und neutralisiert. Die Detektion der einzelnen Fraktionen erfolgte über eine UV-Messzelle an der Anlage bei einer Absorption von 280 nm und wurde mittels Schreiber aufgezeichnet. Die verwendeten Puffer wurden vor Gebrauch filtriert und entgast.

#### 2.5.8.1 Aufreinigung des BARB-4 Antikörpers

Der BARB-4 Antikörper wurde aus Kulturüberständen von der Fa. Patrys mit Hilfe eines FPLC-Systems aufgereinigt. Die Flussrate betrug dabei 1,5 ml/min. Vor der Reinigung wurden etwa 500 ml Überstand auf einen pH-Wert zwischen 6 und 7 eingestellt, filtriert (0,45 µm) und auf Eis gelagert.

Für die Aufreinigung wurde eine Protein A-Säule (GeHealthcare, München) verwendet, die humane IgG Antikörper selektiv binden und so aus dem Überstand entfernen kann. Die Säule wurde vor Beginn mit Bindungspuffer (50 mM Na<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>, 1,5 M NaCl, 0,1 M Arginin, 10 mM EDTA, pH 7) äquilibriert. Im Anschluss daran wurde der Kulturüberstand auf die Säule aufgetragen. Nach dem Auftrag wurde die Säule erneut mit Bindungspuffer gespült, bis die nicht gebundenen Proteine alle ausgewaschen waren und sich beim Schreiber eine konstante Basislinie einstellt hatte. Der BARB-4 Antikörper wurde anschließend mit Elutionspuffer (0,1 M Arginin, 0,1 M NaCl, pH 3,8) von der Säule entfernt und in einzelnen Fraktionen gesammelt. Zur Neutralisation des sauren Eluats wurde ein Neutralisationspuffer (10% 1 M Tris, pH 8) in den einzelnen Fraktionen vorgelegt. Anschließend wurden die aufgereinigten Antikörperfraktionen gepoolt und mittels PD10 Säule (GeHealthcare, München) in PBS umgepuffert und sterilfiltriert.

### 2.5.8.2 Aufreinigung des BARB-4 Antigens

Für die affinitätschromatische Aufreinigung des BARB-4 Targets aus BxPC-3 Membranextrakten wurde eine BARB-4-gekoppelte Sepharose-Säule hergestellt. Hierfür wurde BARB-4, wie nachfolgend beschrieben, an ein CNBr-aktiviertes Sepharose™-Säulenmaterial gebunden.

Für das Verfahren wurden 50 mg BARB-4 Antikörper in 20 ml Kopplungspuffer aufgenommen. Anschließend wurden 2,5 g CNBr-aktivierte Sepharose™ 4 fast flow der Fa. Sigma in einer Nutsche (Porengröße 0,45 µm) mit 500 ml eiskalter 1 mM HCl (pH 2,6) für 40 min gespült. Dabei quillt die Sepharose-Matrix und störende Zuckerbestandteile werden entfernt. Nachgewaschen wurde die Sepharose mit 100 ml Millipore®-Wasser sowie mit 12,5 ml Kopplungspuffer. Letzterer wurde sofort abgenutscht, da die reaktiven Gruppen der Sepharose-Matrix im basischen pH-Bereich leicht hydrolysieren können. Im Anschluss daran wurde die Antikörper-Kopplungspufferlösung zur Sepharose gegeben. Dabei wurden 7,5 ml Kopplungspuffer zur Lösung addiert, die zum Ausspülen der Sepharose aus der Nutsche dienen. Der komplette Ansatz wurde bei 4 °C über Nacht auf dem Lyserad inkubiert. Die ungekoppelten Antikörper wurden zusammen mit dem Kopplungspuffer über die Nutsche entfernt. Danach wurde die Säulenmatrix mit 250 ml Kopplungspuffer gewaschen. Um ungekoppelte, aktivierte Gruppen der Matrix zu blockieren, wurde die Sepharose in einer 0,2 M Glycinlösung (pH 8) bei 4 °C über Nacht inkubiert. Nach dem Entfernen des Glycin-Blockierpuffers wurde die antikörpergekoppelte Sepharose abwechselnd fünfmal mit Kopplungs- und Acetatpuffer zu je 100 ml gewaschen. Mit Hilfe eines Trichters wurde anschließend eine Suspension aus der BARB-4 gekoppelten Sepharose und 0,05%iger (m/V) Natriumacid-PBS-Lösung in eine Säule überführt. Es wurde darauf geachtet, dass sich bei der Befüllung keine Luftblasen einlagern konnten. Die Lagerung erfolgte anschließend in der 0,05% (m/V) Natriumacid-PBS-Lösung (pH 7,2) zwischen 2 und 8 °C im Kühlschrank. Zur Überprüfung der gekoppelten Antikörpermenge wurden sowohl vor als auch nach der Kopplung Proben aus der Antikörper-Kopplungspufferlösung entnommen und nephelometrisch vermessen. Die Differenz der beiden Werte entsprach der gekoppelten Antikörpermenge. Hierbei konnte ein Kopplungserfolg von 99,3% verzeichnet werden.

Nach der Fertigstellung der BARB-4 Affinitätschromatographiesäule erfolgte die Aufreinigung des entsprechenden Antigens. Während des gesamten Aufreinigungsprozesses betrug die Flussgeschwindigkeit 2 ml/min. Nachdem die Säule mit PBS äquilibriert wurde, erfolgte der Probenauftrag der Membranproteine über Pumpe C. Ein gepoolter Membranextrakt wurde hierfür auf eine Proteinkonzentration von ungefähr 0,5 mg/ml mit PBS eingestellt und filtriert (0,2 µm). Für die Aufreinigung wurden insgesamt etwa 70 mg Protein verwendet. Nach dem Probenauftrag wurde die Säule für 25 min mit PBS gewaschen. Eluiert wurde anschließend mit einem 0,1 M Glycinpuffer (pH 2,2). Zum Nachspülen wurde ebenfalls PBS benutzt, welches 30 min lang über die Säule lief. Die Säule wurde mit Lagerungspuffer (0,05% (m/V) Natriumacid in PBS) gespült und anschließend im Kühlschrank (2-8 °C) aufbewahrt. Das Eluat wurde fraktioniert aufgefangen und durch den vorgelegten Tris-Puffer (1 M Tris, pH 9) neutralisiert. Aliquots des Eluats wurden bei -20 °C tiefgefroren.

### 2.5.9 Massenspektrometrische Analyse von Proteinen

Die Massenspektrometrie ist ein gängiges Analysenverfahren, das sowohl die Sequenzierung von sehr kleinen Proteinmengen als auch die Zuordnung der dabei auftretenden Peptidfragmente zu bekannten Proteinen mit Hilfe des Masse/Ladungsverhältnisses ermöglicht [163]. Dies wird durch das sogenannte matrixunterstützte Laserdesorptionsverfahren (*matrix-assisted laser desorption ionization*, MALDI) erreicht, welches für diese Analyse zum Einsatz kam.

Zur Identifizierung des BARB-4 Antigens wurden, wie in Abschnitt 2.5.3 beschrieben, die gereinigten Fraktionen mittels Aceton aufkonzentriert. Hierfür wurden 100 µl Eluat mit 300 µl Aceton vermischt. Das über Nacht ausgefällte Pellet wurde anschließend in 10 µl 1-fach Ladepuffer aufgenommen und mit 1 µl DTT (1 M) versetzt. Etwa 8 µg Protein waren dabei pro Geltasche vorhanden und wurde elektrophoretisch aufgetrennt. Die mittels Western Blot identifizierte Bande des BARB-4 Antigens wurde anschließend aus dem Coomassie Gel ausgeschnitten und zur Sequenzierung an die Fa. TopLab (Martinsried) eingeschickt. Dort wurde die Proteinbande massenspektrometrisch analysiert. Vor der Analyse wurde die Proteinprobe mit Iodacetamid reduziert und alkyliert. Anschließend wurde die Probe

mit Trypsin zu Peptidfragmenten verdaut. Die einzelnen Peptidfragmente wurden danach mittels Massenspektrometer analysiert. Hierbei wurde ein Spektrogramm aufgezeichnet, bei dem das Masse/Ladungsverhältnis gegen die Signalintensität dargestellt ist. Bei einer anschließenden Peptidmassen-Fingerprint-Analyse wurden die detektierten Peptidfragmente über eine Datenbank mit bereits bekannten, dort eingetragenen Proteinen verglichen. Durch das charakteristische Masse/Ladungsverhältnis der detektierten Peptidfragmente konnten diese dann mittels Profound den entsprechenden Proteinen in der NCBI-Datenbank zugeordnet werden. Kandidaten mit der Wahrscheinlichkeit von  $p = 1$  wurden nochmals mittels BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*, [www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST)) auf Übereinstimmungen in der Proteinsequenz untersucht.

### **2.5.10 Enzymatischer Verdau des BARB-4 Antigens**

Um das BARB-4 Antigen auf Carbohydratstrukturen zu analysieren, wurde das aus Membranextrakten (BxPC-3) aufgereinigte Target mittels N- und O-Glykosidase verdaut. Um bei einer gegebenenfalls vorhandenen Zuckerstruktur eine vollständige Deglykosilierung zu erreichen, wurde die Reaktion unter reduktiven Bedingungen durchgeführt. Hierfür wurden zuerst, wie in Abschnitt 2.5.3 beschrieben, aufgereinigte Membranproteine mittels Aceton aufkonzentriert. Das Pellet wurde anschließend in Membranlysepuffer aufgenommen und mit 1% (m/V) SDS und 1% (V/V)  $\beta$ -Mercaptoethanol versetzt und bei 95 °C 3 min erhitzt. Die Proteinkonzentration wurde mittels Reaktionspuffer (PBS, pH 7, 1% (V/V) Nonidet-P40 und 1% (V/V)  $\beta$ -Mercaptoethanol) auf 3 mg/ml eingestellt. Je 6,5  $\mu$ l dieses Ansatzes wurden mit 3  $\mu$ l N-Glykosidase F (3 U, Roche Diagnostics) bzw. O-Glykosidase (1,5 mU, Roche Diagnostics) versetzt. Bei der Pufferkontrolle wurde anstelle einer Glykosidase 3  $\mu$ l Membranlysepuffer zugesetzt. Alle drei Ansätze wurden über Nacht bei 37 °C inkubiert und anschließend mittels SDS-PAGE und Western Blot-Analyse auf die Bindung mit BARB-4 und Anti-TAF15 Antikörper untersucht.

## 2.6 Molekularbiologische Methoden

### 2.6.1 Isolierung von Gesamt-RNA

Die Isolierung der Gesamt-RNA aus Tumorzellen und Geweben wurde nach der Guanidinthiocyanat-Phenol-Chloroform-Extraktionsmethode von Chomczynski und Sacchi (1987) durchgeführt [176]. Guanidinthiocyanat ist eine Substanz, welche eine Denaturierung von Proteinen bewirkt und somit zur Inaktivierung von RNA-Endonukleasen führt. Dies verhindert den Abbau der zu isolierenden RNA. Des Weiteren bewirkt die anschließend durchgeführte Chloroform-Phenol-Extraktion eine Abtrennung von Proteinen aus dem Zelllysate. Ribonukleinsäuren sind nach dieser Extraktion in der wässrigen Phase enthalten und werden durch eine Ausfällung mit Isopropanol aufkonzentriert.

Um eine externe RNA-Endonukleasekontamination zu vermeiden, wurden Nitrilhandschuhe (Touch N Tuff®, Ansell Healthcare, Brüssel, Belgien) getragen. Alle verwendeten Kunststoffwaren wurden für die RNA-Isolierung und die entsprechende Weiterverarbeitung vor Gebrauch autoklaviert.

#### 2.6.1.1 RNA-Isolierung aus Tumorzellen

Vor der Zelllyse wurden  $1 \times 10^7$  Zellen zweimal mit eiskaltem PBS gewaschen und mit  $1000 \times g$  für 5 min zentrifugiert. Nach dem Entfernen des Überstandes wurde das Zellpellet in 1 ml Trizol® aufgenommen und auf Eis gestellt. Mit Hilfe einer 1 ml Spritze und einer G20 Kanüle wurde der Ansatz homogenisiert, bis der Zellextrakt problemlos in die Spritze aufgezogen werden konnte. Um hochmolekulare DNA, Polysaccharide sowie extrazelluläre Membranen abzutrennen, wurde das Zelllysate für 10 min bei  $10.000 \times g$  und  $4^\circ C$  zentrifugiert. Das Pellet wurde anschließend verworfen, während der Überstand in einem neuen Reaktionsgefäß mit 200 µl Chloroform vermischt, einige Sekunden lang kräftig geschüttelt und für 2 min bei Raumtemperatur inkubiert wurde. Anschließend wurde der Ansatz 15 min bei  $13.000 \times g$  und  $4^\circ C$  zentrifugiert, wodurch zwei Phasen entstanden. Die untere, schwerere Phase aus Phenol und Chloroform wurde für die weitere Analyse nicht benötigt und wurde nach dem Entfernen der oberen Phase verworfen. Die obere,

wässrige Phase beinhaltete die gewünschte RNA. Diese Phase wurde daher in ein neues Reaktionsgefäß überführt und zusammen mit 500 µl Isopropanol für 15 min bei Raumtemperatur inkubiert. Hierbei kam es zur Präzipitation der RNA, die anschließend bei 13.000 x g und 4 °C abzentrifugiert wurde. Das entstandene Pellet wurde mit 1 ml 75%igem Ethanol gewaschen, bei 10.000 x g für 5 min zentrifugiert und luftgetrocknet. Je nach Pelletgröße wurde die isolierte RNA abschließend in 30 - 50 µl DEPC-Wasser aufgenommen und bei 60 °C für 10 min vollständig gelöst. Der RNA Gehalt wurde spektrometrisch bestimmt, bevor die isolierte RNA aliquotiert und bis zu ihrer Weiterverarbeitung bei -80 °C gelagert wurde.

### **2.6.1.2 RNA-Isolierung aus Geweben**

Kryokonserviertes malignes und nicht-malignes Lungengewebe wurde mit Hilfe des Kryostats in fünfzig 10 µm dicke Stücke geschnitten. Die Schnitte wurden in 1 ml Trizol® aufgenommen und danach, wie bereits in Abschnitt 2.6.1.1 beschrieben, homogenisiert. Die anschließende Extraktion der RNA erfolgte dabei ebenfalls nach der Beschreibung in Abschnitt 2.6.1.1. Der Gehalt der isolierten RNA wurde spektrometrisch bestimmt, bevor die RNA aliquotiert und bis zu ihrer Verwendung bei -80 °C gelagert wurde.

### **2.6.2 Konzentrations- und Reinheitsbestimmung von Nukleinsäuren**

Die Mengen- und Reinheitsbestimmung von RNA und DNA erfolgte durch die Bestimmung der Absorption bei 260 und 280 nm. In einer Quarzküvette wurden 5 bzw. 10 µl der zu vermessende Probe mit DEPC-Wasser im Verhältnis 1:100 bzw. 1:200 verdünnt. Für den Leerwertabgleich wurde eine Quarzküvette, die nur DEPC-Wasser enthielt, verwendet. Die Berechnung der Konzentration erfolgte automatisch durch das Gerät (GeneQuantPro, Amersham Biosciences) und konnte direkt abgelesen werden. Die Berechnungen des Gerätes basieren auf der Annahme einer Absorption von 1 für die Konzentration von 40 µg/ml RNA oder 50 µg/ml DNA. Zur Reinheitsbestimmung wurde der Quotient aus den Absorptionen der beiden

Wellenlängen 260 und 280 nm herangezogen, welcher ebenfalls automatisch durch das Gerät berechnet wurde. Dieser sollte zwischen 1,6 und 1,8 liegen. Geringere Werte lassen auf eine Verunreinigung mit Proteinen oder Phenol schließen.

### **2.6.3 Reverse Transkription von mRNA in cDNA**

Bei der reversen Transkription wurde mRNA mit Hilfe des Enzyms Reverse Transkriptase in die entsprechende cDNA Sequenz übersetzt. Für die verschiedenen Versuche wurde die cDNA Synthese, wie in den nachfolgenden Abschnitten beschrieben, durchgeführt.

#### **2.6.3.1 cDNA Synthese für die semiquantitative PCR**

Für die Analyse wurden 5 µg der isolierten RNA, 1 µl Oligodeoxythymidin-Primer (1 µg/µl Oligo-dT15 Primer), 1 µl Random-Primer (Invitrogen, Karlsruhe) auf 8 µl Gesamtvolumen durch Zusatz von DEPC-Wasser aufgefüllt und für 10 min auf 65 °C erhitzt. Die dadurch denaturierte RNA wurde anschließend im PCR-Cycler auf 4 °C abgekühlt. Zu dem Ansatz wurde anschließend ein Mix aus 5,2 µl DEPC-Wasser, 5 µl 5-fach First-Strand Puffer, 2,5 µl dNTPs (10 mM), 2,5 µl 0,1 M DTT, 0,8 µl Recombinant RNasin® (Ribonukleaseinhibitor, 40 U/µl) und 1µl Super Script™ II (M-MLV Reverse Transkriptase, 200 U) dazu pipetiert. Die cDNA Synthese erfolgte bei 42 °C für 60 min. Das anschließende Abstoppen der Reaktion wurde durch Erhitzen auf 70 °C für 15 min erreicht. Die cDNA wurde entweder sofort verarbeitet oder aliquotiert und bei -20 °C gelagert.

#### **2.6.3.2 cDNA Synthese für die Sequenzanalyse**

Es wurden 5 µg der isolierten RNA, 1µl Oligodeoxythymidin-Primer (1 µg/ µl Oligo-dT15 Primer), 1 µl Random-Primer (Invitrogen, Karlsruhe) und 1 µl dNTPs (10 mM)



mit Hilfe von DEPC-Wasser auf 14 µl Gesamtvolumen aufgefüllt und für 5 min auf 65 °C erhitzt. Die dadurch denaturierte RNA wurde anschließend im PCR-Cycler auf 4 °C abgekühlt und 1 min auf Eis gestellt. Zu dem Ansatz wurde anschließend ein Mix aus 4 µl 5-fach First-Strand Puffer, 1 µl 0,1 M DTT und 1 µl Super Script™ III (M-MLV Reverse Transkriptase) dazupipetiert. Die cDNA Synthese erfolgte bei 50 °C für 60 min. Die Reaktion wurde durch Erhitzen auf 70° für 15 min abgestoppt. Die cDNA wurde entweder sofort verarbeitet oder bei -20 °C in Aliquots gelagert.

#### 2.6.4 Polymerasekettenreaktion

Zur Vervielfältigung spezifischer DNA Fragmente wurde eine Polymerasekettenreaktion (*polymerase chain reaction*, PCR) durchgeführt. Hierzu wurden die Proben in einen vorgeheizten PCR-Cycler (Hot Start, 94 °C) gegeben. Die Amplifikationsbedingungen für die unterschiedlichen Versuche sind in Tabelle 12 zusammengefasst und werden in den beiden nachfolgenden Abschnitten näher beschrieben.

**Tabelle 12: PCR-Produkte und ihre Amplifikationsbedingungen**

Produkt	Denaturierung		Annealing		Elongation		Extension		Replikations- zyklen	Produktgröße [bp]
	[°C]	[s]	[°C]	[s]	[°C]	[s]	[°C]	[min]		
GAPDH	94	30	57,3	30	72	30	72	420	40	380
TAF15 Fragment 1	94	30	57,3	30	72	30	72	420	40	548
TAF15 komplett	94	30	61	30	72	90	72	900	35	1782

#### **2.6.4.1 Semiquantitative PCR mit GAPDH**

Um die Expression von TAF15 in malignem und normalem Gewebe auf mRNA Level vergleichen zu können, wurde die mRNA in cDNA transkribiert und anschließend mittels PCR amplifiziert. Für die semiquantitative Polymerasekettenreaktion eines Ansatzes wurden jeweils 1,25 µl GAPDH und 0,75 µl TAF15 Primer (TAF15 Primerpaar 1) mit einer Konzentration von jeweils 10 pmol/µl verwendet, die zusammen mit einem PCR-Mix (5 µg cDNA, steriles Millipore®-Wasser, 2,5 µl 10-fach PCR Rxn Puffer (Invitrogen), 1 µl MgCl<sub>2</sub> (50 mM), 2,5 µl dNTPs (2,5 mM) und 0,13 µl Taq Polymerase (Invitrogen)) vermischt wurden. Der Ansatz wurde auf ein Volumen von insgesamt 25 µl eingestellt. Um die amplifizierten TAF15 PCR-Produkte der Ansätze visuell vergleichen zu können, wurde die Bande des GAPDH als interner Standard verwendet. Die Detektion der Banden erfolgte nach einer Agarosegelelektrophorese mit Ethidiumbromid. Dabei wurden die einzelnen Banden über eine DNA-Leiter (Gene Ruler™ 100 bp Plus DNA Ladder, Fermentas) zugeordnet.

#### **2.6.4.2 PCR für die TAF15 Sequenzierung**

Für die Sequenzanalyse des TAF15 Proteins auf DNA-Ebene wurde mRNA in cDNA transkribiert. Diese cDNA wurde anschließend mit einem Primerpaar (TAF15 Primerpaar 3) für das komplette TAF15 mittels PCR amplifiziert. Hierzu wurden jeweils 34 µl autoklaviertes Millipore®-Wasser, 10 µl 5-fach Phusion™ HF Puffer, 2 µl cDNA, 1 µl dNTPs (10 mM), jeweils 1 µl TAF15 Forward- und Reverse-Primer (10 pmol/µl) sowie 1 µl Phusion™ High-Fidelity DNA Polymerase (New England Biolabs, Ipswich, USA) gemischt. Die Proben wurden 3 min bei 94 °C (Hot Start) im PCR-Cycler inkubiert, bevor die eigentliche Amplifikation erfolgte. Für den Versuch wurde eine DNA-Polymerase mit einer 3'→5'-Exonukleaseaktivität verwendet, um eine akkurate DNA-Amplifikation für die nachfolgende Klonierung sicher zu stellen. Da diese DNA Polymerase aber keinen A-Überhang am 3'-Ende produziert, muss dieser nachträglich, wie unter Abschnitt 2.6.7 beschrieben, synthetisiert werden.

### **2.6.5 Agarosegelelektrophorese**

Die Auftrennung der DNA-Fragmente aus PCR oder restriktionsverdauten Plasmiden wurde in einem 1%igen bzw. 1,5%igen (m/V) Agarosegel durchgeführt. Hierzu wurde die Agarose in TBE-Puffer erhitzt und gelöst. Nach kurzem Abkühlen wurden dann 4 µl Ethidiumbromidlösung (10 mg/ml) dazu pipetiert und gut vermischt. Anschließend wurde das flüssige Gel in die vorbereiteten Elektrophoreseformen gegossen und mit einem Kamm für die späteren Geltaschen versetzt. Nach dem Aushärten konnte das Gel in die Elektrophoreseapparatur eingesetzt und mit TBE als Laufpuffer überschichtet werden. Pro Probe wurden 5 µl DNA mit 1 µl des DNA-Ladepuffers (6-fach Loading Dye Solution) versetzt. Die kompletten 6 µl der fertigen Probenlösung wurden in eine Tasche des Agarosegels pipettiert. Als DNA-Marker wurden Gene Ruler™ 100 bp Plus DNA Ladder so wie Gene Ruler™ 1 kb Plus DNA Ladder (Fermentas) eingesetzt. Die Elektrophorese erfolgte bei 150 mA für etwa 20 min. Das Gel wurde mit Hilfe eines UV-Transilluminators bei einer Wellenlänge von 254 nm detektiert. Das Ergebnis wurde anschließend über eine Videoauswerteeinheit der Fa. MWG (Ebersberg) aufgenommen. Die durch das interkalierende Ethidiumbromid fluoreszierende RNA- und DNA-Banden konnten somit sichtbar gemacht werden. Bei präparativen Agarosegelen wurde die entsprechende DNA-Bande mittels Skalpell ausgeschnitten und die DNA anschließend, wie unter Abschnitt 2.6.6 beschrieben, eluiert.

### **2.6.6 Aufreinigung von PCR-Produkten für die Klonierung**

Nach der PCR wurde das hierbei erhaltene Reaktionsgemisch auf ein 1%iges Agarosegel aufgetragen und mittels Elektrophorese aufgetrennt. Die gewünschte Bande konnte anschließend mit Hilfe des UV-Transilluminators detektiert und aus dem Gel ausgeschnitten werden. Die DNA wurde anschließend mit Hilfe des Jetsorb Kits (Genomed GmbH, Löhne) wie vom Hersteller beschrieben aus dem Gel eluiert. Die Puffer, die für die Aufreinigung benötigt wurden, waren im Kit enthalten. Die ausgeschnittenen Gelstücke wurden gewogen und pro 100 mg mit jeweils 300 µl Puffer A1 (bestehend aus NaClO<sub>4</sub>, TBE und Na-Azetat) sowie 10 µl Jetsorb-Suspension versetzt. Der Ansatz wurde bei 50 °C für 15 min inkubiert, wobei er etwa

alle 3 min mittels Vortex gemischt wurde. Anschließend wurde der Ansatz bei 10.000 x g für 30 s zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, während das Pellet mit 300 µl Puffer A1 gewaschen und erneut zentrifugiert (10.000 x g, 30 s) wurde. Der gleiche Waschvorgang wurde zweimal mit Puffer A2, bestehend aus Ethanol, NaCl, EDTA und Tris/HCl, wiederholt. Anschließend wurde das Pellet bei 50 °C für 10 min im Thermoblock getrocknet. Das trockene Pellet wurde in 20 µl autoklaviertem Millipore®-Wasser resuspendiert und für 5 min auf 50 °C erhitzt. Hierdurch kam es zur Elution der DNA aus der Suspension. Nach erneuter Zentrifugation wurde der Überstand mit der gewünschten DNA in ein neues Reaktionsgefäß überführt und entweder sofort verwendet oder bis zum Gebrauch bei -20 °C gelagert.

### **2.6.7 Anhängen des Adenosintriphosphatnukleotids am 3' Ende**

Nach dem Aufreinigen der DNA aus dem PCR-Ansatz wurden 10 µl autoklaviertes Millipore®-Wasser, 3,5 µl 10-fach Puffer (pEXP5-CT/TOPO® TA Expression Kit, Invitrogen), 1 µl dNTPs (10 mM) sowie 1 µl Taq Polymerase (rekombinant, Invitrogen, 5 U/µl) zur DNA hinzu pipettiert und vermischt. Der Ansatz wurde bei 72 °C im PCR-Cycler für 20 min inkubiert und anschließend 1 min auf Eis gestellt.

### **2.6.8 Klonierung von PCR-Produkten mittels pEXP5-CT/TOPO Vektor**

Für die Klonierung wurde das pEXP5-CT/TOPO® TA Expression Kit (Invitrogen, Karlsruhe) verwendet. Die TOPO® Klonierungsreaktion wurde mit 4 µl gereinigtem PCR-Produkt, 1 µl Salzlösung (*Salt Solution*, im Kit enthalten) und 1 µl TOPO® Vektor (im Kit enthalten) durchgeführt und für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Der Ansatz wurde anschließend auf Eis gestellt, bis er für die kurz darauf folgende Transformation benötigt wurde.

### **2.6.9 Transformation kompetenter Escherichia coli Bakterien**

Für die Transformation wurden One Shot® TOP10 Competent Escherichia coli (pEXP5-CT/TOPO® TA Expression Kit) verwendet. 2 µl der TOPO® Klonierungsreaktion wurden in ein Aliquot der kompetenten Bakterien pipettiert und vorsichtig gemischt. Der Ansatz wurde für 30 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurden die Escherichia coli Bakterien für 30 s auf 42 °C erhitzt und danach sofort auf Eis gestellt. Nach Zugabe von 250 µl SOC Medium (im Kit enthalten) wurden die Bakterien bei 37 °C und 200 upm für 1 h im Bakterienschüttler inkubiert. 50 µl und 200 µl dieser Bakteriensuspension wurden jeweils mit 20 µl SOC Medium versetzt und auf vorgewärmten LB-Platten kultiviert (siehe Abschnitt 2.2.3). Die Kulturplatten wurden über Nacht bei 37 °C inkubiert. Für die weiteren Analysen wurden einzelne Kolonien gepickt und in 25 µl Millipore®-Wasser resuspendiert. Von der Suspension wurden anschließend 20 µl in 3 ml LB-Medium mit 100 µg/ml Ampicillin pipettiert und über Nacht bei 37 °C und 200 upm im Bakterienschüttler inkubiert.

### **2.6.10 Isolierung des Expressionsvektors aus Escherichia coli**

Die Isolierung der Plasmid-DNA wurde mit Hilfe des peqGOLD Plasmid Miniprep Kit I (PEQLAB Biotechnologie GmbH, Erlangen) nach den Angaben des Herstellers durchgeführt. Das Kit basiert auf dem Prinzip der alkalischen Lyse kombiniert mit den selektiven und reversiblen DNA-Bindungseigenschaften von HiBind®-Silikamembranen. Die verwendeten Lösungen waren alle im Kit enthalten. Für die Isolierung wurden 2 ml der Übernachtskultur bei 13.000 upm für 5 min zentrifugiert. Das Pellet wurde anschließend in 250 µl mit RNase versetzte Lösung I resuspendiert. Durch Zugabe von 250 µl Lösung II und vorsichtigem Vermischen wurden die Bakterien lysiert. Wenn sich der Ansatz noch nicht vollständig aufgeklärt hatte, erfolgte eine Inkubation bei Raumtemperatur für 2 min. Zur Neutralisation wurde das klare Lysat mit 350 µl Lösung III versetzt und durch mehrmaliges Invertieren gemischt, bis sich ein weißer, flockiger Niederschlag bildete. Danach wurde die Probe bei 10.000 x g für 10 min zentrifugiert. Der Überstand wurde dann in eine HiBind® Miniprep Zentrifugensäule gefüllt und bei 10.000 x g für 1 min zentrifugiert. Der Durchlauf wurde verworfen. In die Zentrifugensäule wurde zum

Waschen 500 µl HB-Puffer pipettiert und für 1 min bei 10.000 x g zentrifugiert. Es folgten zwei weitere Waschschritte mit jeweils 750 µl ethanolhaltigem DNA-Waschpuffer. Anschließend wurde die Zentrifugensäule bei 16.000 x g für 1 min vollständig getrocknet. Die Plasmid-DNA wurde danach mit 50 µl autoklaviertem Millipore®-Wasser eluiert. Dazu wurde die Flüssigkeit direkt auf die Zentrifugensäule gegeben und bei 5.000 x g 1 min zentrifugiert. Die aufgereinigte Plasmid-DNA wurde entweder direkt weiterverarbeitet oder bei -20 °C gelagert.

### **2.6.11 Restriktionsverdau des Expressionsvektors**

Der Erfolg der Klonierung wurde mit Hilfe eines Restriktionsverdaus kontrolliert. Für den Verdau wurden 1 µl Tango™ Puffer (Fermentas, St. Leon-Rot), 6,5 µl autoklaviertes Millipore®-Wasser, 2 µl Plasmid-DNA und 0,5 µl XbaI Restriktionsenzym (10 U/µl; Fermentas, St. Leon-Rot) verwendet. Der Ansatz wurde bei 37 °C für 3 h inkubiert. Die verdaute DNA wurde anschließend auf ein 1%iges Agarosegel aufgetragen. Mittels DNA-Marker (Gene Ruler™ 1 kb Plus DNA Ladder, Fermentas) wurde überprüft, welcher Expressionsvektor ein Insert enthielt. Das Plasmid mit einem Insert wurde anschließend direkt sequenziert.

### **2.6.12 DNA-Sequenzierung**

Die Sequenzierungsamplifikation wurde mit Hilfe des Big Dye Terminator v3.1 Sequencing Kits durchgeführt. Für die PCR wurde hierbei pro Ansatz jeweils ein einzelner Primer verwendet. Um Ablesefehler zu eliminieren, wurde in getrennten Ansätzen bidirektional und überlappend transkribiert. Hierzu wurden 2 µl Vektor-DNA, jeweils 1 µl T7 oder TAF15 Primer (Primer 2), 2 µl Sequenzierlösung (im Kit enthalten) sowie 5 µl autoklaviertes Millipore®-Wasser vermischt. Der Ansatz wurde anschließend im PCR-Cycler mit 50 Zyklen amplifiziert. In Tabelle 13 sind die Amplifikationsbedingungen dargestellt.

Überschüssige Oligonukleotide und dNTPs, die nach der Amplifikation noch vorhanden waren, wurden mittels Sephadex G50 aus dem Reaktionsgemisch

abgetrennt. Eine mit Watte gestopfte 200 µl Pipettenspitze wurde dazu bis zum oberen Rand mit einer Suspension des Sephadex G50 (etwa 300 µl) beladen und bei 3.000 upm für 3 min zentrifugiert. Anschließend wurde die Probe aufgetragen und erneut zentrifugiert (3.000 upm, 3 min). Nach der Zentrifugation wurde die Probe mit Hi-Di™ Formamid (Applied Biosystems) versetzt und bis zur Sequenzierung bei 4 °C gelagert. Die Sequenzierung erfolgte anschließend mit dem Sequenzierapparat der Fa. Applied Biosystems. Nach der Sequenzierung wurden die ermittelten Sequenzen der PCR-Fragmente über die DNAMAN Software für Windows (Version 5.2) mit der entsprechenden Sequenz der NCBI-Datenbank verglichen.

**Tabelle 13: Bedingungen für die Sequenzierungsamplifikation**

	Dauer [s]	Temperatur [°C]
Denaturierung (Hot Start)	30	96
Denaturierung	15	96
Annealing	15	50
Extension	120	60

## 2.7 Immunfluoreszenz

### 2.7.1 Durchflusszytometrie (FACS-Analyse)

Die Durchflusszytometrie, welche auch unter dem häufig synonym verwendeten Begriff *fluorescence activated cell sorting/scanning* (FACS) bekannt ist, wird zum Charakterisieren von Zellen verwendet. Sie gibt dabei Aufschluss über morphologische Eigenschaften wie Größe und Granularität. Mit Hilfe dieses Analyseverfahrens können jedoch auch andere Aspekte wie beispielsweise die Expression von Oberflächenproteinen untersucht werden [177]. Diese Option wurde für die nachfolgend beschriebenen Analysen genutzt. Hierbei wurden spezifische Primärantikörper eingesetzt, die bestimmte Antigene binden und entweder selbst fluoreszenzfarbstoffgekoppelt waren oder durch fluoreszenzmarkierte Sekundärantikörper detektiert werden konnten.

### **2.7.1.1 Messung und Auswertung der Fluoreszenz**

Für die in den Abschnitten 2.7.1.2 und 2.7.1.3 beschriebenen Untersuchungen wurde das FACScan Durchflusszytometer der Fa. Becton Dickinson (BD) verwendet. Die zu analysierende Zellsuspension wurde dabei über eine Kapillare von dem Zytometer eingesaugt und mit konstanter Geschwindigkeit tropfenweise durch einen monochromatischen Laserstrahl (488 nm; Argon-Laser) geleitet. Dabei kommt es neben der Lichtbeugung und Lichtstreuung auch zur Anregung von Fluoreszenzfarbstoffen. Diese resultiert in der Emission von Licht einer bestimmten Wellenlänge. Die Intensität des emittierten Lichts ist dabei direkt proportional zur Menge des gebundenen Antikörpers und somit auch zur Menge des entsprechenden Antigens auf der Zellmembran. Die Detektion der Fluoreszenz erfolgt bei der FACScan-Apparatur durch zwei Streuungs- sowie drei Fluoreszenzdetektoren mit jeweils fest eingestellten Filtern.

Für den Bindungsnachweis des Antikörpers mittels FACS-Analyse wurden FITC-markierte Sekundärantikörper eingesetzt. Der dabei verwendete Fluoreszenzfarbstoff Fluoresceinisothiocyanat (FITC) besitzt eine Anregungswellenlänge von 488 nm und eine Emissionswellenlänge von 530 nm. Die Antikörperbindung konnte hierbei über die Intensität der Emission des gekoppelten Farbstoffes auf dem FL-1 Kanal (grüne Fluoreszenz) ermittelt werden, wobei die Darstellung der Intensität logarithmisch erfolgte. Pro Probe wurden zwischen 10.000 und 15.000 Zellen gemessen. Die Ansätze wurden im FACScan mit Hilfe der CellQuest Pro Software (BD) analysiert. Die Auswertung der Daten erfolgte anschließend, wie in Abschnitt 2.1.4 beschrieben, mit der Software WinMDI (*Windows Multiple Document Interface Flow Cytometry*) Version 2.8. In einem Histogramm wurde dabei die jeweilige Zellzahl gegen die gemessene Fluoreszenzintensität dargestellt. Durch den direkten Vergleich der Proben mit der entsprechenden Negativkontrollen (Isotypkontrolle, nur Zweitantikörper) wurde der Anteil an positiven Zellen ermittelt. Die Antigendichte ging aus dem Vergleich der Fluoreszenzintensität einer Probe und deren Negativkontrolle hervor.



### **2.7.1.2 Nachweis der Antigenexpression auf der Zelloberfläche**

Für die FACS-Analyse wurden adhärenente Karzinomzellen oder Lymphozyten verwendet. Die Lymphozyten wurden hierfür mit Hilfe der Ficoll-Methode (siehe Abschnitt 2.3.2) aus Frischblut isoliert, während die adhärenenten Zellen mittels Trypsin-EDTA von der Kulturflasche gelöst wurden. Die Trypsinreaktion wurde anschließend mit Zellkulturmedium abgestoppt. Die Tumorzellen wurden bei 1500 upm für 5 min zentrifugiert, in frischem Kulturmedium resuspendiert und zur Regeneration der Zellmembranproteine 30 min auf Eis gestellt. Nach der jeweiligen Zellpräparation von Lymphozyten und Karzinomzellen wurden die Zellen gezählt. Jeweils  $2 \times 10^5$  Zellen wurden in ein FACS-Röhrchen überführt und mit 500 µl kaltem FACS-Puffer (FACS®-Flow) gewaschen. Die Zellsuspension wurde bei 4 °C und 1400 upm für 5 min zentrifugiert. Danach wurden die Zellen in 100 µl Erstantikörperlösung resuspendiert und für 20 min auf Eis inkubiert. Im Anschluss daran wurden die Zellen abzentrifugiert, der Überstand verworfen und die Zellpellets mit 500 µl kaltem FACS-Puffer gewaschen. Anschließend erfolgte eine Inkubation im Dunklen mit 100 µl fluoreszenzgekoppeltem Zweitantikörper für 20 min. Nach der Inkubation mit Zweitantikörper wurden die Zellen erneut mit 500 µl kaltem FACS-Puffer gewaschen und schließlich in 200 µl kaltem FACS-Puffer aufgenommen. Bis zur Messung der Fluoreszenz wurden die Zellen im Dunkeln auf Eis aufbewahrt. Die Messung erfolgte anschließend mit dem Durchflusszytometer FACScan der Fa. Becton Dickinson (San Jose, Californien, USA) und wurde danach mit der Software WinMDI (Version 2.8) ausgewertet. Entsprechend der Herkunft der Antikörper wurden zur Kontrolle der Bindungsspezifität Isotypen mit gleichen Konzentrationen und Proben mit ausschließlich Zweitantikörper eingesetzt. Alle Antikörper wurden für die Analyse mit FACS-Puffer verdünnt. Die Sekundärantikörper lagen dabei in einer Verdünnung von 1:50 vor. Die für die FACS-Analyse verwendeten Primärantikörper und Isotypkontrollen sowie deren Konzentration bzw. Verdünnung sind in Tabelle 14 dargestellt.

**Tabelle 14: Primärantikörper und Isotypkontrollen für die FACS-Analysen**

<b>Primärantikörper</b>	<b>Konzentration/Verdünnung des Primärantikörpers</b>	<b>Herkunft</b>
BARB-4	100-300 µg/ml	Mensch
Anti-CD55 (Acris)	1:1000	Maus
Anti-CD45 (Dako)	1:50	Maus
Anti-TAF15 (Santa Cruz)	30 µg/ml	Maus
Anti-TAF15 (Bethyl)	30 µg/ml	Kaninchen
<b>Kontrollantikörper</b>		
ChromPure IgG	100-300 µg/ml	Mensch
Mouse IgG	30 µg/ml	Maus
Rabbit IgG	30 µg/ml	Kaninchen

### 2.7.1.3 Nachweis von intrazellulärem Antigen

Für die intrazelluläre FACS-Analyse wurden adhärente Pankreaskarzinomzellen (BxPC-3) verwendet. Diese wurden hierfür mittels Trypsin-EDTA von der Kulturflasche gelöst. Die Trypsinreaktion wurde anschließend mittels Zellkulturmedium abgestoppt. Die Tumorzellen wurden dann bei 1500 upm für 5 min zentrifugiert und in frischem Kulturmedium resuspendiert. Nach der Zellpräparation wurden die Zellen gezählt. Jeweils  $2 \times 10^5$  Zellen wurden in ein FACS-Röhrchen überführt und mit 500 µl kaltem PBS gewaschen. Die Zellsuspension wurde bei 4 °C und 1400 upm für 5 min zentrifugiert und in 200 µl PBS aufgenommen. Anschließend wurde die gleiche Menge einer 4%igen Formaldehyd-Lösung (200 µl; Formaldehyd in PBS) zur Zellsuspension hinzugegeben, bevor der Ansatz für 20 min bei Raumtemperatur inkubiert wurde. Die Zellen wurden anschließend zweimal mit kaltem PBS gewaschen und in 100 µl 0,5%igem Saponinpuffer (Saponin in PBS) resuspendiert. Dieser Ansatz wurde für 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die Zellen wurden danach in 100 µl Primärantikörper-Saponinpufferlösung (1 µg/ml Anti-TAF15, Bethyl Laboratories bzw. Rabbit IgG als Isotypkontrolle) für 20 min auf Eis inkubiert und im Anschluss daran einmal mit Saponinpuffer gewaschen. Die Inkubation mit 100 µl des entsprechenden fluoreszenzgekoppelten Sekundärantikörpers (ebenfalls in Saponinpuffer) erfolgte für 20 min unter

Lichtausschluss und auf Eis. Die Zellen wurden nachfolgend mit 500 µl kaltem PBS sowie der gleichen Menge an kaltem FACS-Puffer gewaschen und anschließend in 200 µl kaltem FACS-Puffer aufgenommen. Bis zur Vermessung der Fluoreszenz wurden die Zellen im Dunkeln auf Eis aufbewahrt. Die Messung erfolgte mit dem Durchflusszytometer FACScan (Fa. Becton Dickinson, San Jose, USA) und wurde danach mit der Software WinMDI (Version 2.8) ausgewertet.

### **2.7.2 Fluoreszenzmikroskopie**

Die Fluoreszenzmikroskopie ist ein vielfältiges und häufig verwendetes Analyseverfahren. Sie stellt eine spezielle Form der Lichtmikroskopie dar, mit deren Hilfe Zellen strukturell analysiert werden können.

Für eine entsprechende Untersuchung wurden Tumorzellen auf einer soliden Matrix fixiert und mit Fluoreszenzfarbstoffen markiert. Die Fluoreszenzfärbung erfolgte dabei sowohl über spezifische Antikörper als auch über bestimmte DNA-bindende Farbstoffe für die Kernmarkierung. Für die Analyse wurden die spezifisch bindenden Antikörper direkt gelabelled oder mit einem fluorochromgekoppelten Zweitantikörper inkubiert. Durch die unterschiedlichen Eigenschaften der verwendeten Fluoreszenzfarbstoffe bestand die Möglichkeit, eine Zelle gleichzeitig mit verschiedenen Farbstoffen zu inkubieren. Die jeweiligen Fluoreszenzen wurden hierfür durch eine entsprechende Lichtquelle angeregt. Anschließen konnte ihre Emission über spezielle Filter sichtbar gemacht werden. Mit Hilfe dieser Methode ist es möglich, die Lokalisation von Antigenen auf Tumorzellen, welche von fluoreszenzgekoppelten Antikörpern gebunden werden, durch das Fluoreszenzsignal zu bestimmen.

Für die Analyse kam ein konfokales System aus einem Fluoreszenzmikroskop (Leica DMRE/UV) und einem Lasersystem (Innova<sup>®</sup> Coherent Inc.) zum Einsatz. Das verwendete Lasersystem war dabei sowohl mit einem Argonionen-Laser (488 nm) wie auch einem Violett-Laser (405 nm, blaues UV-Licht) ausgestattet, um die entsprechenden Anregungsenergien zu erzeugen.

Für die Detektion der Farbstoffe Cy<sup>TM</sup>3 und Fluorescent orange 548 reactive wurde eine Anregungswellenlänge von 548 nm und ein entsprechender Detektionsfilter von 565 nm verwendet. Fluoresceinisothiocyanat (FITC) hingegen wurde bei einer

Wellenlänge von 460 - 490 nm angeregt und mit Hilfe eines Filters von 510 - 530 nm detektiert. Für den Nachweis des DNA-Farbstoffs 4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI, violette Fluoreszenz) wurde eine Anregungswellenlänge von 405 nm und ein Detektionsfilter von 440 nm eingesetzt.

### **2.7.2.1 Fluoreszenzmarkierung von Antikörpern**

Der Fluoreszenzfarbstoff Fluorescent orange 548 reactive (Fluka, Buchs, Schweiz) wurde hierbei kovalent an den Antikörper gebunden. Die Konjugation erfolgte nach den Angaben des Herstellers. Hierbei handelt es sich um eine Kondensationsreaktion bei der eine aktivierte Carbonsäuregruppe des Antikörpers mit einer Aminosäuregruppe des Farbstoffs verknüpft wird. Die Deprotonierung (Aktivierung) des Antikörpers im alkalischen pH-Bereich ist für die Kopplung der beiden Komponenten essentiell.

Mit Hilfe dieser Methode wurde der Farbstoff direkt über eine kovalente Bindung an den monoklonalen Antikörper BARB-4 bzw. an die Isotypkontrolle ChromPure IgG koppelt. Um die Carbonsäuregruppen der Antikörper zu aktivieren, wurden die Antikörper zuerst mit Hilfe des FPLC-Systems über eine Sephadex<sup>TM</sup> G25 Säule (HiPrep<sup>TM</sup> 26/10 Desalting) in 0,1 M Carbonatpuffer pH 9,2 umgepuffert. Die Säule wurde hierfür mit Carbonatpuffer (5-faches Säulenvolumen) äquilibriert. Anschließend wurde die Antikörperlösung über einen Superloop mit einer Flussrate von 1 ml/min aufgetragen. Die Elution erfolgte mit Carbonatpuffer bei einer Flussrate von 5 ml/min. Die Ausgangskonzentration der Antikörper lag bei je 2 mg/ml. Danach wurde 1 mg Fluoreszenzfarbstoff in 400 µl Carbonatpuffer gelöst. Im Anschluss daran wurden sofort 50 µl der Farbstofflösung tropfenweise zur Antikörperlösung addiert und im Dunkeln für 1 h bei Raumtemperatur auf dem Rüttler inkubiert. Nach erfolgter Inkubation wurden die fluoreszenzgekoppelten Antikörper über eine Sephadex<sup>TM</sup> G25-Säule von überschüssigem, frei vorliegendem Farbstoff abgetrennt. Für die Gelfiltration wurde die Säule mit PBS äquilibriert, die Probe aufgetragen und mittels PBS eluiert. Bei der Elution konnten zwei Peaks detektiert werden. Der erste der beiden Peaks enthielt den konjugierten Antikörper und wurde fraktioniert aufgefangen. Vor der Reinigung des nächsten Antikörperkonjugats wurde die

Sephadex™ G25 Säule gut gespült, um noch vorhandenen, freien Fluoreszenzfarbstoff von der Säule zu entfernen. Der Proteingehalt wurde anschließend, wie unter Abschnitt 2.5.2 beschrieben, mit Hilfe der BCA-Methode bestimmt.

### **2.7.2.2 Endozytose fluoreszenzmarkierter Antikörper**

Um die Bindung an bzw. die Aufnahme des BARB-4 Antikörpers in die Tumorzelle zu untersuchen, wurden direkt fluoreszenzmarkierte Antikörper verwendet. Hierfür wurden Pankreaskarzinomzellen (BXPC-3) mit Trypsin-EDTA von der Zellkulturflasche gelöst und nach dem Abstoppen der Reaktion in frischem Kulturmedium resuspendiert. Die Zellen wurden anschließend für 30 min auf Eis gestellt.  $1 \times 10^6$  Zellen wurden pro Ansatz mit gekoppelten Antikörpern über eine Zeitspanne von 15, 30 oder 60 min bei 37 °C inkubiert. Dabei lag eine Antikörperkonzentration von 40 µg/ml vor. Die Zellen wurden nach der Antikörperinkubation mit PBS gewaschen und in 1 ml PBS resuspendiert. 100 µl der Zellsuspension wurden pro Objektträger ausgestrichen und anschließend unter Lichtausschluss trocknen gelassen. Nach dem Trocknen wurden die Objektträger mit einer Mischung aus DAPI und Fluorescent Mounting Medium (Dako-Cytomation, Carpinteria, USA; Verhältnis 1:1000) eingedeckt. Die Analyse erfolgte anschließend mit Hilfe des Fluoreszenzmikroskops.

### **2.7.2.3 Simultaninkubation von BARB-4 und Anti-TAF15 Antikörper**

Um zu bekräftigen, dass BARB-4 und der Anti-TAF15 Antikörper an das gleiche Zielprotein binden, wurden beide Antikörper simultan auf Tumorzellen inkubiert. Für die Fluoreszenzanalyse wurden beide Primärantikörper mit den entsprechenden unterschiedlich fluorochromgekoppelten Sekundärantikörpern detektiert. Zur Kontrolle der Bindungsspezifität wurden entsprechende Isotypen verwendet.

Für die Analyse wurden Pankreaskarzinomzellen (BxPC-3) nach dem Ablösen von der Kulturflasche mit Trypsin-EDTA und dem Abstoppen der Reaktion in frisches Kulturmedium überführt. Die Zellen wurden gezählt und auf eine Konzentration von  $2 \times 10^5$  Zellen/ml eingestellt. Jeweils 400  $\mu$ l frisches Kulturmedium (RPMI mit Supplementen) und 100  $\mu$ l dieser Zellsuspension wurden anschließend auf einen abgeflamten Objektträger pipettiert. Der Ansatz wurde 30 min ruhen gelassen und danach über Nacht bei 37 °C und 7% CO<sub>2</sub> im Brutschrank inkubiert.

Für die Färbung wurden die Zellen zweimal mit PBS gewaschen, mit 5%igem Glutaraldehyd für 10 min fixiert und mit 0,1% (V/V) Triton X-100 in PBS (PBS-Triton X-100) für 2 x 5 min permeabilisiert. Nach dreimaligem Waschen mit PBS wurden die Pankreaskarzinomzellen für 1 h mit den Primärantikörpern inkubiert. Die Primärantikörper (BARB-4 10  $\mu$ g/ml und Anti-TAF15 3  $\mu$ g/ml, GeneTex) wurden in den gleichen Konzentrationen eingesetzt wie die entsprechenden Isotypkontrollen (ChromPure IgG, Rabbit IgG). Die Objektträger wurden anschließend fünfmal mit 0,1%igem PBS-Triton X-100 gewaschen und für 30 min mit den entsprechenden fluoreszenzfarbstoffgekoppelten Sekundärantikörpern (Cy3-gekoppelter Goat anti human IgG Antikörper und FITC-gekoppelter Goat anti rabbit IgG Antikörper) inkubiert. Die Zweitantikörper lagen dabei in einer Verdünnung von 1:100 vor. Nach dem Waschen der Zellen mit PBS (fünfmal) wurden die Objektträger getrocknet und mit einer Mischung aus DAPI und Fluorescent Mounting Medium (Dako-Cytomation, Carpinteria, USA; Verhältnis 1:1000) eingedeckt. Die Analyse erfolgte anschließend unter dem Fluoreszenzmikroskop.

## 3 Ergebnisse

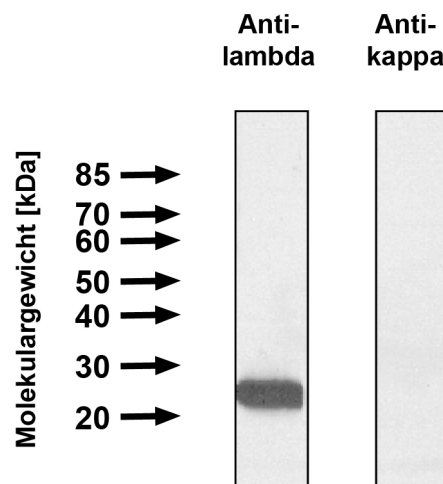
### 3.1 Charakterisierung des BARB-4 Antikörpers

Der monoklonale, humane IgG1 Antikörper BARB-4 wurde aus den Lymphozyten eines an Magenkarzinom erkrankten Patienten isoliert. Die Antikörpergewinnung erfolgte dabei durch die Methode der Triomatechnologie (humane Hybridomatechnologie) [106]. In der Vergangenheit gelang es mit Hilfe dieser Methode sowohl IgM als auch IgG und IgA Antikörper zu isolieren. Der Großteil (durchschnittlich 61%) der hierbei gewonnenen Antikörper waren jedoch IgM Immunglobuline. Lediglich 27% aller isolierten Antikörper konnten dem IgG- und nur 12% dem IgA-Isotypen zugeordnet werden. Überprüft man in ersten Analysen die Tumorreaktivität der isolierten Antikörper, ist auffällig, dass fast ausschließlich IgM Antikörper (>99%) eine positive Reaktion auf immunhistochemisch untersuchtem Tumorgewebe aufweisen [47, 122, 127]. BARB-4 ist einer der wenigen IgG Antikörper (<1%), bei denen ebenfalls tumorreaktive Eigenschaften detektiert werden konnten. Sein tumorspezifisches Bindungsverhalten sowie einige interessante, anti-tumoralen Eigenschaften des Antikörpers BARB-4 werden im Verlauf dieser Arbeit näher beschrieben.

Für die durchgeführten Versuche wurde aufgereinigter BARB-4 Antikörper verwendet, da die Kulturüberstände der antikörperproduzierenden Hybridomzellen nur sehr geringe Konzentrationen des Immunglobulins aufwiesen. Für die immunhistochemische Färbungen wurde der aufgereinigte Antikörper teilweise biotinyliert verwendet. Dies bewirkt eine Verstärkung des eigentlichen Signals, die Spezifität der Färbung bleibt jedoch weiterhin erhalten.

Der Antikörper BARB-4 unterliegt keiner Affinitätsreifung und ist daher Bestandteil der innaten Immunantwort. Vorgegangene Sequenzanalysen, die dies bestätigten, zeigten hierbei, dass BARB-4 der VH3- bzw. der VL2-Familie (Keimbahngene IgHV3-30\*03 und IgLV2-11\*03) zuzuordnen ist. Innerhalb dieser Arbeit konnte der Isotyp der leichten Kette von BARB-4 außerdem mit Hilfe von Western Blot-Analysen bestimmt werden. Um diesen zu ermitteln, wurden zwei identische Ansätze mit BARB-4 Antikörper vorbereitet, auf ein SDS-Polyacrylamidgel aufgetragen und wie in Abschnitt 2.5.4 beschrieben elektrophoretisch aufgetrennt. Die Ansätze wurden hierfür zuvor reduziert, so dass die schwere und die leichte Kette für die weitere Analyse getrennt vorlagen. Das Gel wurde anschließend geblottet und

immunologisch mit Anti-human lambda ( $\lambda$ ) light chain HRP-gekoppeltem Antikörper (Dako) und Anti-human kappa ( $\kappa$ ) light chain HRP-gekoppeltem Antikörper (Dako) analysiert (siehe Abschnitte 2.5.6 und 2.5.7). Aus den Western Blots ging eindeutig hervor, dass es sich bei der leichten Kette des BARB-4 Antikörpers um den Isotypen lambda handelt. Abbildung 6, welche das Ergebnis der Analyse darstellt, zeigt eine Bande mit dem Antikörper gegen die lambda-Kette, jedoch nicht mit dem Antikörper gegen die kappa-Kette.



**Abbildung 6: Western Blot-Analyse des BARB-4 Antikörpers mit Hilfe HRP-gekoppelter Antikörper gegen die leichte Kette.** Es wurden etwa 6  $\mu\text{g}$  Antikörper pro Ansatz verwendet. Die leichte und schwere Kette des BARB-4 Antikörpers wurden mittels 10%igem SDS-Polyacrylamidgel unter reduktiven Bedingungen (DTT) voneinander getrennt. In einem Western Blot mit Anti-human lambda und Anti-human kappa Antikörper wurde die leichte Kette des BARB-4 analysiert. Hierbei konnte mit Hilfe des Anti-lambda Antikörpers eine Bande (etwa 23 kDa) nachgewiesen werden, mit dem Antikörper gegen kappa jedoch nicht.

### 3.1.1 Tumorspezifität des BARB-4 Antikörpers

Bereits in der Vergangenheit konnten ersten Untersuchungen innerhalb der Arbeitsgruppe zeigen, dass der Antikörper BARB-4 ausschließlich mit Tumorzellen, nicht jedoch mit gesunden Zellen auf Geweben reagiert. Um jedoch ein tumorspezifisches Bindungsverhalten von BARB-4 umfassend untersuchen zu können, wurden diesbezüglich ergänzende, immunhistochemische Analysen durchgeführt. Hierfür wurde die Reaktivität des BARB-4 Antikörpers auf weiteren Tumor- und Normalgeweben analysiert. Die verwendeten Paraffinschnitte wurden für die Versuche erst entparaffinisiert und anschließend mit BARB-4 bzw. den



entsprechenden Kontrollantikörpern immunhistochemisch gefärbt. Hierdurch wurde eine aussagekräftige, repräsentative Anzahl an malignen und normalen Geweben aus unterschiedlichen Organen erhalten. Die Ergebnisse der einzelnen Färbungen werden in den nachfolgenden Abschnitten näher beschrieben.

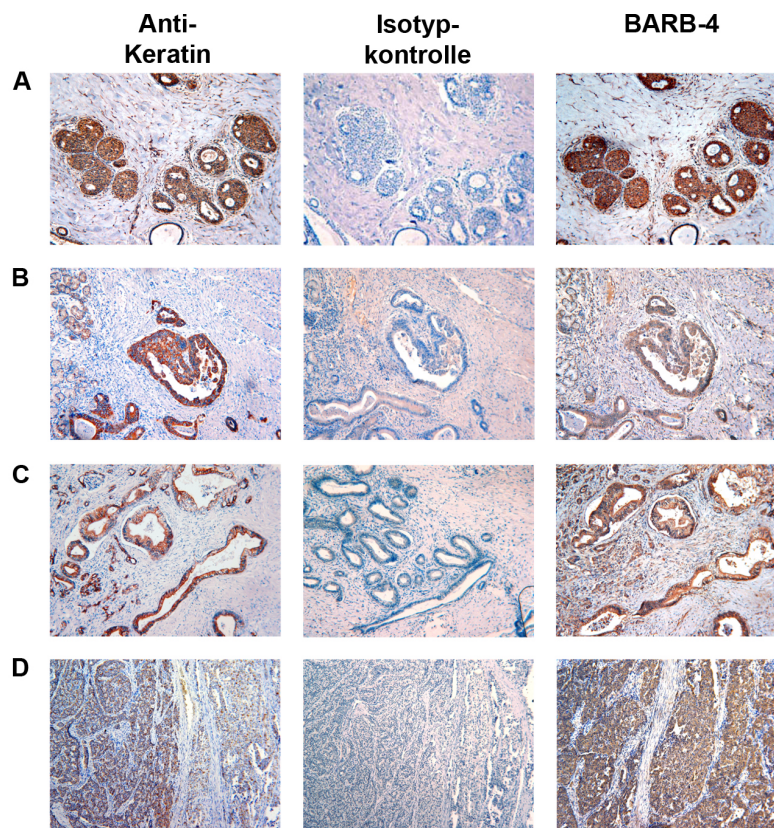
### **3.1.1.1 Immunhistochemische Färbung auf Tumorgeweben**

Für die immunhistochemische Analyse des BARB-4 Antikörpers auf Tumorgewebe wurden, wie in Abschnitt 2.4.3.3 beschrieben, insgesamt zehn Tumorgewebe unterschiedlicher Entitäten analysiert. Je nach Organtyp wurden hierfür zwischen drei und zehn verschiedene Proben untersucht. Dabei wurden sowohl Primärtumoren als auch Metastasen mit Hilfe der immunhistochemischen Färbung getestet. Bei Blasen-, Kolon-, Magen-, Ösophagus, Prostata- und Hodentumorgeweben wurden ausschließlich Primärtumoren analysiert. Es konnte hierbei eine eindeutig positive Reaktion des BARB-4 Antikörpers auf den entsprechenden Primärtumoren nachgewiesen werden. Bei Brust-, Kolon-, Lungen- sowie Pankreastumorgeweben wurden sowohl Färbungen auf Primärtumoren als auch auf entsprechenden Metastasen durchgeführt. Hierbei konnte gezeigt werden, dass BARB-4 auf Brust-, Lungen- sowie Pankreastumorgeweben sowohl eine Bindung an Primärtumoren als auch an die entsprechenden Metastasen aufweist, während der Antikörper auf Kolontumorgeweben nur mit Primärtumoren eine Bindung zeigte. Somit konnte bei den immunhistochemischen Färbungen auf Tumorgeweben mehrheitlich ein eindeutig positives Bindungsverhalten des Antikörpers BARB-4 beobachtet werden. Die Ergebnisse dieser Analysen sind in Tabelle 15 zusammengefasst.

**Tabelle 15: Reaktivität des BARB-4 Antikörpers auf humanen malignen Geweben**

Tumorgewebe	Karzinomtyp	BARB-4 + / -
Blase	Urotheliales Karzinom	3 / 0
Brust	<u>Primärtumor</u> : Invasives duktales Karzinom	4 / 0
	<u>Metastase</u> : Lunge, Lymphknoten	2 / 0
Kolon	<u>Primärtumor</u> : Adenokarzinom	3 / 0
	<u>Metastase</u> : Leber	0 / 1
Lunge	<u>Primärtumor</u> : Neuroendokrines Karzinom, Plattenepithel, Adenokarzinom	9 / 0
	<u>Metastase</u> : Lymphknoten	1 / 0
	Adenokarzinom (intestinal)	5 / 0
Melanom	<u>Metastase</u> : Malignes Melanom	5 / 0
Ösophagus	Adenokarzinom (Barrett Karzinom), Plattenepithel	4 / 0
	<u>Primary Tumor</u> : Adenokarzinom	5 / 0
Pankreas	<u>Metastase</u> : Lymphknoten	1 / 0
	Adenokarzinom	5 / 0
Prostata	Adenokarzinom	5 / 0
Hoden	Seminom	3 / 0

Abbildung 7 zeigt exemplarisch Immunperoxidasefärbungen mit dem BARB-4 Antikörper auf unterschiedlichen Tumorgeweben. Eine deutlich positive Färbung konnte beispielsweise bei dem Adenokarzinom der Brust (A), dem Adenokarzinom des Magens (B), dem Adenokarzinom des Pankreas (C) sowie dem Adenokarzinom der Lunge (D) nachgewiesen werden. Die Färbungen mit der jeweiligen Isotypkontrolle zeigte in keinem Fall eine spezifische Bindung auf den untersuchten Geweben. Zusätzlich wurde mittels Anti-Keratin Antikörper eine gewebespezifische Positivkontrolle (siehe Kapitel 2, Tabelle 11) durchgeführt, bei welcher eine eindeutig positive Färbung dieser Gewebe zu beobachten war.



**Abbildung 7: Immunhistochemische Färbung zur Analyse der Tumorspezifität des Antikörpers BARB-4 auf verschiedenen Tumoren.** Die Paraffinschnitte von Tumorgewebe wurden mit Anti-Keratin als Positivkontrolle gefärbt. Isotypkontrolle (ChromPure IgG) und BARB-4 Antikörper waren beide biotinyliert und wurden für die Analyse in der gleichen Konzentration eingesetzt. **A:** Adenokarzinom der Brust. **B:** Adenokarzinom des Magens. **C:** Adenokarzinom des Pankreas. **D:** Adenokarzinom der Lunge.

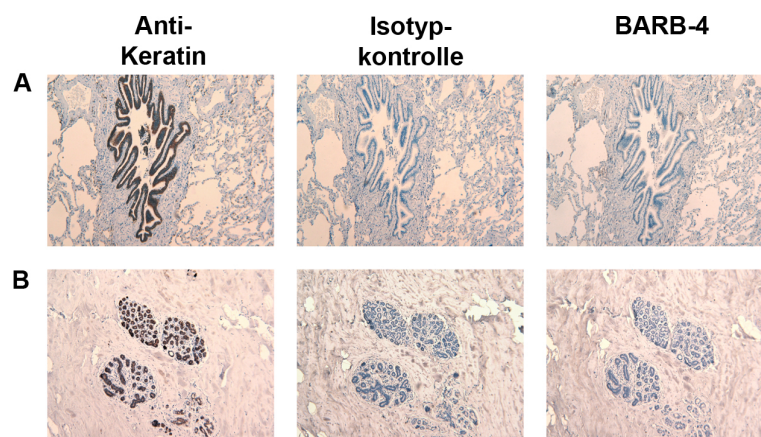
### 3.1.1.2 Immunhistochemische Färbung auf Normalgewebe

Im Gegensatz zu den Tumorgewebe zeigten die untersuchten Normalgewebe keine Reaktion mit dem BARB-4 Antikörper. Hierfür wurden, wie in Abschnitt 2.4.3.3 beschrieben, zehn Normalgewebe unterschiedlicher Entitäten analysiert. Pro Organ wurden hierfür zwischen zwei und fünf Färbungen durchgeführt. Auf keinem der untersuchten Normalgewebe konnte eine spezifische Bindung des BARB-4 Antikörpers festgestellt werden. Die Ergebnisse dieser Färbungen sind in Tabelle 16 zusammengefasst.

**Tabelle 16: Reaktivität des BARB-4 Antikörpers auf humanen nicht-malignen Geweben**

Normalgewebe	Zelltyp	BARB-4 + / -
Brust	glandulär	0 / 3
Kolon	glandulär	0 / 5
Lunge	glandulär, alveolar	0 / 4
Lymphknoten	Lymphozyten	0 / 2
Magen	glandulär	0 / 3
Ösophagus	epithelial	0 / 4
Pankreas	glandulär	0 / 5
Prostata	glandulär	0 / 3
Testis	glandulär	0 / 3
Uterus	epithelial	0 / 3

Zur Verdeutlichung zeigt Abbildung 8 jeweils eine negative Färbung des Antikörpers BARB-4 auf Normalgewebe der Lunge (A) und auf Normalgewebe der Brust (B). Als Positivkontrolle wurden entsprechende Anti-Keratin Antikörper verwendet (siehe Kapitel 2, Tabelle 11). Als Isotypkontrolle diente ein unspezifischer, humaner IgG Antikörper (ChromPure IgG).



**Abbildung 8: Immunhistologische Färbung zur Analyse der Tumorspezifität des Antikörpers BARB-4 auf Normalgewebe.** Die Paraffinschnitte des Normalgewebes wurde mit Anti-Keratin als Positivkontrolle gefärbt. Isotypkontrolle (ChromPure IgG) und BARB-4 Antikörper waren beide biotinyliert und wurden für die Analyse in der gleichen Konzentration eingesetzt. **A:** Normalgewebe der Lunge. **B:** Normalgewebe der Brust.

### **3.1.1.3 Resultat der immunhistochemischen Untersuchungen**

Die Ergebnisse der immunhistochemischen Analysen auf Tumorgewebe zeigen deutlich, dass der Antikörper BARB-4 spezifisch an die Tumorzellen der Gewebeschnitte bindet. Gewebe, welche die tumorösen Areale umgeben, weisen im Gegensatz dazu keine positive Reaktion mit dem Antikörper BARB-4 und somit auch keine Immunperoxidasefärbung auf (siehe Abbildung 7). Die Untersuchungen auf Tumorgewebe deuten somit auf ein tumorspezifisches Bindungsverhalten des Antikörpers hin. Immunhistochemische Analysen auf Normalgewebe bekräftigen diese Annahme. Auf keinem der untersuchten Normalgewebe konnte eine spezifische Bindung des Antikörpers BARB-4 beobachtet werden (siehe Tabelle 16 sowie Abbildung 8). Zusammenfassend konnte so ein eindeutig tumorspezifisches Bindungsverhalten des Antikörpers BARB-4 belegt werden.

Um die Lokalisation des BARB-4 Antigens in den Tumorzellen besser bestimmen zu können, wurden zusätzlich Zytospinpräparate aus Tumorzellen mit BARB-4 Antikörper immunhistochemisch gefärbt. Für die Analyse wurden sowohl Pankreaskarzinomzellen (BxPC-3) als auch Lungenkarzinomzellen (A549) verwendet. Hierbei konnte beobachtet werden, dass bei den malignen Zellen ausschließlich Membran und Zytoplasma jedoch keine Kernbestandteile angefärbt wurden (nicht abgebildet). Eine Lokalisation des BARB-4 Antigens in diesen Kompartimenten von Tumorzellen ist daher nahe liegend. Um die Lokalisation des Antigens auf der Oberfläche der Tumorzellmembran zu bestätigen, wurden wie unter Abschnitt 3.1.3 beschrieben, weitere Analysen durchgeführt.

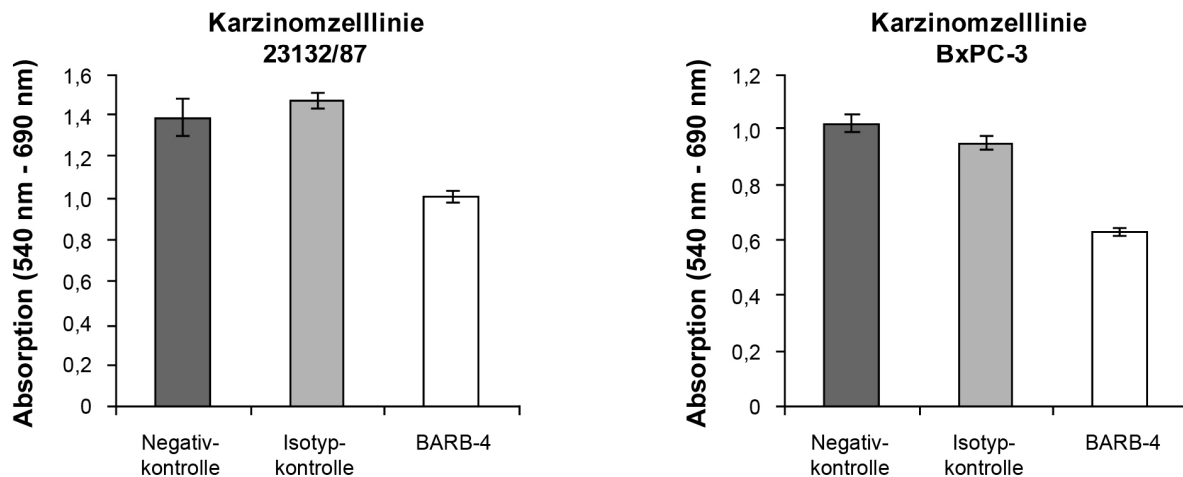
### **3.1.2 Funktionelle Analysen des BARB-4 Antikörpers**

Für die Charakterisierung des BARB-4 Antikörpers wurden verschiedene Untersuchungen bezüglich potentieller Funktionen durchgeführt. Bei den Analysen wurden insbesondere solche funktionellen Aspekte berücksichtigt, die in direktem Zusammenhang mit typischen Eigenschaften von Krebszellen stehen. Solche charakteristischen Merkmale maligner Zellen sind unkontrolliertes Wachstum und unkontrollierte Teilungsfähigkeit, ebenso wie die Infiltration in gesundes Gewebe und dessen anschließende Zerstörung [7]. Innerhalb der Arbeitsgruppe konnte für viele

IgM Antikörper eine Hemmung der Zellproliferation sowie das Auslösen der Apoptose in Tumorzellen nachgewiesen werden [55, 129, 138, 178]. Der Einfluss des BARB-4 Antikörpers auf die Zellproliferation und Apoptose in Tumorzellen wurde daher laborintern näher analysiert. Die Ergebnisse der MTT und Cell Death Detektion ELISA<sup>PLUS</sup> Analysen sind nachfolgend (Abschnitte 3.1.2.1 und 3.1.2.2) dargestellt. Zusätzlich wurde in Zusammenarbeit mit Kilian Rückl die Tumorzelladhäsion und -motilität untersucht. Es handelt sich hierbei um zelluläre Prozesse, die besonders für metastasierende Zellen essentiell sind. Die Ergebnisse werden ebenfalls nachfolgend (Abschnitte 3.1.2.3 und 3.1.2.4) dargestellt.

### **3.1.2.1 Hemmung der Zellproliferation**

Die Auswirkung des Antikörpers BARB-4 auf die Zellproliferation wurde mit Hilfe des MTT-Tests überprüft. Wie in Abschnitt 2.3.4 beschrieben, wurden hierfür verschiedene, adhärenente Karzinomzelllinien (23132/87 und BxPC-3) mit dem Antikörper BARB-4 und der entsprechenden Isotypkontrolle (ChromPure IgG) inkubiert. Abbildung 9 zeigt die Ergebnisse, die nach 48 h Inkubationszeit gemessen wurden. Für die Proliferationsanalyse lag BARB-4 in einer Endkonzentration von 100 µg/ml vor. Nach 48 h war auf den verschiedenen Zelllinien (23132/87 und BxPC-3) bei allen BARB-4 Ansätzen eine deutlich verminderte Absorption im Vergleich zur Isotypkontrolle und Negativkontrolle messbar. Im Gegensatz dazu war zwischen Negativkontrolle und Isotypkontrolle kaum ein Unterschied zu beobachten. Da die gemessene Absorption direkt mit der Zellproliferation korreliert, konnte auf den untersuchten Zelllinien ein eindeutiger Rückgang der Zellproliferation unter dem Einfluss des Antikörpers BARB-4 verzeichnet werden.



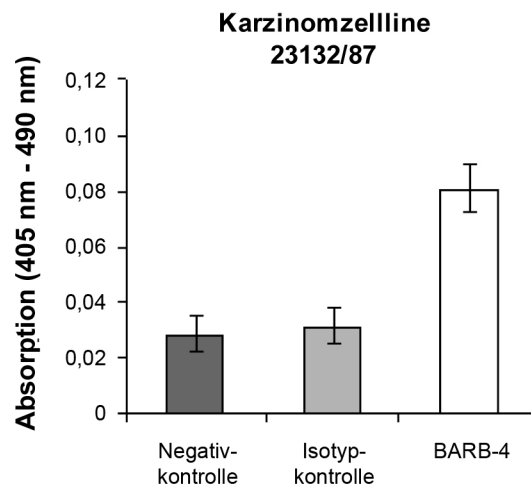
**Abbildung 9: Analyse der Funktionalität des BARB-4 Antikörpers bezüglich der Zellproliferation mittels MTT-Test.** Die Magenkarzinomzellen (23132/87) und die Pankreaskarzinomzellen (BxPC-3) wurden 48 h mit dem BARB-4 Antikörper oder der Isotypkontrolle (ChromPure IgG) inkubiert. Als Negativkontrolle dienten Zellen, die in Kulturmedium inkubiert wurden. Nach Zugabe von MTT wurde die Absorption der Zellen spektrometrisch bestimmt. Je höher dabei die gemessene Absorption lag, desto mehr lebende Zellen waren in dem Ansatz vorhanden.

### 3.1.2.2 Induktion von Apoptose

Die Beseitigung von Körperzellen in Form von Apoptose gilt als besonders selektiv und effizient [179]. Daher wurde die in vitro Proliferationshemmung von Tumorzellen durch BARB-4 Antikörper anschließend mit Hilfe eines spezifischen Apoptosetests näher untersucht, um eventuell eine Induktion von Apoptose verifizieren zu können.

In Abbildung 10 ist das Ergebnis des Cell Death Detection ELISA<sup>PLUS</sup> Apoptosetests für Magenkarzinomzellen (23132/87) dargestellt. Die Magenkarzinomzellen wurden für 48 h mit BARB-4 Antikörper und der Isotypkontrolle (ChromPure IgG) inkubiert. Als Negativkontrolle dienten Zellen, die ohne Zusatz von Antikörper kultiviert wurden. Bei dem Test wird mittels quantitativem Sandwich-Enzym-Immunoassay die Intensität einer spezifischen Färbung bestimmt. Die für die Färbung verantwortlichen Antikörper sind dabei gegen bestimmte, beim Apoptosevorgang entstehende Histon- bzw. DNA-Komponenten gerichtet. Die Farbintensität des Reaktionsproduktes ist zur Menge der vorhandenen Nukleosomen proportional und damit auch zur Anzahl apoptotischer Zellen. In diesem Versuch konnte im Vergleich zur Isotyp- und Negativkontrolle eine deutlich erhöhte Absorption der Zellen nach der Inkubation mit

dem BARB-4 Antikörper beobachtet werden. Die Analyse zeigt somit, dass der BARB-4 Antikörper auf den untersuchten Zellen Apoptose induziert.



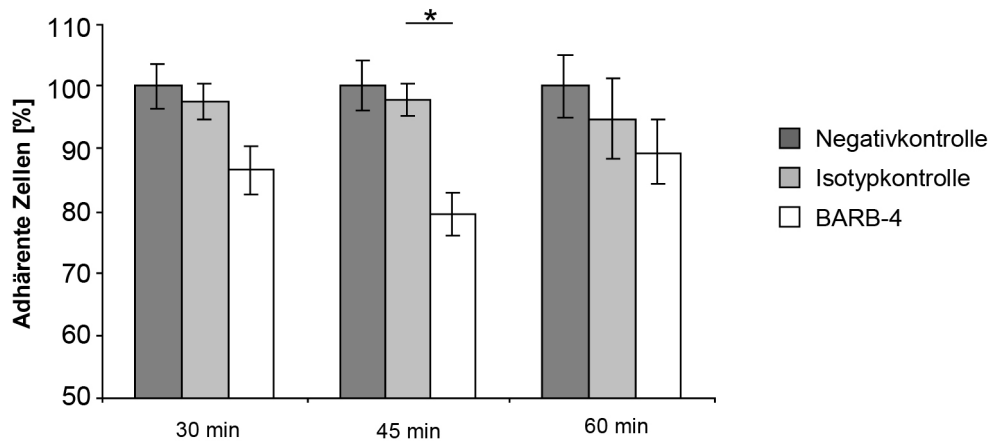
**Abbildung 10: Analyse der Funktionalität der Antikörpers BARB-4 mit Hilfe des Apoptosetests Cell Death Detection ELISA<sup>PLUS</sup>.** Die Magenkarzinomzellen 23132/87 wurden 48 h lang mit BARB-4 Antikörper und Isotypkontrolle (ChromPure IgG) inkubiert. Als Negativkontrolle dienten Zellen, die in Kulturmedium inkubiert waren. Beide Antikörper wurden in einer Endkonzentration von 10 µg/ml eingesetzt. Die Farbintensität wird dabei über die Absorption bei der Wellenlänge 490 nm bestimmt und ist zu dem Anteil an apoptotischen Zellen proportional.

### 3.1.2.3 Hemmung der Tumorzelladhäsion

Der Einfluss des tumorspezifischen Antikörpers BARB-4 auf die Zelladhäsion von Tumorzellen wurde lichtmikroskopisch untersucht. Für die Analyse wurden adhärent wachsende Pankreaskarzinomzellen (BxPC-3) verwendet. Diese wurden sofort nach der Aussaat mit BARB-4 Antikörper inkubiert und während ihrer Anwachsphase beobachtet. Als Kontrollen dienten Zellansätze, die ausschließlich mit Kulturmedium oder mit ChromPure IgG (Isotypkontrolle) versetzt waren. Nach bestimmten Inkubationszeiten wurden die Zellen gezählt. Dabei konnte beobachtet werden, dass in allen BARB-4 Ansätzen (30, 45 und 60 min) weniger Zellen angewachsen waren. Die Zellzahl war jedoch nach 45 min deutlich am geringsten. Eine laborinterne, statistische Auswertung belegte die Signifikanz der Messung nach 45 min. Das Ergebnis ist in Abbildung 11 dargestellt. Für die Berechnung der Signifikanz wurde ein t-Test für unabhängige Stichproben verwendet. Die Analyse wurde mit der statistischen Software R durchgeführt und graphisch in EXCEL (Microsoft) dargestellt



[155]. Die Berechnung für die Mittelwerte der BARB-4 inkubierten Zellen und der Isotypkontrolle ergab einen p-Wert von  $p < 0,05$ . Die Adhäsion der BARB-4 behandelten Zellen wurde, bezogen auf unbehandelte Zellen, nach 45 min um etwa 20% reduziert. Auch nach 30 und 60 min war, wie oben beschrieben, eine verminderte Adhäsion der BARB-4 inkubierten Zellen detektierbar. Diese unterschieden sich jedoch nicht signifikant von den entsprechenden Kontrollen.



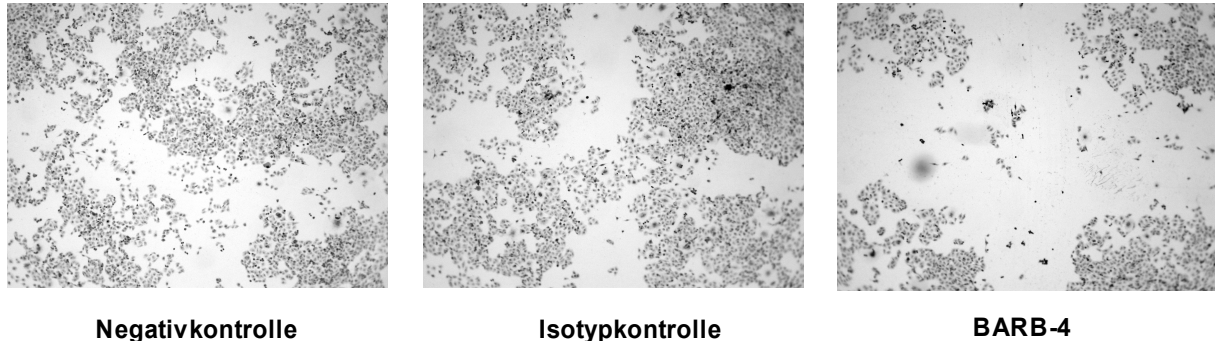
**Abbildung 11: Histogramm der Zelladhäsionsanalyse.** Pankreaskarzinomzellen (BxPC-3) wurden während ihrer Anwachphase für 30, 45 oder 60 min mit BARB-4 Antikörper und Isotypkontrolle (ChromPure IgG) inkubiert. Als Negativkontrolle dienten unbehandelte Zellen in Kulturmedium. Beide Antikörper wurden in einer Endkonzentration von 200  $\mu\text{g/ml}$  eingesetzt. Der Anteil an adhären Zellen wurde mittels Lichtmikroskop bestimmt. Die Zellzahl der Zellen die nur in Kulturmedium inkubiert waren, wurde dabei auf 100% eingestellt. Nach 45 min war die Zellzahl der adhären Zellen des BARB-4 Ansatzes im Verhältnis zur Negativkontrolle um etwa 20% reduziert. \*  $p < 0,05$ .

### 3.1.2.4 Hemmung der Tumorzellmotilität

Die Wirkung des tumorspezifischen Antikörpers BARB-4 auf die Beweglichkeit von Tumorzellen wurde lichtmikroskopisch untersucht. Hierfür wurden, wie in Abschnitt 2.3.7 beschrieben, Pankreaskarzinomzellen (BxPC-3) ausgesät. Nachdem die Zellen in Form eines Monolayers (einschichtig) angewachsen waren, wurde ein Kreuz in den Zellrasen gekratzt. Dieser wurde danach sofort mit BARB-4 Antikörper inkubiert. Als Kontrollen dienten Ansätze in Kulturmedium mit und ohne humanem ChromPure IgG (Isotypkontrolle).

Nach 24 h Inkubationszeit bei 37 °C war in dem Ansatz mit BARB-4 das Kreuz noch deutlich zu erkennen. Bei den beiden Kontrollen waren zu diesem Zeitpunkt bereits

wieder Zellen in die freige kratzte Fläche eingewachsen. Dieses Ergebnis zeigt, dass der BARB-4 Antikörpers eine inhibitorische Wirkung auf die Tumorzellmotilität besitzt.

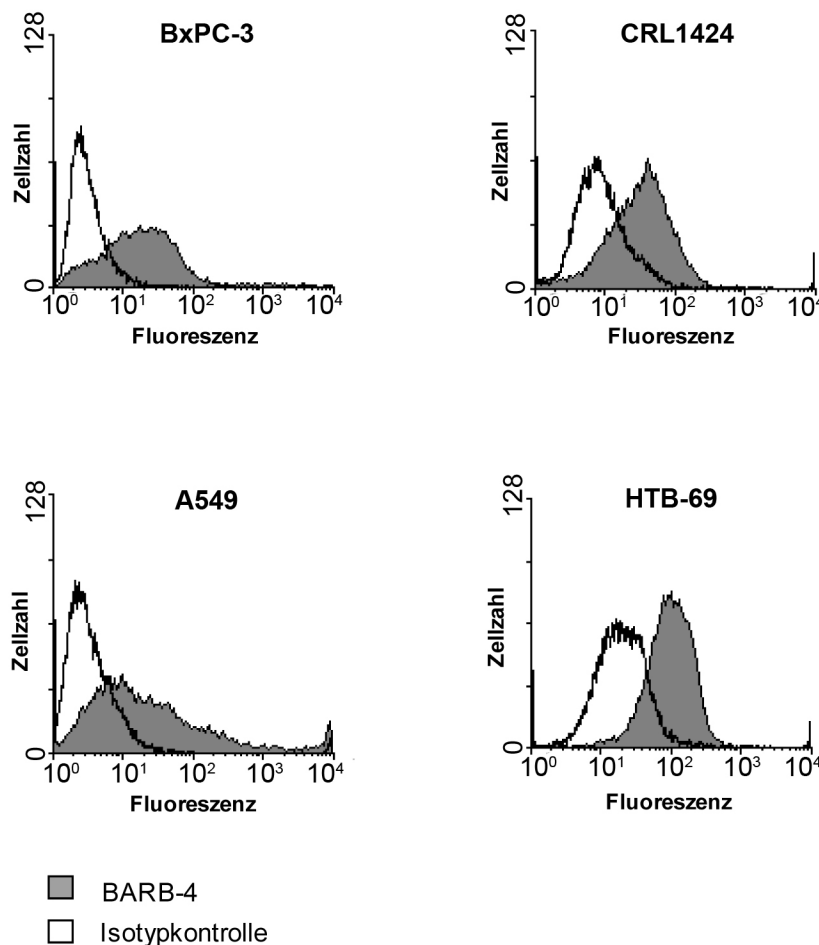


**Abbildung 12: Analyse der Zellmotilität von Pankreaskarzinomzellen BxPC-3 unter Einwirkung von BARB-4 Antikörper.** In den zu 80% konfluenten Zellrasen wurde ein Kreuz gekratzt und anschließend für 24 h mit 400 µg/ml BARB-4 Antikörper inkubiert. Als Negativkontrolle diente ein Ansatz mit ausschließlich Kulturmedium, als Isotypkontrolle ein Ansatz mit ChromPure IgG in der gleichen Konzentration wie BARB-4. Ausgewertet wurden die Ansätze unter dem Lichtmikroskop. Betrachtet wurde dabei das Einwachsen der Zellen in den freige kratzten Bereich unter Antikörperinkubation. Im Gegensatz zu den beiden Kontrollen zeigt der BARB-4 Ansatz keine Migration der BxPC-3 Zellen in den freien Bereich.

### 3.1.3 Expression des BARB-4 Antigens

#### 3.1.3.1 FACS-Analysen auf Tumorzellen

Bereits bei den immunhistochemischen Untersuchungen konnte beobachtet werden, dass sowohl Membran als auch Zytoplasma nicht jedoch der Kern von Tumorzellen mit dem BARB-4 Antikörper reagierten (siehe Abschnitt 3.1.1.3). Um die Lokalisation des BARB-4 Antigens auf der Zellmembran von Krebszellen zu bestätigen, wurden FACS-Analysen durchgeführt. Es wurden hierfür verschiedene Zelllinien getestet. Die Untersuchung von Pankreaskarzinomzellen (BxPC-3), von Lungenkarzinomzellen (A549) sowie von Melanomen (CRL-1424 und HTB-69) mittels Durchflusszytometrie (FACS) zeigte eine eindeutige Verschiebung der Fluoreszenzintensität mit dem BARB-4 Antikörper im Vergleich zur Isotypkontrolle (Abbildung 13). Dies bedeutet, dass der BARB-4 Antikörper an die Zellmembran der verschiedenen Zelllinien binden kann und sein Antigen somit nachweislich auf der Zelloberfläche dieser Krebszellen lokalisiert ist.

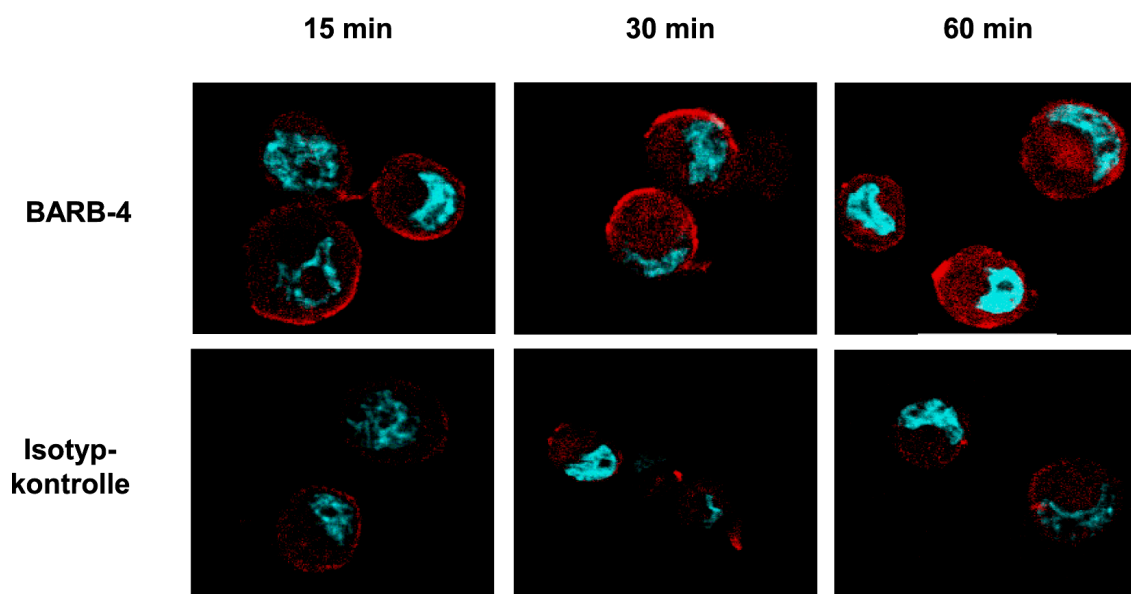


**Abbildung 13: FACS-Analysen mit BARB-4 Antikörper auf unterschiedlichen Krebszelllinien.** Pankreaskarzinomzellen (BxPC-3), Lungenkarzinomzellen (A549) und Melanome (CRL-1424 und HTB-69) wurden mit BARB-4 Antikörper (100-300  $\mu\text{g/ml}$ ) inkubiert. Als Isotypkontrolle wurde der humane ChromPure IgG in der entsprechenden Konzentration verwendet. Es ist auf allen Zelllinien eine deutliche Verschiebung der Fluoreszenzintensität zu sehen.

### 3.1.3.2 Endozytose des BARB-4 Antikörpers

Zusätzlich zu den in Abschnitt 3.1.3.1 beschriebenen FACS-Analysen konnte die Lokalisation des BARB-4 Antigens auf der Zelloberfläche durch einen Immunfluoreszenzversuch bestätigt werden. Um zu überprüfen, ob der Antikörper BARB-4 nach seiner Bindung an der Tumorzelloberfläche internalisiert wird, wurde in Zusammenarbeit mit Kilian Rückl eine entsprechende Immunfluoreszenzanalyse durchgeführt. Zu diesem Zweck wurde der Antikörper BARB-4 und die Isotypkontrolle (ChromPure IgG), wie in Abschnitt 2.7.2.1 beschrieben, direkt fluoreszenzmarkiert

(Fluorescent orange 548 reactive). Pankreaskarzinomzellen (BxPC-3) wurden anschließend für 15, 30 und 60 min mit den entsprechenden Antikörpern inkubiert. Nach einer Inkubationszeit von 15 min konnte eine Anlagerung von BARB-4 an die Tumorzellmembran beobachtet werden. Nach 30 min war die Bindung an die Membran der malignen Zellen immer noch deutlich zu erkennen, während nach 60 min bereits eine Internalisierung des Antikörpers detektiert werden konnte. Bei der Isotypkontrolle wurde im Gegensatz hierzu kaum eine Bindung beobachtet. In Abbildung 14 ist das Ergebnis dieser Untersuchung zusammenfassend dargestellt.



**Abbildung 14: Immunfluoreszenzanalyse mit dem Antikörper BARB-4 zur Detektion einer Endozytose.** Pankreaskarzinomzellen (BxPC-3) wurden mit Fluorescent orange 548 reaktiv-gekoppeltem BARB-4 Antikörper bzw. der entsprechenden Isotypkontrolle (ChromPure IgG) für 15, 30 und 60 min inkubiert und anschließend konfokalmikroskopisch ausgewertet. Der BARB-4 Antikörper (obere Reihe) wies nach 15 min und 30 min eine Bindung auf der Tumorzelloberfläche auf und wurde nach 60 min internalisiert. Bei der Isotypkontrolle (untere Reihe) konnte keine nennenswerte Bindung detektiert werden.

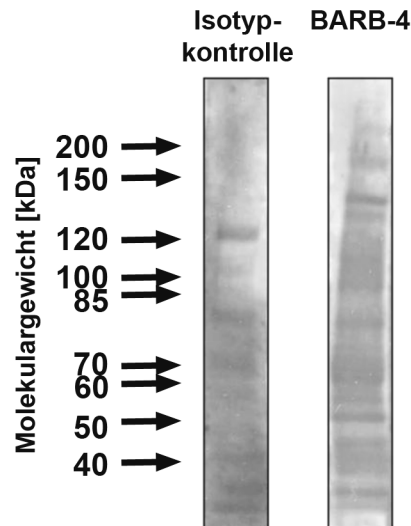
## 3.2 Isolierung und Identifizierung des BARB-4 Antigens

### 3.2.1 Western Blot-Analyse auf Membranextrakten von Tumorzellen

Die positive Bindung des BARB-4 Antikörpers bei FACS-Analysen sowie die Ergebnisse der immunhistochemischen Färbungen bestätigten die Lokalisation des Antigens auf der Oberfläche von Krebszellen. Aus diesem Grund wurden

Membranextrakte aus Kebszellen angefertigt und mittels Western Blot-Analyse auf die Reaktion mit dem BARB-4 Antikörper getestet (siehe Abschnitte 2.5.6 und 2.5.7). Für den Versuch wurde die Pankreaskarzinomzelllinie BxPC-3 verwendet, da sie in FACS-Analysen eine deutliche Reaktion mit dem Antikörper BARB-4 zeigte. Als Isotypkontrolle diente ein zweiter Blot, der mit ChromPure IgG inkubiert wurde.

Abbildung 15 zeigt die Ergebnisse der Western Blot-Analyse mit BARB-4 auf Membranextrakten der Zelllinie BXPC-3. Es sind mehrere Banden im BARB-4 Blot zu erkennen. Einige davon erscheinen auch in der Isotypkontrolle. Hierbei handelt es sich um Bindungen, die aufgrund einer allgemeinen, unspezifischen Anhaftung der IgG Antikörper zustande kommen können. Diese Banden können als potentielles Antigen des BARB-4 Antikörpers ausgeschlossen werden, da sie unspezifisch für den Antikörper sind. Es sind in dem Blot jedoch auch einige Banden erkennbar, die in der Isotypkontrolle nicht erscheinen. Dies deutet darauf hin, dass der Antikörper eventuell nicht nur ein einzelnes Antigen erkennen kann. Dies ist nicht ungewöhnlich, da es sich bei BARB-4 um einen natürlichen Antikörper handelt. Diese interagieren statt mit einem einzelnen, spezifischen Antigen mit bestimmten, konservierten Strukturen auf Molekülen [33-35]. Schwächere Banden waren aufgrund des hohen Hintergrunds nur schlecht erkennbar. Rückschlüsse bezüglich des BARB-4 Antigens konnten mit Hilfe dieses Versuchs nicht gezogen werden. Um das Bindungsverhalten von BARB-4 im Western Blot genauer untersuchen zu können, musste das Antigen des Antikörpers erst aus dem Rohmembranextrakt chromatographisch aufgereinigt werden. Die Aufreinigung erfolgte mit Hilfe der Affinitätschromatographie. Das Ergebnis ist nachfolgend in Abschnitt 3.2.2 dargestellt.



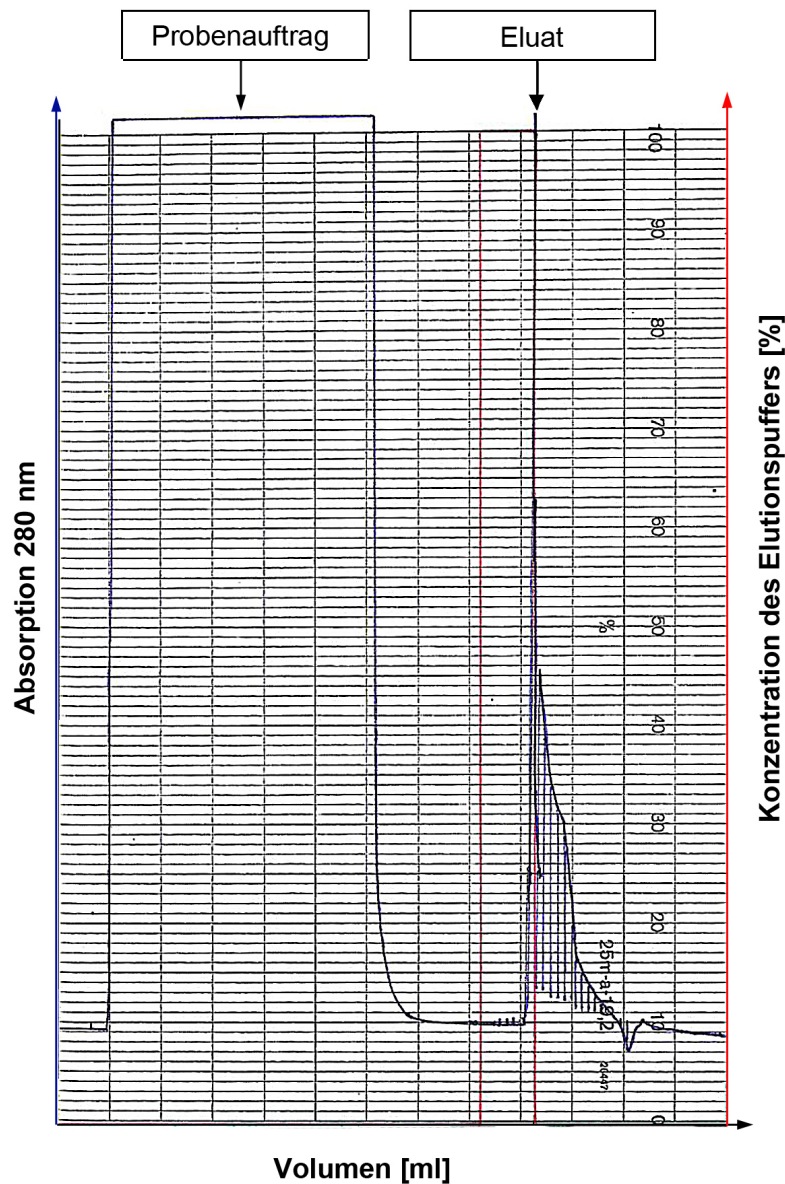
**Abbildung 15: Western Blot-Analyse des Membranproteinextrakts aus Pankreaskarzinomzellen (BxPC-3) mit BARB-4 Antikörper.** Pro Ansatz wurden 40 µg Protein eingesetzt. Eine Isotypkontrolle (ChromPure IgG) wurde in der gleichen Konzentration (~1 mg/ml) verwendet, um unspezifische Bindungen auszuschließen. Aufgrund der hohen Anzahl an Banden war dem unaufgereinigten Membranproteinextrakt kein Hinweis auf das BARB-4 Antigen zu entnehmen.

### 3.2.2 Chromatographische Aufreinigung des BARB-4 Antigens

Die Aufreinigung des BARB-4 Antigens aus den komplexen Rohextrakten (Membranproteinextrakten) wurde mit Hilfe einer *fast protein liquid chromatography*- (FPLC-) Apparatur (Pharmacia, Freiburg) durchgeführt. Sie erfolgte mittels Affinitätschromatographie über eine selbst hergestellte Säule. Bei dieser Methode wird neben dem Abtrennen störender Fremdproteine gleichzeitig eine Anreicherung des Antigens erzielt. Das Prinzip der Affinitätschromatographie basiert hierbei auf der spezifischen Wechselwirkung zweier Reaktionspartner. Dieses chromatographische Verfahren ist daher eine effektive Methode zur selektiven Isolierung eines Zielproteins. Das zu isolierende Target wird bei diesem Verfahren an eine für das Zielmolekül spezifische Säule gebunden, während die restlichen Proteine nicht mit dieser interagieren und so durch Waschprozesse abgetrennt werden können. Anschließend kann das Zielprotein bei der Elution wieder freigesetzt und separat aufgefangen werden [180-181].

Der Versuch wurde wie unter Abschnitt 2.5.8.2 beschrieben durchgeführt. Der Antikörper BARB-4 wurde hierfür an eine CNBr-aktivierte Sepharose™ Matrix gekoppelt. Über dieses Säulenmaterial wurde anschließend BxPC-3

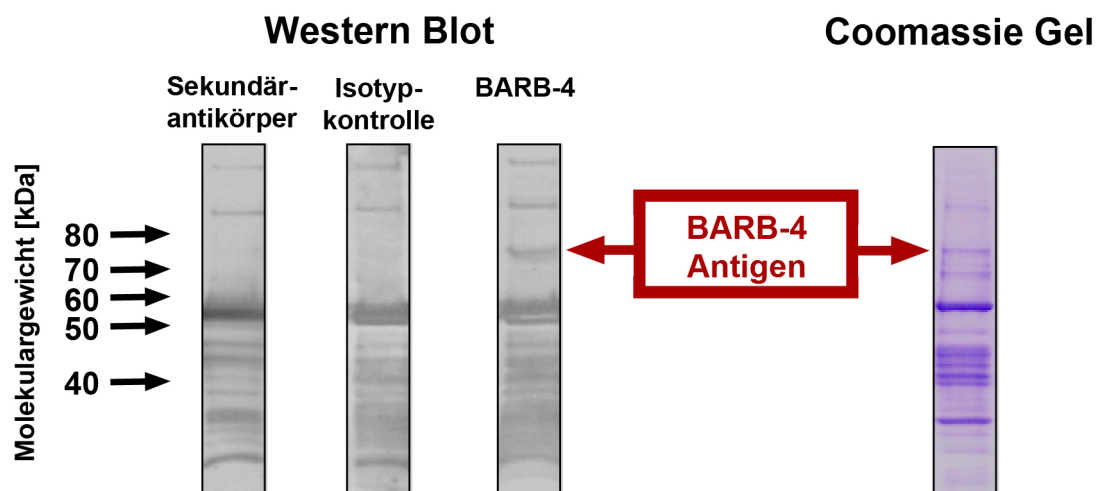
Membranproteinextrakt aufgetragen. Nach dem Waschen wurde das Eluat mit dem gesuchten Antigen fraktioniert aufgefangen. Das Elutionsprofil der Affinitätschromatographie ist in Abbildung 16 dargestellt.



**Abbildung 16: Elutionsprofil der Affinitätschromatographie.** Membranextrakte von Pankreaskarzinomzellen (BxPC-3) wurden mittels Affinitätschromatographie bei einer Flussrate von 2 ml/min aufgereinigt. Die Schreibergeschwindigkeit variierte dabei. Die Detektion der Proteine fand bei 280 nm statt (blaue Linie). Die rote Linie beschreibt den Verlauf der Elutionspufferkonzentration im Bereich von 0-100%.

Das BARB-4 Target konnte im Anschluss daran mit Hilfe einer Western Blot-Analyse im Eluat nachgewiesen werden. Es konnte eine Bande bei etwa 78 kDa detektiert werden, die nicht in der Isotypkontrolle (ChromPure IgG) erschien. Dies deutet darauf hin, dass es sich bei der entsprechenden Bande um eine spezifische Antikörperbindung handelt.

In einem zusätzlichen Ansatz mit nur Sekundärantikörpern konnten weitere im Blot vorhandene Banden als Antikörperfragmente identifiziert werden, welche durch Säulenbluten in das Eluat gelangten. Für die anschließende Identifizierung der Proteinbande wurde ein Polyacrylamidgel mit dem Eluat angefertigt. Nach der Detektion der Bande durch eine Coomassie-Färbung konnte das entsprechende Protein ausgeschnitten werden. Die Bande war dabei klar abgetrennt von störenden Fremdproteinen und somit gut aus dem Gel isolierbar. Das Ergebnis der Western Blot-Analysen sowie der entsprechenden Coomassie-Färbung ist in Abbildung 17 dargestellt.



**Abbildung 17: Ergebnis der affinitätschromatischen Aufreinigung des BARB-4 Antigens aus Pankreaskarzinomzellen BxPC-3.** Nach der Affinitätschromatographie lag das Antigen gut isoliert von Fremdproteinen vor. Zur besseren Detektion des Zielproteins im Western Blot und im Coomassie Gel wurde das Eluat nochmals aufkonzentriert (100  $\mu$ l Eluat wurden auf 10  $\mu$ l Ladepuffer (1-fach) plus 1  $\mu$ l DTT (1M) eingengt), bevor es für die entsprechenden Analysen verwendet wurde. Neben dem BARB-4 Ansatz (300  $\mu$ g/ml) dienten Ansätze mit nur Sekundärantikörper und Isotypkontrolle (humaner ChromPure IgG) als Negativkontrollen im Western Blot. Hierbei wurden beim Ansatz mit nur Sekundärantikörper BARB-4 Fragmente detektiert. Der Antikörper BARB-4 gelangte durch das Säulenbluten der selbst hergestellten Chromatographiesäule in das Eluat. Für die Sequenzierung wurde die 78 kDa Antigenbande aus dem Coomassie gefärbten Gel ausgeschnitten.



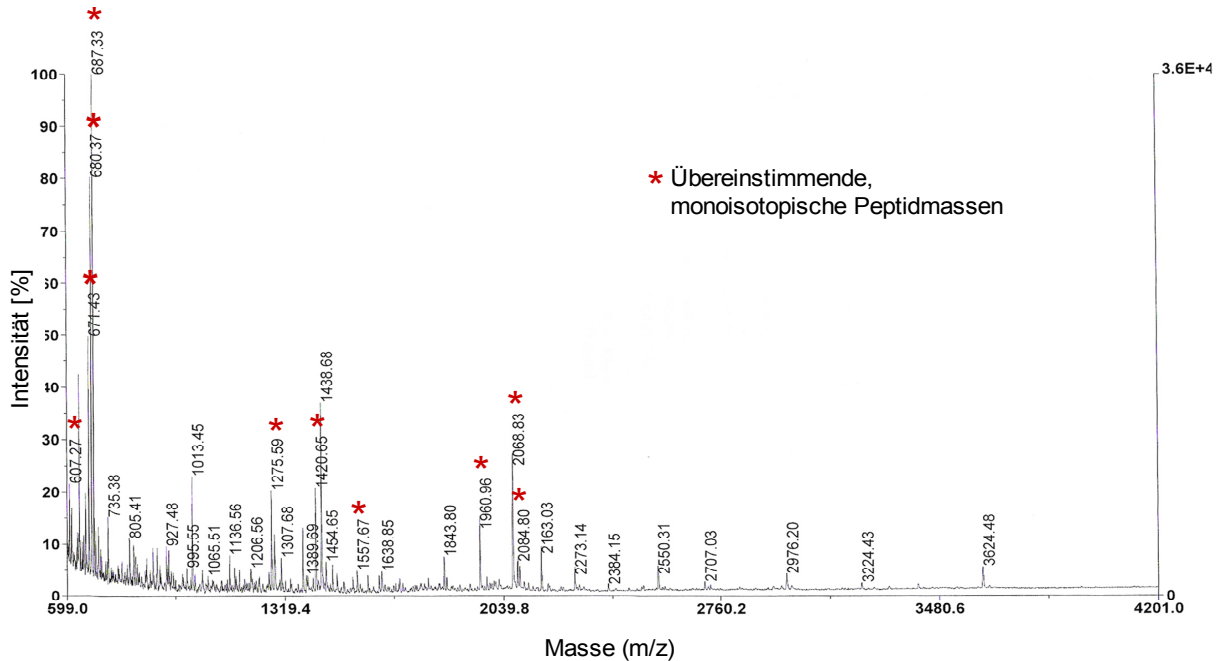
### 3.2.3 Identifizierung des BARB-4 Antigens

Die Identifizierung des isolierten Proteins erfolgte durch die Fa. TopLab (Martinsried). Hierbei wurde mittels MALDI-Massenspektrometrie eine sogenannte Peptidmassen-Fingerprint-Analyse durchgeführt, bei welcher die Peptidfragmente des verdauten Proteins im Massenspektrometer bezüglich ihrer Masse und Ladung aufgetrennt wurden. In dem ermittelten Spektrogramm wurde das Masse/Ladungsverhältnis ( $m/z$ ) gegen die Signalintensität aufgezeichnet. Dieses Spektrogramm wurde anschließend mit den Spektrogrammen bekannter Proteine aus entsprechenden Datenbanken verglichen. Mit Hilfe dieser Methode können unbekannte Proteine zugeordnet und identifiziert werden.

Nach dem Trypsinverdau und anschließender Analyse lieferte die 78 kDa Bande bei der Suche in der NCBI-Sequenzdatenbank mehrere Rankingkandidaten, die berechnet nach übereinstimmenden Peptidfragmenten mit einer Wahrscheinlichkeit von  $p = 1$  zugeordnet werden konnten. Bei zwei dieser Kandidaten handelte es sich um Isoformen des gleichen Proteins, dem *TATA-binding protein-associated factor 15* (TAF15). Die Proteinsequenzen dieser Isoformen aus der NCBI-Datenbank wurden mit Hilfe des DNAMAN 5.2 miteinander verglichen. Dabei wurde festgestellt, dass sie sich lediglich durch 3 Aminosäuren unterscheiden. Isoform 1 (Zugangsnummer: NP\_631961.1) enthält 3 Aminosäuren (Aminosäure 60, 61 und 62 der Peptidsequenz) mehr als Isoform 2 (Zugangsnummer: NP\_003478.1). Weitere Treffer mit der gleichen Wahrscheinlichkeit wurden mit Hilfe des *Basic Local Alignment Search Tool* (BLAST) auf Übereinstimmungen untersucht. Sie wiesen in ihrer Proteinsequenz eine 100%ige Übereinstimmung zur Isoform 1 von TAF15 auf. Dies bedeutet, dass die weiteren Einträge in der Datenbank (Zugangsnummern: Q92804, AAC50932.1, BAA33811.1) ein identisches Protein dieser TAF15 Isoform beschreiben.

Bei der Analyse konnten außerdem 16 der experimentell ermittelten Peptidmassen dem humanen TAF15 Protein zugeordnet werden. Der Anteil der Aminosäuresequenz, welcher dabei abgedeckt wurde, lag bei mindestens 22%. Darüber hinaus stimmten die Massen der ermittelten Peptidfragmente mit den errechneten Peptidmassen von TAF15 mit einer hohen Genauigkeit (Fehler  $< 30$  ppm) überein. Die isolierte 78 kDa Proteinbande konnte daher mit Hilfe dieser Daten als humanes TAF15 Protein identifiziert werden. Das ermittelte

Spektrogramm ist in Abbildung 18 dargestellt. Fragmente, die dem humanen TAF15 zugeordnet werden konnten, sind mit einem Stern markiert.



**Abbildung 18: Identifizierung des BARB-4 Antigens durch Massenspektrometrie.** Spektrogramm nach massenspektroskopischer Analyse des potentiellen BARB-4 Antigens. Die 78 kDa Proteinbande wurde mittels Trypsin verdaut und die daraus resultierenden Massen der Peptidfragmente mit den Massen bekannter Proteine auf Übereinstimmungen untersucht. Die Suche in der NCBI-Datenbank ergab humanes TAF15 (*TATA-binding protein-associated factor 15*). Mit einer Wahrscheinlichkeit von  $p = 1$  und einer Aminosäuresequenzübereinstimmung von mindestens 22% konnte TAF15 identifiziert werden. Die Peptidmassen stimmten dabei mit einer Genauigkeit (Fehler  $<30$  ppm) überein. Die experimentell ermittelten Peptidmassen, welche den theoretischen Massen der Peptidfragmente von humanem TAF15 entsprachen, sind mit einem Stern gekennzeichnet.

Abbildung 19 zeigt die Peptidsequenz des TAF15 aus der NCBI-Datenbank. Hierbei wurden die Übereinstimmungen mit der experimentell gewonnenen Proteinsequenz rot markiert. Sie entsprechen den mit Sternen markierten Peptidfragmenten im Spektrogramm (siehe Abbildung 18).

```

1  msdsgsygqs  ggeqqsyty  gnpgsqgygq  asqsysgygq  ttdssygqny  sgyssyggqsq
61  sgysqsyggy  enqkqssysq  qpynnqggqq  nmessgsqgg  rapsydqppy  gqdsydqqs
121  gydqhggssy  eqsnydqhd  sysqnqggyh  sqrenyshht  qdrrdvsry  gednrgyggg
181  qgggrgrggy  dkdgrgpmg  ssgdrggfk  nfgghrdygp  rtdadsesdn  sdnntifvqg
241  lgegvsdqv  geffkqigii  ktnkktgkpm  inlytdkdtg  kpkgeatvsf  ddppsakaai
301  dwfdgkefhg  niikvsfatr  rpefmrgggs  gggrgrggy  rgrggfqqrg  gdpksgdwvc
361  pnpscgnmf  arrnscnqn  eprpedsrps  ggdfgrgyg  gergyrgrg  rggdrgggyg
421  drsgggyggd  rsgggygsd  rsgggygdr  sgggygdr  ggygdrgg  yggdrgggyg
481  gdrgggygdr  ggygdrgg  yggdrgggyg  drgggygdr  gygdrsr  yggdrgggs
541  yggdrsggyg  gdrsgggyg  drgggygdr  ggygkmgr  ndyrndqrnr  py

```

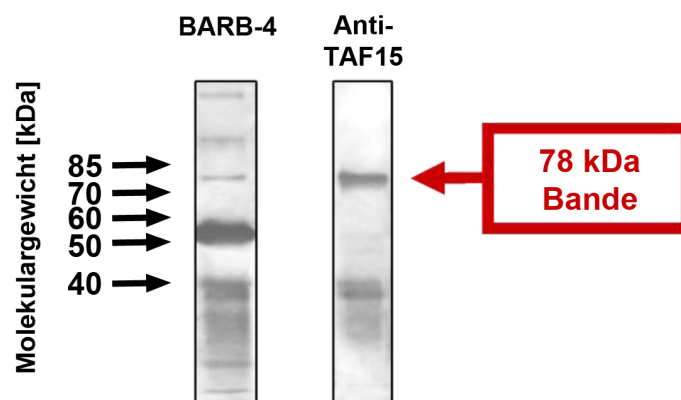
**Abbildung 19: Graphische Darstellung der experimentell ermittelten Peptidsequenzen gegen die Aminosäuresequenz von humanem TAF15 (*TATA-binding protein-associated factor 15*).** Die Peptidsequenz des Proteins stammt aus der NCBI-Datenbank. Es handelt sich hierbei um die Isoform 1 des TAF15 Proteins (NP\_631961.1). Die übereinstimmenden, experimentell ermittelten Peptidsequenzen sind rot dargestellt und entsprechen den im Spektrogramm (Abbildung 18) mit einem Stern gekennzeichneten Peaks.

### 3.3 Validierung des BARB-4 Targets

Das TAF15 Protein, welches auch unter den Namen TAF(II)68, TAF2N oder *RNA-binding protein 56* (RBP56) bekannt ist, gehört wie die nahverwandten TLS (*translocated in liposarcoma*; auch bekannt als FUS (*fusion*)) und EWS (*Ewing's sarcoma*) zur TET (TLS-EWS-TAF15) Familie. Es kommt ubiquitär in fetalen und adulten Geweben vor und konnte in humanen Zellen sowohl im Nukleus als auch im Zytoplasma detektiert werden. TAF15 ist dabei in die Transkription, den mRNA-Transport sowie in den Spleißprozess involviert [182-183]. Neben diesen Funktionen hat TAF15 jedoch auch einen Einfluss auf die Tumorphagenese in einigen Tumortypen. Es kommt in Form von Fusionsproteinen bei Erkrankungen wie dem extraskelettalen myxoidem Chondrosarkom oder der akuten Leukämie vor [184-186]. Das TAF15, welches bei der Identifizierung des BARB-4 Antikörpers gefunden wurde, stammte aus Tumorzellmembranextrakten. Um die Lokalisation des TAF15 Proteins auf der Tumorzellmembran zu bestätigen, wurden weitere Analysen durchgeführt.

### 3.3.1 Western Blot-Analysen mit Anti-TAF15 und BARB-4 Antikörper

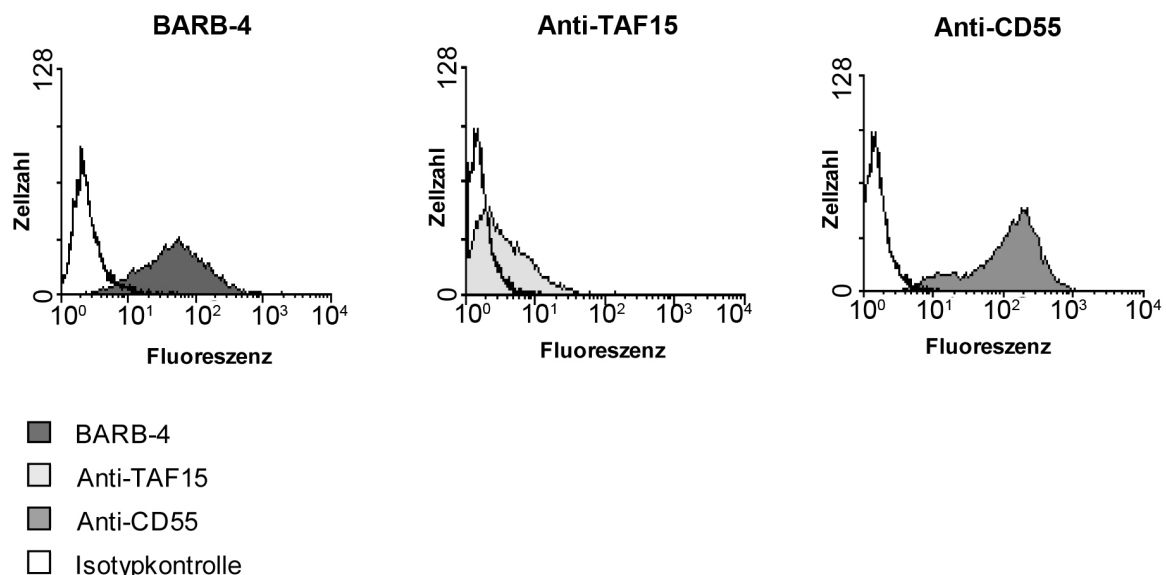
Die Expression des TAF15 Proteins auf der Tumorzellmembran konnte mittels Western Blot-Analyse nachgewiesen werden. Western Blots aus aufgereinigtem Tumorzellmembranextrakt (BxPC-3) ergaben sowohl für den Anti-TAF15 Antikörper als auch für den BARB-4 Antikörper eine deutliche Bande auf gleicher Höhe bei etwa 78 kDa. Im Bereich von 40 kDa kommen in beiden Ansätzen zusätzliche Banden auf gleicher Höhe vor. Dies deutet darauf hin, dass sich in diesem Bereich TAF15 Proteinfragmente befinden, die von beiden Antikörpern erkannt werden können. Eine auffällig starke Bande bei etwa 52 kDa, weitere Banden unterhalb von 40 kDa sowie zwei oberhalb von 85 kDa lokalisierte Banden, welche ausschließlich im Western Blot mit dem BARB-4 Antikörper vorliegen, sind, wie bereits in Abschnitt 3.2.2 beschrieben, Antikörperfragmente (BARB-4). Diese sind durch das Säulenbluten der Affinitätschromatographiesäule in den aufgereinigten Membranproteinextrakt gelangt. Sie können durch den beim Blot verwendeten Sekundärantikörper erkannt werden. In Abbildung 20 ist das Ergebnis dieser Analyse dargestellt. Es konnte hierbei jedoch nicht nur eine Aussage über die extrazelluläre Expression des TAF15 gemacht werden, sondern die Analyse deutet ebenfalls darauf hin, dass die beiden Antikörper BARB-4 und Anti-TAF15 in der Lage sind das gleiche Antigen zu erkennen.



**Abbildung 20: Western Blot-Analyse mit BARB-4 und Anti-TAF15 Antikörper auf aufgereinigtem Tumorzellmembranextrakt.** Mit beiden Antikörpern (BARB-4 200 µg/ml; TAF15 3 µg/ml, AVIVA Systems Biology) erhält man beim Blotten auf BxPC-3 Membranproteinextrakten eine deutliche Bande bei etwa 78 kDa. Die BARB-4 Bande liegt dabei auf der gleichen Höhe wie die Anti-TAF15 Bande. Des Weiteren existieren bei etwa 40 kDa zusätzliche Banden, die in beiden Antikörperansätzen vorkommen. Sie könnten durch TAF15 Fragmente zustande kommen, die bei dieser Höhe vorliegen. Die auffällig starke Bande bei etwa 52 kDa, sowie die zwei oberhalb von 85 kDa und unterhalb von 40 kDa lokalisierten Banden, welche nur im Western Blot mit dem BARB-4 Antikörper vorliegen, sind wie bereits in Abschnitt 3.2.2 beschrieben, Antikörperfragmente, die durch das Säulenbluten der Affinitätschromatographiesäule in dem aufgereinigten Membranproteinextrakt gelangten und durch den Sekundärantikörper erkannt werden.

### 3.3.2 FACS-Analysen mit Anti-TAF15 und BARB-4 Antikörper

Zusätzlich zu den in Abschnitt 3.3.1 beschriebenen Western Blot-Analysen mit Anti-TAF15 und BARB-4 Antikörper auf aufgereinigtem Tumorzellmembranextrakt wurden FACS-Analysen mit den beiden Antikörpern auf Tumorzellen durchgeführt. Diese sollten die Lokalisation von TAF15 auf der Oberfläche von malignen Zellen bestätigen. Mit Hilfe der durchgeführten FACS-Analysen kann jedoch nicht nur die Oberflächenlokalisierung von TAF15 auf Tumorzellen belegt, sondern auch eine eventuelle Verunreinigung des im Western Blot verwendeten Membranextrakts mit intrazellulären Proteinen ausgeschlossen werden. Eine solche Kontamination entsteht gegebenenfalls bei der Präparation der Membranproteine, welche beim Waschenvorgang nicht komplett von den cytosolischen Proteinen abgetrennt werden konnten. Für die FACS-Analysen wurden Pankreaskarzinomzellen (BxPC-3) verwendet. Es konnte hierbei sowohl die positive Bindung des BARB-4 Antikörpers als auch des TAF15 Antikörpers auf Pankreaskarzinomzellen (BXPC-3) im Vergleich zu den Isotypkontrollen gezeigt werden (Abbildung 21). Um zu überprüfen, ob die Zelloberflächenproteine intakt sind, diente ein Antikörper gegen das humane Oberflächenprotein CD55 (Anti-CD55) als Positivkontrolle.



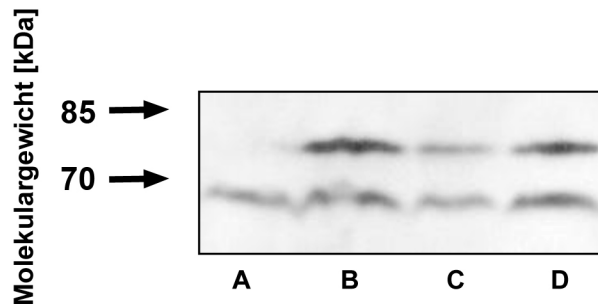
**Abbildung 21: Histogramme der FACS-Analysen auf Pankreaskarzinomzellen BxPC-3 mit BARB-4, Anti-TAF15 Antikörper und der Positivkontrolle Anti-CD55.** Die positive Bindung von BARB-4 (300 µg/ml) und Anti-TAF15 (30 µg/ml, Santa Cruz Biotechnology) bestätigten die Expression des BARB-4 Antigens und des TAF15 Proteins auf der Zelloberfläche von Pankreaskarzinomzellen (BXPC-3). Der Anti-CD55 Antikörper (1:1000) diente dabei als Positivkontrolle.

### 3.3.3 Effekt der TAF15 Proteinregression auf die BARB-4 Antikörperbindung

Um zu bekräftigen, dass TAF15 das BARB-4 Antigen ist, wurde eine RNA-Interferenz (RNAi) durchgeführt. Bei dieser Methode kommt es zum induzierten Abbau der Ziel-RNA und letztendlich zur Hemmung der Proteinexpression des Zielmoleküls TAF15 [161].

Mit spezifischer siRNA (*small interfering RNA*) wurde in Tumorzellen (BXPC-3) die Expression des Proteins TAF15 transient blockiert. Die Herabregulierung (Protein-Knock-Down) von TAF15, dem potentiellen BARB-4 Antigen, wurde mit Anti-TAF15 Antikörper mittels Western Blot-Analyse überprüft. Hierfür wurden die transfizierten Zellen mittels Membranlysepuffer 48 h nach erfolgter Transfektion lysiert. Als Negativkontrollen wurden unbehandelte Zellen, Mocktransfektanten (Zellen mit Transfektionsreagenzien aber ohne siRNA) und Zellen, die mit unspezifischer siRNA (Kontroll-siRNA, *Silencer*<sup>®</sup> Negative Control siRNA) transfiziert waren, eingesetzt. Sie wurden ebenfalls auf die Bindung mit dem Anti-TAF15 Antikörper untersucht. Mit Hilfe der Kontroll-siRNA konnte eine unspezifische Herabregulierung des TAF15 Proteins durch das bloße Vorhandensein von siRNA ausgeschlossen werden. Durch die mocktransfizierten Zellen wurden zytotoxische Effekte überprüft, welche durch Transfektionsreagenzien hervorgerufen werden können. Bei der RNA-Interferenz-Analyse mittels Western Blot konnte im Zelllysatanalyse aus den mit siRNA gegen humanes TAF15 transfizierten Zellen (A) nur eine 68 kDa große Bande detektiert werden (siehe Abbildung 22). Im Gegensatz dazu konnte in allen Kontrollansätzen (B-D) sowohl eine Proteinbande bei 78 kDa als auch bei 68 kDa beobachtet werden. Dies lässt darauf schließen, dass ein spezifischer Protein-Knock-Down des 78 kDa TAF15 Proteins stattgefunden hat. Des Weiteren deutet die untere der beiden Banden (68 kDa) möglicherweise auf eine unspezifische Bindung des Anti-TAF15 Antikörpers bei 68 kDa hin. Trotz der durch die 78 kDa große Bande bewiesene Herabregulierung des TAF15 Proteins ist die 68 kDa Bande weiterhin im Zelllysate der mit siRNA gegen humanes TAF15 transfizierten Zellen nachweisbar. Darüber hinaus scheint bei den mocktransfizierten Zellen (C) eine geringere Proteinkonzentration im Blot vorzuliegen als bei den beiden anderen Kontrollen (B, D). Dies erklärt auch die deutlich geringere Intensität beider in diesem Ansatz vorhandenen Banden im Vergleich zu den anderen Kontrollen. Zusammenfassend konnte mit dieser Analyse eine spezifische Herabregulierung des TAF15 Proteins 48 h nach erfolgter Transfektion

durch die entsprechende siRNA im Western Blot gezeigt werden. Dieses Ergebnis bestätigt auch, dass der TAF15 Protein-Knock-Down 48 h nach der Transfektion weder durch unspezifische noch durch zytotoxische Effekte hervorgerufen wurde.



- A: TAF15 siRNA transfizierte Zellen
- B: Silencer® Negative Control siRNA transfizierte Zellen
- C: Mocktransfektanten
- D: Nicht-transfizierte Zellen

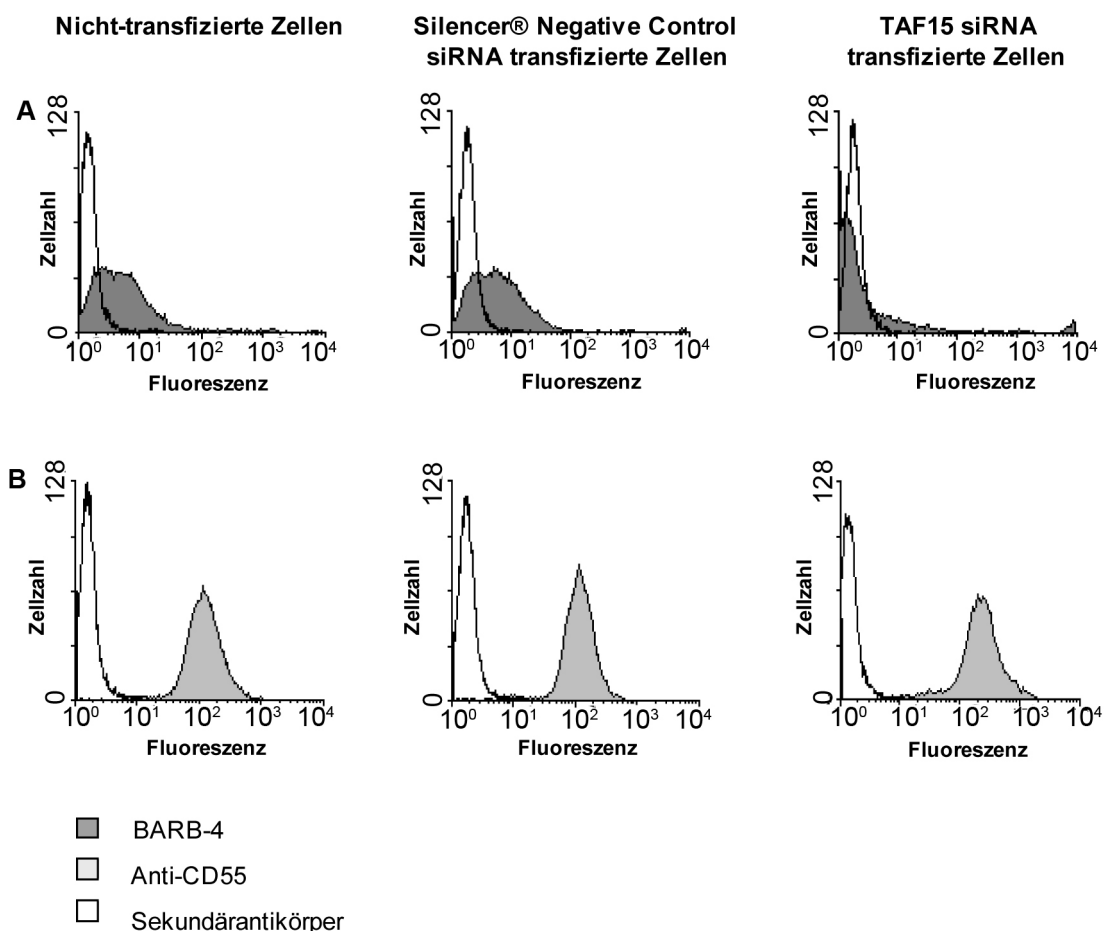
**Abbildung 22: Western Blot-Analyse des Protein-Knock-Down von TAF15.** Für die Untersuchung wurden Zelllysate aus transfizierten BxPC-3 Zellen ( $2 \times 10^5$ ) hergestellt, aufkonzentriert (100  $\mu$ l auf 10  $\mu$ l Ladepuffer (1-fach) plus 1  $\mu$ l DTT (1M)) und mit Anti-TAF15 (3  $\mu$ g/ml, AVIVA Systems Biology) Antikörper inkubiert. Für die Analyse wurde nur der lösliche Teil der Zellen, welcher die Zellproteine beinhaltet, verwendet. Der nicht lösliche Anteil wurde abzentrifugiert (13.000 x upm, 10 min).

Eine Regression des TAF15 Proteins konnte in dem Ansatz mit siRNA gegen TAF15 (A) nachgewiesen werden. Die 78 kDa Bande in den Ansätzen mit Silencer® Negative Control siRNA transfizierten Zellen (B), Mocktransfektanten (C) und nicht-transfizierten Zellen (D) bestätigten, dass die Herabregulierung von TAF15 spezifisch durch die entsprechende siRNA erfolgt. Hierbei dienen die Zellen, die mit Silencer® Negative Control siRNA transfiziert wurden, zur Kontrolle des unspezifischen Protein-Knock-Downs, während die mocktransfizierten Zellen zur Überprüfung der Zytotoxizität dienen.

Im Gegensatz zur 78 kDa Bande ist die etwa 68 schwere kDa Bande in allen vier Ansätzen vorhanden. Dies deutet auf eine unspezifische Bindung des Antikörper bei dieser Proteinbande hin. Des Weiteren ist aus dem Blot ersichtlich, dass die aufgetragene Proteinkonzentration des Zelllysats aus mocktransfizierten Zellen (C) geringer war als bei den anderen Kontrollen. Dies ist deutlich zu erkennen, da im Vergleich zu den beiden anderen Kontrollen (B und D) der Ansatz mit den mocktransfizierten Zellen schwächere Banden aufweist.

Um zu bestätigen, dass TAF15 das Antigen des BARB-4 Antikörpers ist, wurde die Bindung dieses Antikörpers ebenfalls nach erfolgtem Protein-Knock-Down untersucht. Da der BARB-4 Antikörper für die oben beschriebene Western Blot-Analyse nicht sensitiv genug war, wurde der Einfluss der TAF15 Regression auf das Bindungsverhalten des BARB-4 Antikörpers mittels FACS-Analyse und immunhistochemischer Färbung untersucht. Bei der FACS-Analyse wurde zusätzlich

Anti-CD55 Antikörper zur Kontrolle eingesetzt. Durch diesen Antikörper, der gegen den humanen Oberflächenrezeptor CD55 gerichtet ist, wurde die Unversehrtheit der Zellmembran nach der Transfektion überprüft. Das Ergebnis ist in Abbildung 23 dargestellt.



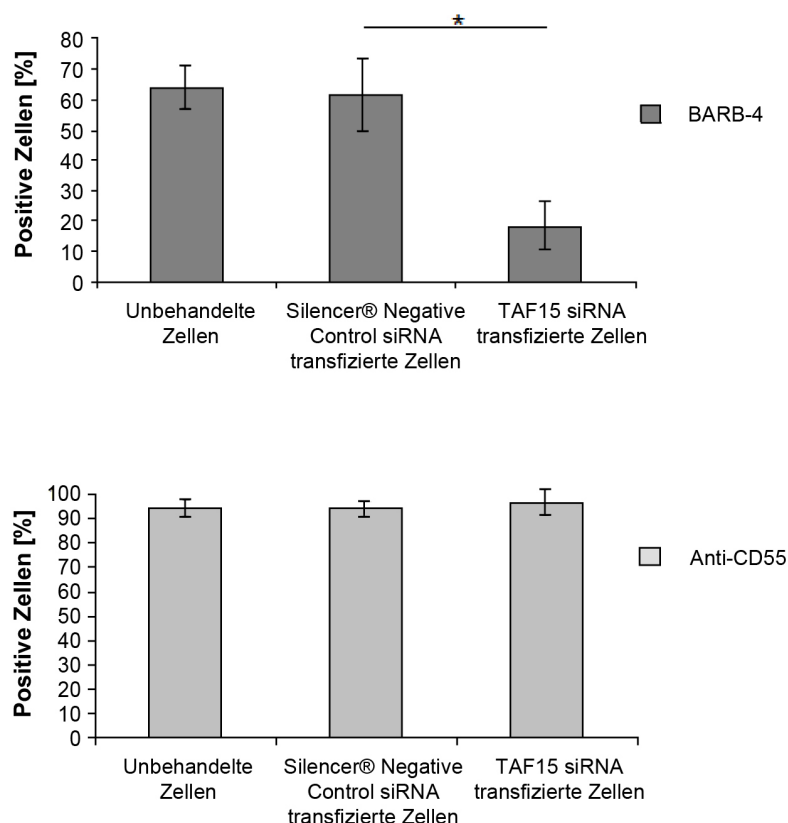
**Abbildung 23: Einfluss der Oberflächenexpression von TAF15 auf die Bindung des BARB-4 Antikörpers an Tumorzellen.** Pankreaskarzinomzellen (BXPC-3) wurden mit siRNA gegen humanes TAF15 bzw. Kontroll-siRNA (Silencer® Negative Control siRNA) transfiziert oder blieben unbehandelt (nicht-transfiziert). Mittels FACS-Analyse wurde 48 h nach der Transfektion die Bindung des BARB-4 und CD55 Antikörpers analysiert. Bei den Negativkontrollen wurden die Zellen nur mit den entsprechenden Sekundärantikörpern inkubiert.

**A:** Histogramme der FACS-Analyse mit BARB-4 Antikörper auf transfizierten Zellen. Unbehandelte Zellen und Zellen, die mit der Kontroll-siRNA transfiziert wurden, wiesen 48 h nach der Transfektion eine positive BARB-4 (300 µg/ml) Bindung auf. Hingegen konnte ein deutlicher Bindungsverlust bei den Zellen, die mit siRNA gegen TAF15 transfiziert waren, nachgewiesen werden.

**B:** Histogramme der FACS-Analyse mit Anti-CD55 Antikörper auf transfizierten Zellen. Unbehandelte Zellen und Zellen, die mit der Kontroll-siRNA oder siRNA gegen TAF15 transfiziert wurden, wiesen 48 h nach der Transfektion alle eine positive Anti-CD55 (1:1000) Bindung auf.



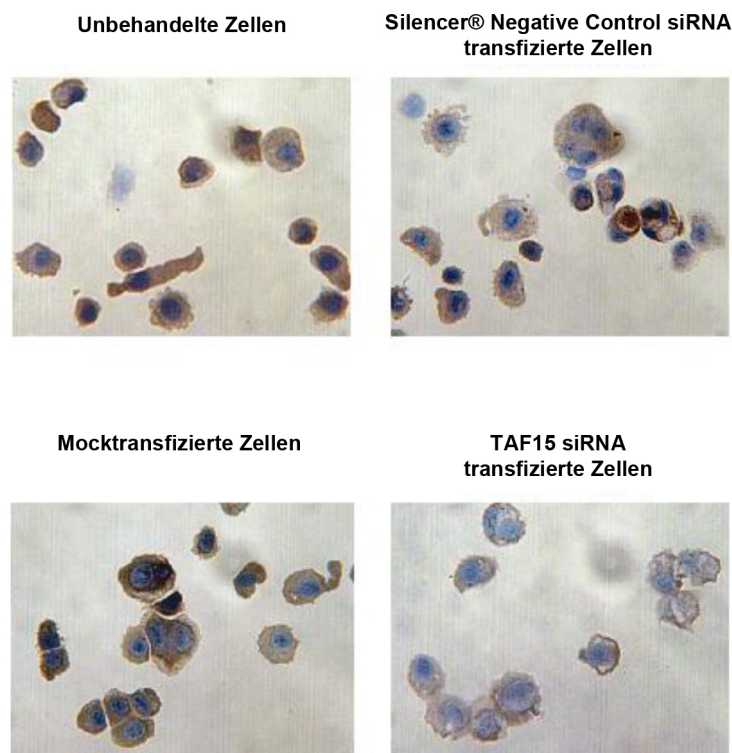
48 h nach erfolgter Transfektion konnte bei den Kontrollansätzen, die während der FACS-Analyse mit BARB-4 Antikörper inkubiert wurden, eine deutliche Verschiebung der Fluoreszenzintensität nachgewiesen werden. Diese Verschiebung basiert auf der Bindung des BARB-4 Antikörpers an sein Zielprotein auf der Zelloberfläche. Bei den mit TAF15 siRNA transfizierten Zellen war mit BARB-4 keine deutliche Verschiebung der Fluoreszenzintensität erkennbar. Dies deutet auf einen Bindungsverlust des Antikörpers hin. Bei den FACS-Analysen mit dem Anti-CD55 Antikörper konnte in keinem Ansatz eine Abnahme der Bindung ermittelt werden. Daraus lässt sich folgern, dass weitere Oberflächenstrukturen der behandelten Zellen durch den Transfektionsprozess nicht beeinträchtigt wurden. Durch die FACS-Ergebnisse konnte belegt werden, dass es sich bei TAF15 um ein Zielprotein (Antigen) des BARB-4 Antikörpers handelt. Eine laborinterne, statistische Auswertung bestätigte dabei die Signifikanz der FACS-Daten. Das Ergebnis dieser Analyse ist in Abbildung 24 dargestellt.



**Abbildung 24: Graphische Darstellung des prozentualen Anteils positiv gebundener Zellen der FACS-Analyse .** Im Gegensatz zu den Kontrollen ist ein Bindungsverlust des BARB-4 Antikörpers auf den Zellen, die mit TAF15 siRNA transfiziert wurden, deutlich zu erkennen und beträgt etwa 40% (oben). Mit dem CD55 Antikörper konnten keine nennenswerten Unterschiede zwischen den einzelnen Ansätzen detektiert werden (unten). \* $p < 0,05$

Für die Berechnung der Signifikanz wurde ein t-Test für unabhängige Stichproben verwendet. Die Analyse wurde mit der statistischen Software R durchgeführt und graphisch in EXCEL (Microsoft) dargestellt [155]. Die Berechnung für die Mittelwerte der Kontroll-siRNA und der siRNA gegen TAF15 ergab einen p-Wert von  $p < 0,05$ . Die BARB-4 Bindung wurde um etwa 40% reduziert.

Versuche mit transfizierten BxPC-3 Zellen, bei denen Zytospinpräparate immunhistochemisch gefärbt wurden, bestätigten die Ergebnisse der FACS-Analyse. In allen Kontrollen war 48 h nach der Transfektion eine deutliche Braunfärbung zu erkennen. Die mit siRNA gegen TAF15 transfizierten Zellen wiesen im Gegensatz dazu einen Intensitätsverlust dieser Braunfärbung auf. Die blasse Färbung resultiert aus dem Bindungsverlust des BARB-4 Antikörpers an sein Antigen TAF15. Die Ergebnisse der immunhistochemischen Analyse sind in Abbildung 25 dargestellt.

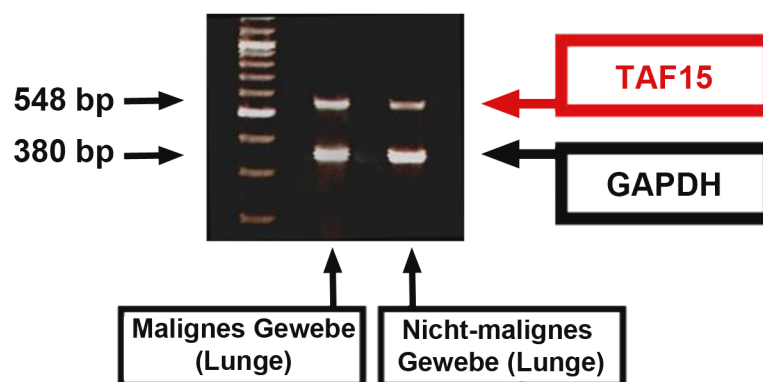


**Abbildung 25: Immunhistochemische Analyse mit BARB-4 Antikörper auf transfizierten Pankreaskarzinomzellen (BxPC-3).** Unbehandelte Zellen und Zellen, die mit der Kontroll-siRNA (Silencer® negative control siRNA) transfiziert wurden, sowie Mocktransfektanten wiesen 48 h nach der Transfektion eine positive BARB-4 (100 µg/ml) Bindung auf. Hingegen konnte ein Bindungsverlust (schwächere Färbung) bei den Zellen, die mit siRNA gegen TAF15 transfiziert waren, nachgewiesen werden.

### 3.4 Überexpression von TAF15

#### 3.4.1 Nachweis der Überexpression in Tumorgewebe auf mRNA-Ebene

Für die Analyse der TAF15 Expression auf mRNA Level wurde Gesamt-RNA aus malignem und nicht-malignem Lungengewebe isoliert, in cDNA translatiert und mit spezifischen Primern für TAF15 und GAPDH amplifiziert. Das konstitutiv exprimierte *house keeping*-Gen GAPDH wurde hierbei als interner Standard verwendet und ermöglichte somit einen semiquantitativen Vergleich der Expressionslevel von TAF15 mRNA in malignem und nicht-malignem Gewebe. Im Vergleich zu gesundem Gewebe konnte auf Tumorgewebe eine erhöhte Expression von TAF15 mRNA nachgewiesen werden. Das Ergebnis dieser Analyse ist in Abbildung 26 dargestellt.

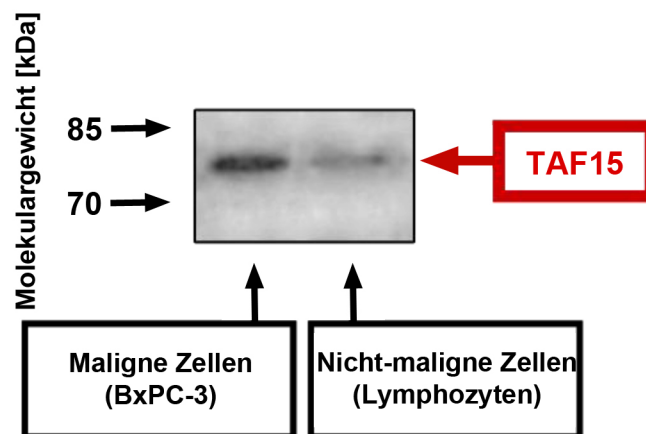


**Abbildung 26: Semiquantitative PCR.** Gesamt-RNA von malignem und nicht-malignem Lungengewebe wurde isoliert und revers transkribiert. Die Expression von GAPDH mRNA wurde als interner Mengenstandard verwendet. Als Negativkontrolle wurde eine Probe mitgeführt, die keine cDNA enthielt (nicht abgebildet). Zur Abschätzung der Fragmentgrößen wurde ein 100 bp Längenstandard verwendet. Die elektrophoretische Auftrennung erfolgte durch ein 1,5%iges Agarosegel mit anschließender Ethidiumbromid-Detektion. Dargestellt sind die Amplifikate des TAF15 (548 bp) und der internen Kontrolle GAPDH (380 bp). In malignem Gewebe ist dabei eine stärkere TAF15-Bande zu erkennen als in nicht-malignem Gewebe.

#### 3.4.2 Nachweis der Überexpression in Tumorzellen auf Proteinebene

Die Überexpression von TAF15 wurde in einem weiteren Versuch auf der Proteinebene untersucht. Die Proteinexpression von TAF15 in malignen und nicht-malignen Zellen wurde mittels Western Blot analysiert. Hierfür wurden Zelllysate aus der jeweils identischen Anzahl an BxPC-3 Zellen und frisch isolierten Lymphozyten

hergestellt, die anschließend mit Anti-TAF15 Antikörper im Blot analysiert wurden. Für die Analyse wurde mit Hilfe von Membranlysepuffer ein Gesamtzellextrakt angefertigt, welcher sowohl intrazelluläre als auch membrangebundene Proteine beinhaltet. Die malignen Zellen (BxPC-3) wiesen dabei im Vergleich zu den nicht-malignen Zellen (Lymphozyten) eine deutlich stärkere 78 kDa Bande auf (siehe Abbildung 27). Dies ist auf eine höhere Proteinexpression von TAF15 in Tumorzellen zurückzuführen.



**Abbildung 27: Western Blot-Analyse mit Anti-TAF15 Antikörper auf Zelllysaten.** Die Proteinexpression von TAF15 wurde für maligne (BxPC-3) und nicht-maligne Zellen (Lymphozyten) bestimmt. Hierfür wurden Zelllysate mit Hilfe von Membranlysepuffer aus der jeweils identischen Anzahl ( $1,2 \times 10^6$ ) an Zellen hergestellt. Nicht-lösliche Bestandteile wurden abzentrifugiert (13.000 upm, 5 min). Die Lysate wurden so aufkonzentriert, dass sie in eine Geltasche passten. Anschließend wurden sie mit Anti-TAF15 Antikörper (3  $\mu\text{g/ml}$ , AVIVA Systems Biology) im Blot analysiert. Dabei wiesen die malignen Zellen eine stärkere Bande als die nicht-malignen Zellen auf.

Eine Überexpression von TAF15 in malignem Ausgangsmaterial (Zellen bzw. Gewebe) konnte somit einerseits auf Proteinebene als andererseits auch auf mRNA-Ebene (siehe Abschnitt 3.4.1) nachgewiesen werden. Aufgrund der exklusiven Expression der im Rahmen dieser Arbeit gefundenen TAF15 Variante in Tumorzellen, wurde dieser Versuch auch zur Untersuchung einer eventuellen tumorspezifischen Modifikation herangezogen. Mit Hilfe von Western Blot-Analysen können prinzipiell bestimmte Modifikationen von Proteinen (z.B. größere Glykoside) detektiert werden. Hierfür ist jedoch ein enormer Größenunterschied zwischen der modifizierten und nicht-modifizierten Form des Proteins (mindestens im kDa Bereich) erforderlich, um einen eventuellen Unterschied in der Bandenhöhe detektieren zu können. Da in diesem Versuch jedoch sowohl die Bande des Zellextrakts aus

malignen Zellen als auch die Bande des Zellextrakts aus nicht-malignen Zellen bei 78 kDa auf exakt der gleichen Höhe liegen, können keine Rückschlüsse bezüglich einer tumorspezifischen Modifikation gezogen werden. Mit Hilfe dieser Untersuchung können zwar extrem große, tumorspezifische Modifikationen ausgeschlossen werden, jedoch konnte nicht gezeigt werden, dass eine Modifikation definitiv vorhanden oder auszuschließen ist. In den nachfolgenden Abschnitten werden daher weitere Analysen beschrieben, welche die BARB-4 bindende TAF15 Variante näher charakterisieren und auf mögliche Modifikationen untersuchen.

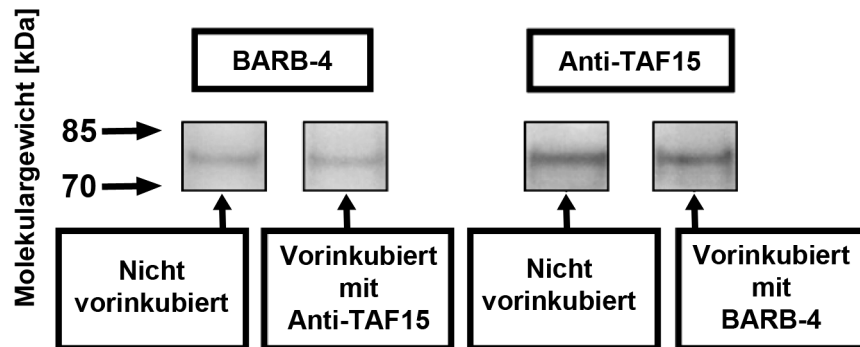
### **3.5 Vergleich des BARB-4 Antigens mit dem TAF15 Wildtyp**

TAF15 ist ein ubiquitär vorkommendes Protein, welches normalerweise aufgrund seiner Zellfunktion im Zytoplasma und Nukleus lokalisiert ist [183]. Western Blot-Analysen aus Tumorzell- und Lymphozytenlysat bestätigen, dass auch normale Zellen TAF15 Protein enthalten. Da der BARB-4 Antikörper jedoch nur das TAF15 Protein von Tumorzellen bindet, muss ein gewisser Unterschied zwischen dem TAF15 in normalen Zellen und dem auf Tumorzellen existieren. Im Verlauf dieser Arbeit wurden diesbezüglich mehrere Aspekte überprüft.

#### **3.5.1 Vergleich des BARB-4 und Anti-TAF15 Antikörperepitops**

Wie bereits durch FACS- und Western Blot-Analysen gezeigt, bindet neben dem BARB-4 auch der Anti-TAF15 Antikörper an das auf der Zellmembran von Tumorzellen exprimierte TAF15. Mit Hilfe eines Kompetitionsversuchs wurde analysiert, ob es sich bei den Epitopen der Antikörper um dieselben oder um verschiedene Bindungsstellen handelt. Hierfür wurde aufgereinigter Membranextrakt aus BxPC-3 Zellen für eine Western Blot-Analyse vorbereitet. Vor der Inkubation mit dem jeweiligen Primärantikörper wurden die einzelnen Ansätze entweder mit BARB-4 oder mit dem Anti-TAF15 Antikörper abgesättigt. Sofern beide Antikörper um die gleiche Bindungsstelle konkurrieren, sollten die Bindungsstellen schon besetzt sein. Nach dem Entwickeln der Blot-Ansätze war keine Reduktion in der Intensität

der 78 kDa Banden erkennbar (Abbildung 28). Daraus lässt sich schließen, dass durch die Vorinkubation mit dem jeweils anderen Antikörper keine Blockade der Bindungsstellen eintrat und die Antikörper an unterschiedliche Stellen des Antigens binden.



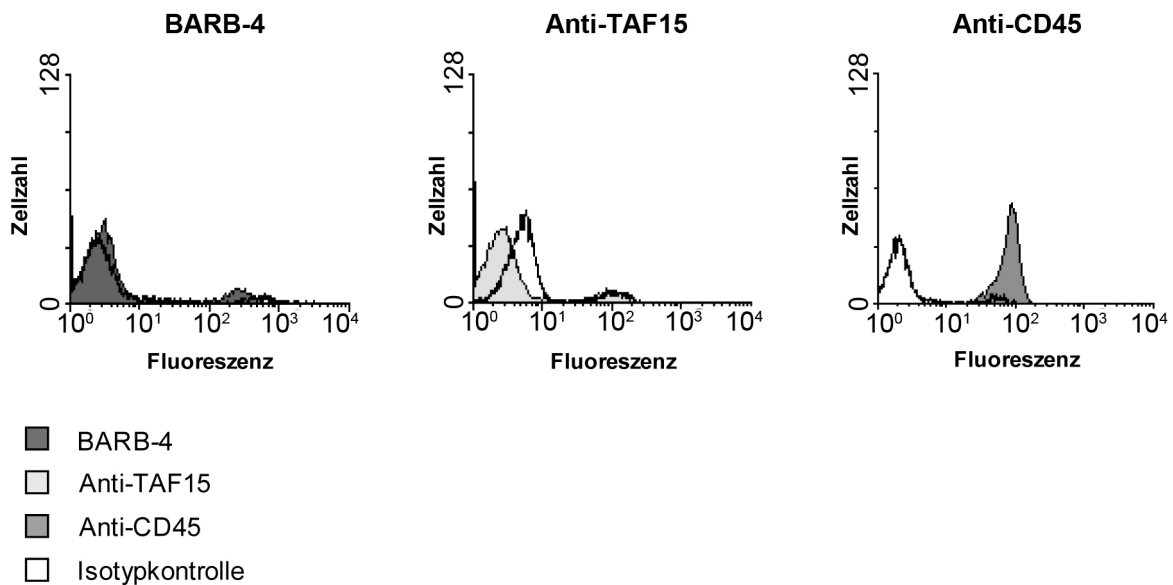
**Abbildung 28: Kompetitions-Analyse.** Western Blots mit den Antikörpern BARB-4 (300µg/ml) und Anti-TAF15 (3µg/ml, AVIVA Systems Biology) auf gereinigten Membranproteinextrakten der Zelllinie BXP-3. Durch eine Vorinkubation mit dem jeweilig anderen Antikörper konnte weder eine Hemmung der Antikörperbindung von BARB-4 noch von Anti-TAF15 detektiert werden.

### 3.5.2 Lokalisation des BARB-4 Antigens und des TAF15-Wildtyps

#### 3.5.2.1 Vergleich von FACS-Analysen auf Tumorzellen und gesunden Zellen

FACS-Analysen mit BARB-4 und Anti-TAF15 Antikörper auf Tumorzellen haben bereits gezeigt, dass das TAF15 Protein auf der Oberfläche von malignen Zellen lokalisiert ist (siehe Abschnitt 3.3.2). Um die Expression des TAF15 Proteins auf der Zellmembran von nicht-malignen Zellen zu untersuchen, wurden FACS-Analysen mit BARB-4 und Anti-TAF15 Antikörper auf gesunden Zellen (Lymphozyten) durchgeführt, die für den Versuch frisch isoliert vorlagen. Zur Kontrolle der Bindungsspezifität wurden die jeweiligen Isotypen (ChromPure IgG, Mouse IgG) eingesetzt. Als Positivkontrolle diente ein Anti-CD45 Antikörper, der gegen das auf Lymphozyten vorkommende CD45 Zelloberflächenmolekül gerichtet ist. Er wurde dabei zum Überprüfen der Unversehrtheit der Zelloberflächenproteine verwendet. Die Ergebnisse der Analyse waren bei BARB-4 und Anti-TAF15 gleich. Keiner der beiden Antikörper hatte im Vergleich mit den Isotypkontrollen auf den nicht-malignen Zellen gebunden. Dies deutet darauf hin, dass TAF15 nicht auf der Zellmembran der

gesunden Zellen vorhanden ist. Im Gegensatz dazu war eine deutliche Bindung des Anti-CD45 Antikörpers erkennbar. In Abbildung 29 ist das Ergebnis der Analyse dargestellt.



**Abbildung 29: Histogramme der FACS-Analysen mit den Antikörpern BARB-4 und Anti-TAF15 auf nicht-malignen Zellen (Lymphozyten).** Für die Zellen wurde Anti-CD45 (1:50) als Positivkontrollen verwendet. Als Negativkontrolle wurden die jeweiligen Isotypen der Primärantikörper verwendet. Sowohl BARB-4 (300 µg/ml) als auch Anti-TAF15 Antikörper (30 µg/ml, Santa Cruz Biotechnology) zeigten bezogen auf die Isotypkontrolle keine positive Bindung auf den Lymphozyten.

Das Bindungsverhalten des BARB-4 und Anti-TAF15 Antikörpers auf Tumorzellen und nicht-malignen Zellen, welches mittels FACS-Analysen nachgewiesen wurde, liefert somit einen entscheidenden Unterschied zwischen der TAF15 Lokalisation in Tumorzellen und gesunden Zellen. Das Fehlen des TAF15 Proteins auf der Zelloberfläche von normalen Zellen verhindert die Bindung durch die entsprechenden Antikörper. Die Lokalisation ist jedoch höchstwahrscheinlich nicht das ausschlaggebende Kriterium, für die Tumorspezifität. In immunhistochemischen Analysen ist es den Antikörpern theoretisch auch möglich intrazellulär zu binden. Es konnte jedoch keine Bindung des BARB-4 Antikörpers auf den untersuchten Normalgeweben nachgewiesen werden, obwohl das TAF15 Protein ubiquitär vorkommt. Dies deutet darauf hin, dass der Antikörper BARB-4 den TAF15 Wildtyp nicht erkennt und ein Unterschied zwischen dem TAF15 Wildtyp und dem TAF15<sup>BARB-4</sup> existieren muss. Eine tumorspezifische Modifikation des TAF15,

welches durch BARB-4 erkannt wird, ist deshalb sehr naheliegend. Ob das TAF15 Protein, das auf der Zellmembran von Tumorzellen exprimiert wird, eine tumorspezifische Modifikation aufweist, wurde daher in weiteren Analysen untersucht.

### **3.5.2.2 Koexpression des BARB-4 Antigens mit dem TAF15-Wildtyp**

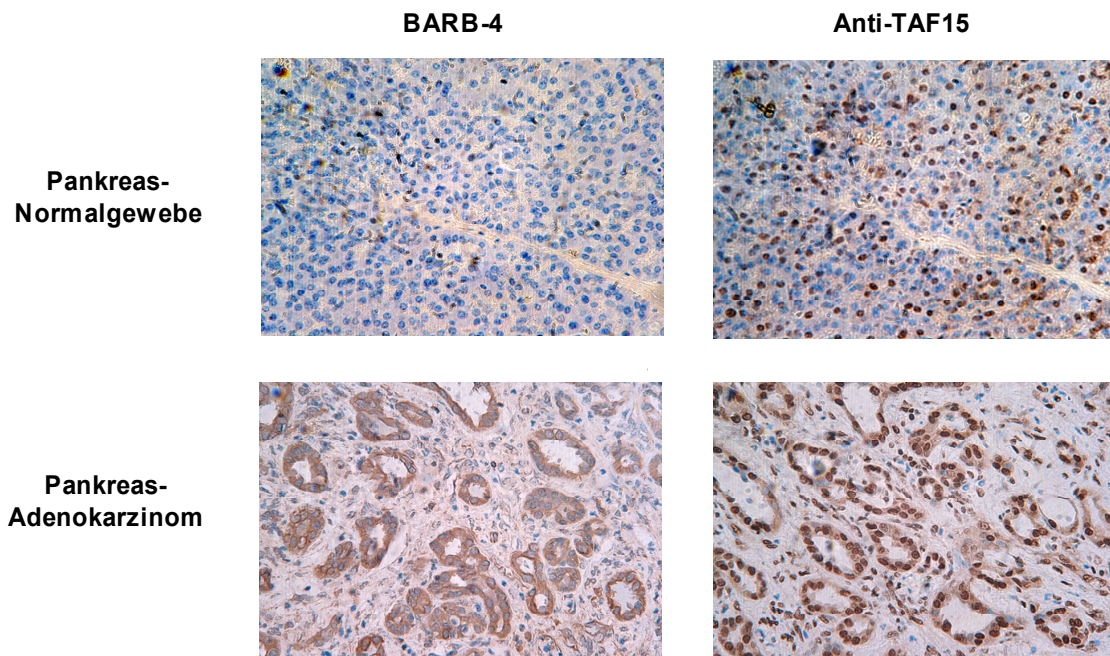
Um die Lokalisation des BARB-4 Antigens (TAF15<sup>BARB-4</sup>) und des TAF15-Wildtyps in den einzelnen Zellkompartimenten besser vergleichen zu können, wurden Paraffinschnitte von malignem und nicht-malignem Pankreasgewebe mit den entsprechenden Antikörpern immunhistochemisch gefärbt (siehe Abbildung 30). Aus der Färbung ging hervor, dass der BARB-4 Antikörper, wie bereits in Abschnitt 3.1.1 beschrieben, nicht an Normalgewebe bindet, jedoch an die Zellmembranen und im Zytoplasma des Tumorgewebes. Im Gegensatz dazu bindet der Anti-TAF15 Antikörper bei Normalgewebe in den Zellkernen sowie bei Tumorgewebe in den Zellkernen, dem Zytoplasma und auf der Membran. Dies zeigt, dass das TAF15 Protein auch im Normalgewebe vorhanden ist, jedoch in einer Form, die der BARB-4 Antikörper nicht erkennt und die, wie vorherige FACS-Analysen bestätigen, nicht auf der Zellmembran lokalisiert ist, sondern im Nukleus. Dieser TAF15-Wildtyp existiert auch in den Zellkernen von Krebszellen und belegt somit eine Koexpression des BARB-4 Antigens mit dem TAF15-Wildtyp in Krebszellen. In dem Versuch wurde außerdem gezeigt, dass der Anti-TAF15 Antikörper in der Lage ist beide Proteinvarianten zu erkennen. Da Proteine in pathologisch veränderten Zellen häufig modifiziert sind, ist dies auch für das TAF15<sup>BARB-4</sup> wahrscheinlich.

Das Vorkommen des TAF15 im Zellkern und Zytoplasma von nicht-malignen Zellen konnte bereits in der Vergangenheit beobachtet werden und ist unter anderem auf seine Funktion bei der Transkription, dem mRNA Transport und dem Spleißen zurückzuführen. Hierbei ist das Verteilungsmuster zwischen Nukleus und Zytoplasma des Proteins abhängig von der jeweiligen Zellart [183]. Die Lokalisation von tumorspezifischem TAF15 auf der Zellmembran wurde bis jetzt noch nicht beschrieben.

In einer vorherigen Western Blot-Analyse mit Zelllysaten aus malignen und nicht-malignen Zellen konnte in beiden Ansätzen eine Bande von 78 kDa nachgewiesen



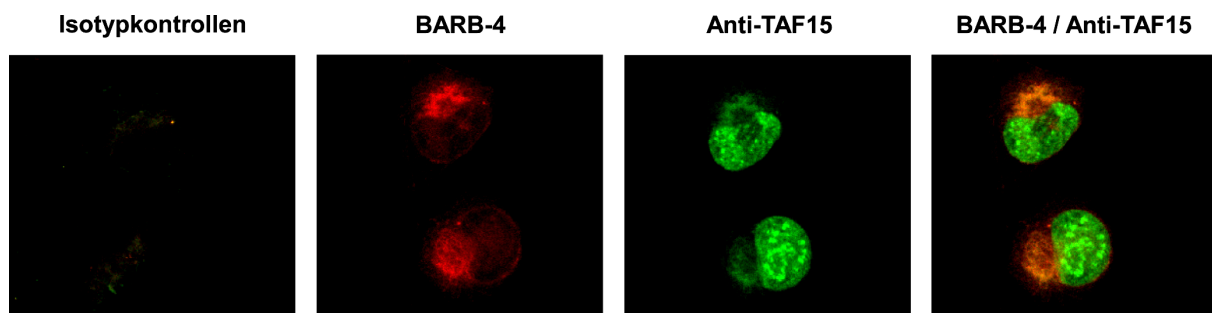
werden (siehe Abschnitt 3.4.2). Dies legt nahe, dass es sich bei der vorhandenen Modifikation um eine Veränderung handelt, die mit dieser Analysenmethode nicht detektiert werden kann.



**Abbildung 30: Immunhistochemische Analyse auf malignem und nicht-malignem Pankreasgewebe.** Für die Untersuchung wurden die Gewebe sowohl mit BARB-4 (100 µg/ml) als auch mit Anti-TAF15 (1:25; GeneTex) gefärbt. Es konnte hierbei beobachtet werden, dass Anti-TAF15 sowohl Normalgewebe als auch malignes Gewebe erkennt, während der BARB-4 nur auf malignes Gewebe bindet.

Um die Koexpression von TAF15<sup>BARB-4</sup> und dem TAF15 Wildtyp weiter zu bestätigen, wurde eine Fluoreszenzmikroskopie-Analyse durchgeführt. Hierfür wurden Pankreaskarzinomzellen (BxPC-3) simultan mit Anti-TAF15 und BARB-4 Antikörper inkubiert. Zur Detektion der Antikörperbindung wurden entsprechende, fluoreszenzgekoppelte Sekundärantikörper verwendet, welche entweder den Fluoreszenzfarbstoff Cy3 (Sekundärantikörper für BARB-4) oder FITC (Sekundärantikörper für Anti-TAF15) enthielten. Isotypkontrollen wurden verwendet, um unspezifische Bindungen auszuschließen. Das Ergebnis ist in Abbildung 31 dargestellt. An den fluoreszenzmarkierten Zellen war gut zu erkennen, dass der Anti-TAF15 Antikörper sowohl intra- als auch extranukleär bindet, während der BARB-4 nur außerhalb des Zellkerns binden konnte. Die beiden Antikörper lagen dabei

extranukleär kolokalisiert vor. Dies ist deutlich an den orangegelben Stellen zu erkennen, die durch eine Überlagerung beider Fluoreszenzen zustande kamen. Bei den Isotypkontrollen ist die Fluoreszenz deutlich schwächer. Daher ist von einer spezifischen Färbung des BARB-4 und TAF15 Antikörpers auszugehen. Die Fluoreszenzmikroskopie-Analyse bekräftigt somit das Ergebnis immunhistochemischer Untersuchungen mit BARB-4 und Anti-TAF15 auf Tumor- und Normalgewebe. Sowohl die immunhistochemischen Färbungen als auch die simultane Immunfluoreszenz-Analyse deuten dabei auf eine Koexpression von TAF15<sup>BARB-4</sup> und dem TAF15 Wildtyp in Tumorzellen hin.



**Abbildung 31: Simultane Immunfluoreszenzanalyse mit BARB-4 und Anti-TAF15 Antikörper auf permeabilisierten Pankreaskarzinomzellen (BxPC-3).** Die Zellen wurden auf Objektträgern fixiert (5% Formaldehyd) und permeabilisiert (0,1% Triton X-100 in PBS), bevor sie mit Primär- und entsprechenden fluoreszenzgekoppelten Sekundärantikörpern inkubiert wurden. Die Abbildung zeigt die Färbungen mit BARB-4 (10 µg/ml; Sekundärantikörper Cy3-gekoppelt), AntiTAF15 (3 µg/ml; Sekundärantikörper FITC-gekoppelt) sowie eine Überlagerung beider Fluoreszenzen. Als Isotypkontrollen wurden humaner ChromPure IgG sowie Rabbit IgG in den entsprechenden Konzentrationen verwendet. Es ist eine deutliche Kolokalisation von BARB-4 und TAF15 außerhalb des Nukleus zu erkennen.

### 3.5.3 Sequenzvergleich der TAF15 cDNA aus Tumorzellen mit dem Wildtyp

Um zu überprüfen, ob die Veränderung der tumorspezifischen TAF15 Variante auf der DNA-Ebene liegt, wurde eine Sequenzierung durchgeführt. Für die Sequenz-Analyse wurde Gesamt-RNA aus Pankreaskarzinomzellen (BxPC-3) isoliert, in cDNA translatiert und mit einem spezifischen Primerpaar für TAF15 komplett amplifiziert. Da für diesen Versuch eine Proofreading Taq Polymerase verwendet wurde, musste vor dem anschließenden TopoCloning ein A-Überhang am 3' Ende der DNA angebracht werden. Das TAF15 DNA-Fragment (Volllänge) wurde in einen Expressionsvektor eingeschleust. In diesem wurde es anschließend in kompetente

Escherichia coli Bakterien transformiert und vermehrt. Einzelne Bakterienkolonien wurden nachfolgend analysiert, um herauszufinden, welche Zellen ein Plasmid mit dem gewünschten Insert enthalten. Hierfür wurde der Expressionsvektor mittels peqGold Plasmid Miniprep Kit aus den Bakterienzellen isoliert und wie in Abschnitt 2.6.11 beschrieben mit dem Restriktionsenzym XbaI verdaut. Die Sequenzierung des positiven Plasmids wurde anschließend direkt durchgeführt. Die ermittelte Nukleotidsequenz für TAF15 wurde danach mit der theoretischen Sequenz des TAF15 verglichen. Hierbei wurde festgestellt, dass es sich um die Isoform 1 des TAF15 handelt. Es konnten außerdem Punktmutationen in der DNA-Sequenz festgestellt werden, die sich beim Übersetzen in die Aminosäuresequenz allerdings als stille Mutationen erwiesen und somit als mögliche Veränderungen wegfallen.

#### **3.5.4 Analyse von TAF15<sup>BARB-4</sup> auf posttranslationale Glykosilierung**

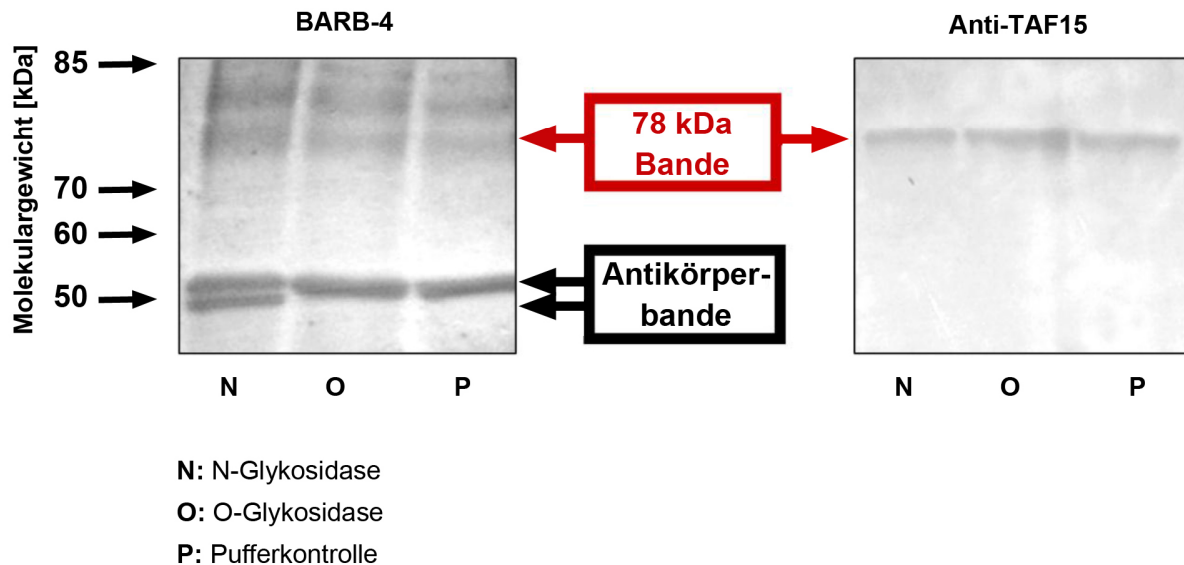
Maligne Transformationen in Zellen bewirken häufig posttranslationale Modifikationen in Form einer Veränderung des Oligosaccharidmusters spezifischer Proteine [187]. Diese sogenannten Proteinglykosylierungen können dabei in sehr vielfältigen Variationen vorliegen. Man unterscheidet zwischen O-Verknüpfungen, die meist an Threonin- oder Serinresten vorkommen, und den N-Verknüpfungen, die an Argininresten zu finden sind [139]. Innerhalb der Arbeitsgruppe konnten für die meisten Zielproteine der tumorspezifischen IgM Antikörper Zuckermodifikationen nachgewiesen werden. So bindet beispielsweise der SAM-6 Antikörper an ein O-Carbohydrat Epitop, während der SC-1 an ein N-verknüpftes Glykosid bindet [122, 138].

Das TAF15 Protein wurde daher mittels ExPASy (*Expert Protein Analysis System*), dem *proteomic server* des Schweizer Instituts für Bioinformatik (*Swiss Institute of Bioinformatics*; [www.expasy.org](http://www.expasy.org)), auf theoretisch mögliche Glykosilierungsstellen untersucht. Mit den beiden Tools NetNGlyc und NetOGlyc wurde das Protein anhand der Proteinsequenz auf theoretisch mögliche N- und O-Glykane analysiert. Hierbei ergaben sich vier mögliche Glykosilierungsstellen für N-Carbohydrate, jedoch keine für O-Carbohydrate. An Position 49 (NYSG), 155 (NYSH), 233 (NNTI) und 362 (NNPDC) der Primärstruktur des TAF15 Proteins sind N-Gykane somit theoretisch

möglich. Trotz dieser potentiell glykosylierbaren Sequenzmotive sind Proteine, die keine Signalpeptide enthalten, der N-Glykosilierungsmaschinerie ziemlich unwahrscheinlich ausgesetzt. In der Realität muss eine theoretisch mögliche Modifikation daher nicht zwangsweise vorhanden sein.

Daher wurde durch eine gezielte Abspaltung von N- und O-Glykosiden experimentell untersucht, ob der IgG Antikörper BARB-4 an ein Carbohydrat-Epitop bindet. Für die Analyse wurden, wie in Abschnitt 2.5.10 beschrieben, Western Blot-Analysen mit aufgereinigten Membranextrakten aus Pankreaskarzinomzellen (BxPC-3) angefertigt, welche anschließend mit den Antikörpern BARB-4 und Anti-TAF15 immunologisch detektiert wurden (siehe Abbildung 32). Das Antigen liegt bei dieser Analyse in seiner Primärstruktur vor und ist hierdurch für die beiden Antikörper gut zugänglich. Aus der Untersuchung war ersichtlich, dass weder die Inkubation mit N- noch mit O-Glykosidase die Bindung des BARB-4 Antikörpers beeinflusst. In beiden, enzymbehandelten Ansätzen wies die TAF15 Antigenbande (78 kDa) nach BARB-4 Inkubation die gleiche Intensität auf wie die entsprechende Bande des unbehandelten Extrakts (siehe Abbildung 32, links). Das gleiche Ergebnis ergab die Analyse mit dem Anti-TAF15 Antikörper. Auch hier waren keine Unterschiede in der Bindungsstärke des Antikörpers bei den glykosidasebehandelten Ansätzen und dem unbehandelten Extrakt zu sehen (siehe Abbildung 32, rechts). Eine weitere wichtige Entdeckung konnte durch die im BARB-4 Blot vorhandene 52 kDa Bande der schweren Kette des BARB-4 Antikörpers gemacht werden. Durch das Säulenbluten bei der Affinitätschromatographischen Aufreinigung gelangte BARB-4 Antikörper in das Eluat des gereinigten TAF15 Proteins. Die schwere Bande des Antikörpers wurde durch den im Blot verwendeten Zweitantikörper sichtbar. Ein weiterer Blot, bei dem nur Sekundärantikörper zur Detektion verwendet wurde, beweist, dass es sich bei der 52 kDa Bande eindeutig um ein Antikörperfragment handelt (nicht abgebildet). Im Ansatz mit N-Glykosidase war deutlich zu erkennen, dass diese starke Antikörperbande mit dem Enzym reagiert hatte und sich unterhalb dieser Bande noch eine weitere Bande bildete. Dies ist darauf zurückzuführen, dass IgG1 Antikörper wie BARB-4 N-Zucker enthalten [188-189]. Das Ergebnis der Western Blot-Analyse zeigt somit nicht nur, dass der BARB-4 Antikörper nicht an ein N-Glykosid oder O-Glykosid bindet, sondern auch, dass BARB-4 ein N-Carbohydrat an der schweren Kette besitzt. Eine N-glykosidische Verzuckerung des TAF15 kann mit Hilfe dieser Analyse zwar nicht gänzlich ausgeschlossen werden, jedoch belegte die

experimentelle Untersuchung, dass das Epitop des BARB-4 Antikörpers kein N-Carbohydrat ist.



**Abbildung 32: Western Blots der BARB-4 und TAF15 Antikörper auf gereinigtem Pankreaskarzinomzellextrakt (BXPC-3) nach Aufschluss mit N- und O-Glykosidase.** Als Kontrolle (Pufferkontrolle) wurde ein Ansatz ohne Enzym, aber mit Reaktionspuffer verwendet. Bei einer Ausgangskonzentration von 3 mg/ml Protein wurden 3U N- Glykosidase F (Roche Diagnostics) bzw. 1,5 mU O-Glykosidase (Roche Diagnostics) eingesetzt. Beide Antikörper binden nach der N- und O-Deglykosylierung weiterhin an das Ziel-Protein. Dies lässt darauf schließen, dass der Antikörper BARB-4 weder an ein N- noch an ein O-Carbohydrat bindet. Die etwa 52 und 48 kDa großen Banden in Western Blot-Analysen mit BARB-4 Antikörper konnten als Antikörperfragmente identifiziert werden. Dies gelang mit Hilfe eines weiteren Blots, bei dem nur Sekundäntikörper verwendet wurde (nicht abgebildet). BARB-4 gelangte durch Säulenbluten bei der affinitätschromatographischen Aufreinigung in den Membranextrakt und konnte bei der Detektion so in dem abgebildeten Blot (links) mit erfasst werden. Die 48 kDa Bande im mit N-Glykosidase behandelten BARB-4 Ansatz belegt außerdem, dass der Antikörper BARB-4 einen N-Zucker an der schweren Kette aufweist, welcher durch den Zusatz der entsprechenden Glykosidase abgespalten wurde.

### 3.5.5 Das potentielle BARB-4 Target

Das TAF15 Protein konnte, wie bereits in Abschnitt 3.3.2 beschrieben, auf der Zelloberfläche von Krebszellen mittels FACS-Analyse nachgewiesen werden. Hierfür wurde ein Antikörper verwendet, der nahe am N-Terminus bindet (Santa Cruz Biotechnology).

Bei Membranproteinen existieren unterschiedliche Verankerungsmöglichkeiten. Sie können entweder als integrales Protein in die Membran eingelagert sein, oder als peripheres Protein auf der Oberfläche aufgelagert vorkommen. Zu den integralen

Membranproteinen zählen unter anderem die Transmembranproteine, welche eine oder mehrere Transmembrandomänen enthalten und die Membranschicht durchspannen [190]. Meist befindet sich ihr N-Terminus auf der extrazellulären Seite, während der C-Terminus intrazellulär vorliegt. Der extrazelluläre Proteinteil ist dabei häufig modifiziert (z.B. Kohlenhydratrest). Periphere Membranproteine durchlaufen die Membran nicht. Sie assoziieren mit der Membranoberfläche. Hierbei sind die peripheren Membranproteine entweder indirekt über integrale Proteine oder direkt über die polaren Kopfgruppen der Membranlipide gebunden. Es befindet sich dabei sowohl der N- als auch der C-Terminus auf der extrazellulären Seite der Membran [190].

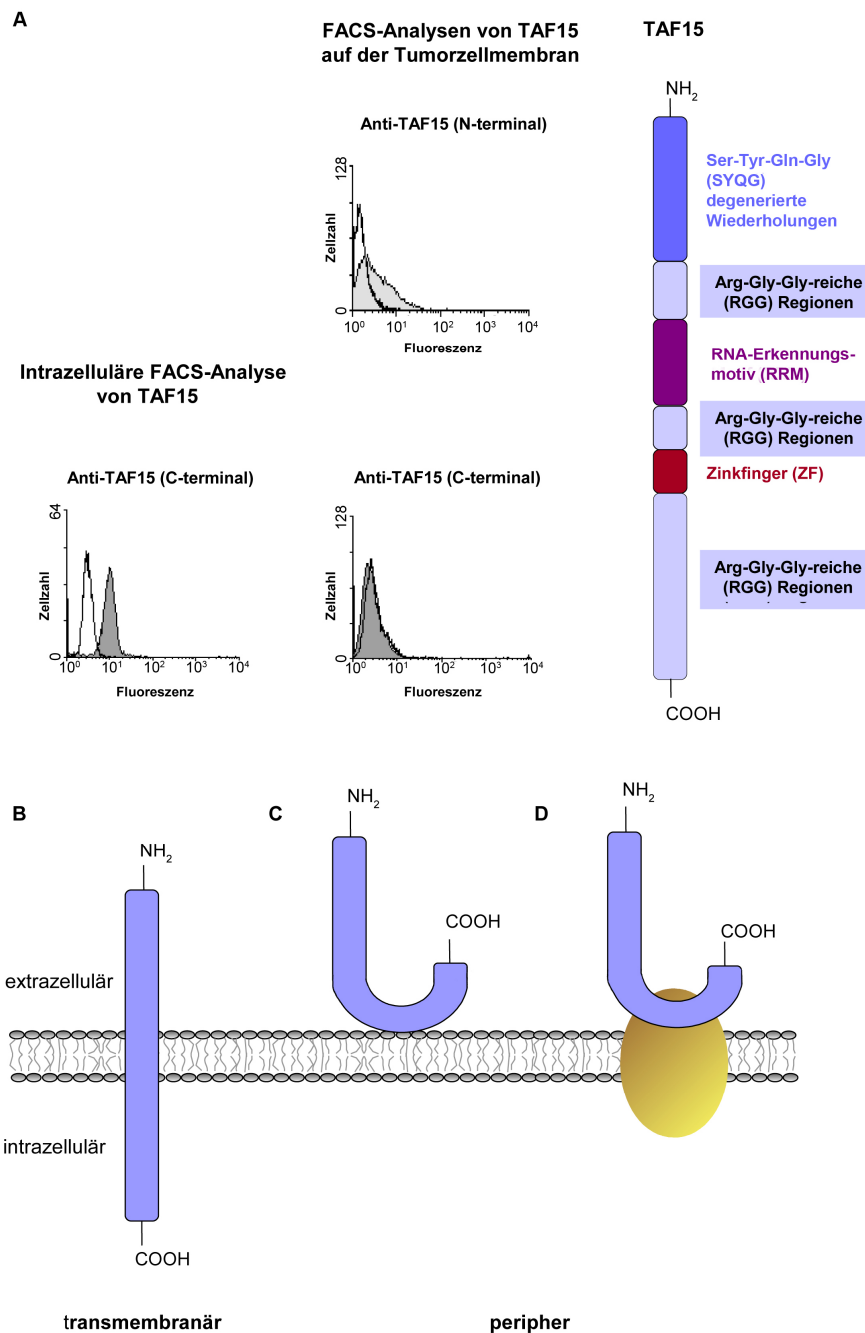
FACS-Analysen mit dem Anti-TAF15 Antikörper (Santa Cruz Biotechnology) bestätigen die extrazelluläre Lokalisation des TAF15 N-Terminus. Um die Lokalisation des C-Terminus näher bestimmen zu können, wurde ebenfalls eine FACS-Analyse mit einem Anti-TAF15 Antikörper (Bethyl Laboratories) durchgeführt, der gegen eine Peptidsequenz am C-terminalen Ende des Proteins bindet. Dieser Antikörper zeigte kein positives Bindungsverhalten auf der Zelloberfläche der Tumorzellen. Eine intrazelluläre FACS-Analyse mit permeabilisierten Tumorzellen (siehe Abschnitt 2.7.1.3) belegte jedoch, dass es dem Antikörper prinzipiell möglich ist in FACS-Analysen zu binden. Folglich liegt das negative Bindungsverhalten des Antikörpers an die Tumorzellmembran nicht an seiner fehlenden Funktionsfähigkeit in diesem Analyseverfahren. Es ist daher naheliegend, dass der C-Terminus des extrazellulär lokalisierten TAF15 Proteins für diesen Antikörper nicht zugänglich ist. Dies kann daran liegen, dass sein C-terminales Ende entweder im Zytosol (intrazellulär) liegt oder eine Bindung aus sterischen Gründen nicht zustande kommen kann. Letzteres ist z.B. dann der Fall, wenn das besagte C-terminale Ende in der Lipidschicht verankert ist und kein oder nur ein kleines Stück davon auf der extrazellulären Seite herausragt. Eine alternative Erklärung ist, dass durch eine periphere, extrazelluläre Anhaftung an die Zellmembran oder ein anderes Membranprotein der C-Terminus und somit die Antikörperbindestelle blockiert ist (siehe Abbildung 33).

Daher wurden zusätzlich zur experimentellen Analyse des BARB-4 Antigens auch theoretische Untersuchungen durchgeführt. Hierfür wurden verschiedene Software-Programme, welche auf dem Proteomic Server des Schweizer Instituts für Bioinformatik (*Swiss Institute for Bioinformatics*; [www.expasy.org](http://www.expasy.org)) zur theoretischen

Analyse von transmembranären Helices zur Verfügung stehen, für die Ermittlung eventueller transmembranärer Regionen des TAF15 Proteins verwendet. Das zur theoretischen Analyse verwendete HMMTOP (*Hidden Markov Model Topology Program*) beruht auf dem *Hidden Markov Model*, welches Vorhersagen über die Topologie transmembranärer Proteine trifft. Das Programm konnte hierbei einen extrazellulären N-Terminus und einen intrazellulären C-Terminus ermitteln, was die Annahme eines transmembranären TAF15 Proteins bekräftigt. Zusätzlich konnte im Bereich des RRM (*RNA recognition motif*) von den Aminosäuren 244 bis 260 eine potentielle transmembranäre Helix ermittelt werden.

Es existieren allerdings auch theoretische Analysenprogramme, mit denen bei TAF15 kein transmembranärer Bereich nachgewiesen werden konnte. Hierzu zählt beispielsweise TMHMM2.0 (*Tied Mixture Hidden Markov Model*) oder TMpred (*Prediction of Transmembrane Regions and Orientation*). Das TMHMM2.0 basiert ebenfalls auf dem *Hidden Markov Model*, während das TMpred Program sowohl Vorhersagen über transmembranäre Proteinregionen sowie deren Ausrichtung liefern kann. Die Berechnungen des TMpred Programms basieren dabei auf statistischen Analysen der TMbase, einer Datenbank aus natürlich vorkommenden Transmembranproteinen. Durch die unterschiedlichen Vorhersagen der einzelnen Programme liefern die theoretischen Untersuchungen daher keine weiteren Anhaltspunkte für die Anordnung des TAF15 auf der Zelloberfläche. So könnte TAF15 sowohl als transmembranäres als auch als peripheres Membranprotein vorliegen.

Die schematische Darstellung des potentiellen BARB-4 Antigens ist in Abbildung 33 zusammengefasst. Bei dieser extrazellulären Variante des TAF15 Proteins handelt es sich höchstwahrscheinlich um eine modifizierte Form des Wild-Typ Proteins. Die Expression dieser Variante ist tumorspezifisch, d. h. sie ist spezifisch auf der Oberfläche von Tumorzellen zu finden, jedoch nicht auf der Zelloberfläche von gesunden Zellen.



**Abbildung 33: Schematische Darstellung des potentiellen BARB-4 Antigens.** Für Untersuchungen zur Verankerung des TAF15 auf der Zellmembran wurden FACS-Analysen mit Anti-TAF15 Antikörpern (30 µg/ml) gegen das C- und N-terminale Ende des Proteins auf Pankreaskarzinomzellen (BxPC-3) durchgeführt (**A**). Im N-terminalen Bereich des Proteins konnte eine Bindung nachgewiesen werden. Hingegen konnte am C-terminalen Ende keine Bindung beobachtet werden (Mitte). Die Funktionsfähigkeit des Antikörpers gegen den C-Terminus wurde bei einer intrazellulären FACS-Analyse bestätigt (links). Die Ergebnisse bestätigten einen extrazellulär lokalisierten N-Terminus. Wie die Lokalisation des C-terminalen Endes genau aussieht, konnte mit Hilfe der experimentellen und theoretischen Analysen nicht eindeutig geklärt werden. Das TAF15 Protein (rechts) besteht aus einem SYQG-reichen N-Terminus, einem RNA-Erkennungsmotiv (*RNA recognition motif*, RRM), einem Zinkfinger und einer RGG-reichen Region am C-Terminus. Das TAF15<sup>BARB-4</sup> Protein auf der Oberfläche von Tumorzellen könnte sowohl als transmembranäres (**B**), als peripheres, direkt mit der Membran assoziiertes (**C**) oder als indirekt über ein Membranprotein assoziiertes (**D**) Protein vorliegen.



## 4 Diskussion

### 4.1 Der Antikörper BARB-4

#### 4.1.1 Eigenschaften und Funktionen des BARB-4 Antikörpers

Der IgG Antikörper BARB-4 wurde mittels humaner Triomatechnologie aus einem Patienten mit Magenkarzinom isoliert. Sein Bindungsverhalten wurde anschließend innerhalb dieser Arbeitsgruppe immunhistochemisch analysiert. Hierfür wurden Färbungen auf mehreren, unterschiedlichen Tumor- und Normalgeweben durchgeführt. Die Untersuchung zeigte hierbei eine tumorspezifische Reaktivität des Antikörpers. BARB-4 reagierte spezifisch mit malignem Gewebe, jedoch nicht mit gesundem Gewebe.

Der Schwerpunkt dieser Arbeit lag auf der Identifizierung und Charakterisierung des BARB-4 Antigens. FACS-Analysen bestätigten dabei die Lokalisation des BARB-4 Antigens auf der Oberfläche von Tumorzellen. Das Target wurde daher aus Tumorzellmembranextrakten mittels Affinitätschromatographie aufgereinigt und anschließend durch Western Blot-Analysen als etwa 78 kDa große Bande detektiert. Die entsprechende Proteinbande wurde anschließend aus einem Coomassie Gel ausgeschnitten und durch die Peptidmassen-Fingerprint-Methode mit MALD-MS eindeutig als humanes TAF15 identifiziert.

TAF15 wurde bisher als Protein beschrieben, welches ubiquitär in fetalen und adulten Geweben vorkommt und dabei im Nukleus und Zytoplasma lokalisiert ist [183]. Das Verteilungsmuster von TAF15 innerhalb einer Zelle ist nicht überraschend, da es in Prozesse wie die Transkription, das Spleißen oder den mRNA-Transport involviert ist, die ausschließlich in diesen Kompartimenten stattfinden [182]. Die in dieser Arbeit isolierte und identifizierte Variante des TAF15 wird jedoch auf der Oberfläche von Tumorzellen exprimiert und von dem tumorspezifischen Antikörper BARB-4 erkannt. Immunhistochemische Untersuchungen auf Tumor- und Normalgewebe mit Anti-TAF15 und BARB-4 Antikörper deuteten dabei auf eine Koexpression von TAF15<sup>BARB-4</sup> und dem TAF15 Wildtyp in Tumorzellen hin. Im Gegensatz zu TAF15<sup>BARB-4</sup> konnte der TAF15 Wildtyp auch in normalem Gewebe nachgewiesen werden.

Außerdem wurden Analysen durchgeführt, die die Oberflächenlokalisierung des TAF15 untersuchten. FACS-Analysen auf gesunden Zellen zeigten dabei keine

Expression des TAF15 Wildtyps auf der Zellmembran. Die tumorspezifische TAF15 Variante wurde im Verlauf dieser Arbeit auf Carbohydrat-Modifikationen untersucht. Im Unterschied zu vielen IgM Antikörpern besteht das BARB-4 Epitop jedoch nicht aus einem N- oder O-Carbohydrat.

Ein weiterer interessanter Aspekt des BARB-4 Antikörpers stellen seine vielfältigen Anti-Tumor-Effekte dar. Wie Untersuchungen innerhalb der Arbeitsgruppe zeigten, kann BARB-4 in Tumorzellen die Proliferation hemmen und Apoptose induzieren. Des Weiteren wurden zusätzliche Analysen durchgeführt, die den Einfluss des Antikörpers auf Eigenschaften untersuchen, die für die Tumorgenese und Metastasierung wichtig sind. Die dabei untersuchte Zellbeweglichkeit ist wichtig für die Immigration der Tumorzellen in den Blutstrom, während die Zelladhäsion benötigt wird, um in neue Gewebereiche zu invasieren [191]. In den Analysen konnte nachgewiesen werden, dass BARB-4 sowohl die Tumorzelladhäsion als auch die Tumorzellbeweglichkeit hemmt. TAF15 wurde in der Literatur bereits im Zusammenhang mit Zelladhäsion und Zellausbreitung beschrieben [183]. Das Protein wurde kolokalisiert mit den entsprechenden Adhäsions-/Ausbreitungs-Initiations-Zenter-Markern (*focal adhesion/spreading initiation center markers*) Vinculin, FAK und RACK1 in großen cytoplasmatischen Vesikeln in der Nähe der Zellmembran detektiert [183]. Unsere Ergebnisse bekräftigen somit die Annahme einer Involvierung in diese Prozesse.

Alle beschriebenen Einflüsse des BARB-4 Antikörpers auf Tumorzellen stellen direkte Effekte dar. Durch seine Tumorspezifität und seine vielseitigen, funktionellen Eigenschaften könnte der Antikörper BARB-4 daher von besonderem Interesse für die Tumorthherapie und Tumordiagnostik sein.

#### **4.1.2 Der natürliche IgG Antikörper BARB-4**

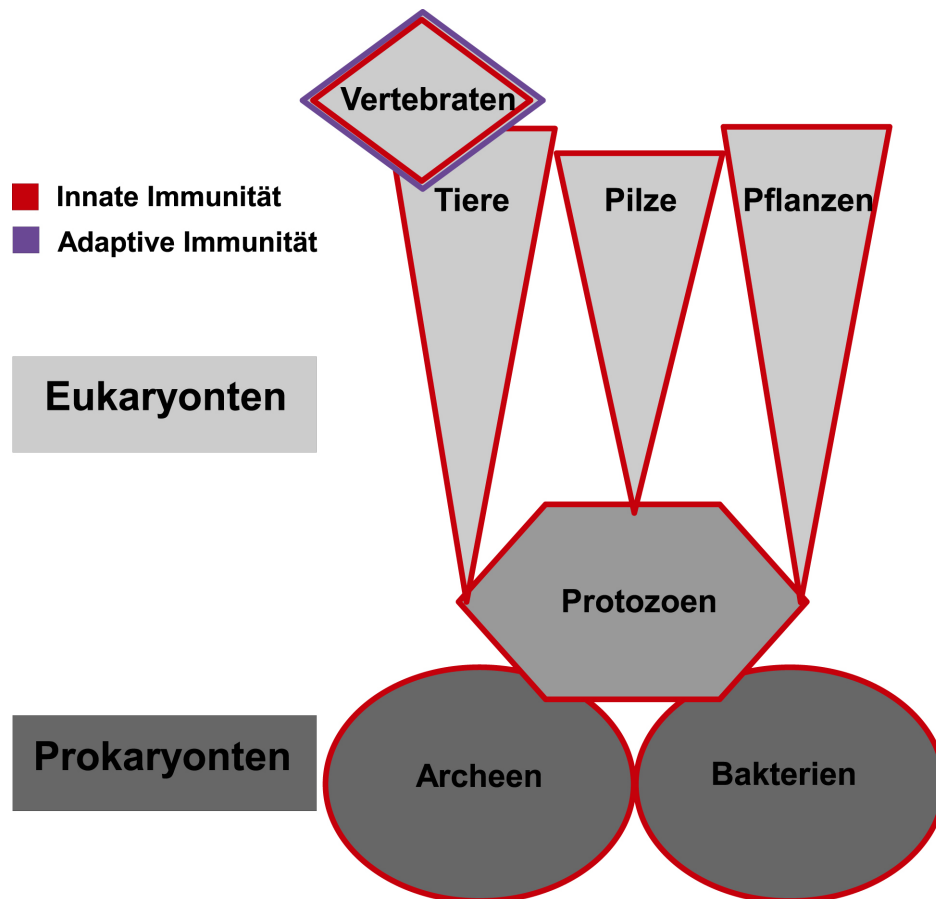
BARB-4 unterliegt als natürlicher Antikörper keiner Affinitätsreifung und wird somit der angeborenen Immunabwehr zugeordnet. Die Analyse des humanen, natürlichen, monoklonalen IgG Antikörpers ermöglicht daher neue Einblicke in die innate, körpereigene Abwehr gegen Tumorerkrankungen zu erlangen. Sein IgG Immunglobulin-Isotyp stellt mit einem Anteil von weniger als 1% eine Minderheit unter den tumorreaktiven Antikörpern dar, welche stark von den IgM Isotypen

(> 99%) dominiert werden [123]. In den letzten Jahren wurde diese große Gruppe der natürlichen, tumorspezifischen IgM Antikörper bereits genauer analysiert. Es existieren hierdurch etliche Daten, die unter anderem Aufschluss über die Spezifität, die Funktionen und die Antigene dieser Antikörper geben [41, 54, 104, 122, 127-128, 138]. Dies führte dazu, dass die Rolle der tumorspezifischen IgM Antikörper in der angeborenen Immunabwehr mittlerweile gut charakterisiert und besser verstanden werden konnte. Im Gegensatz dazu ist über die Gruppe der tumorspezifischen, natürlichen IgG Immunglobuline nur wenig bekannt. Der BARB-4 Antikörper stellt somit eine Besonderheit dar, die dazu beitragen kann, weiter wichtige Erkenntnisse bezüglich dieser kleinen Untergruppe zu erlangen.

## **4.2 Innate Immunität des Menschen**

Das menschliche Immunsystem besteht aus zwei unterschiedlichen Teilen, der angeborenen (innaten) und der erworbenen (adaptiven) Immunität. Während die adaptive Immunität ausschließlich bei komplexeren Lebewesen wie den Wirbeltieren (Vertebraten) vorkommt, ist die innate Immunität sowohl bei primitiven wie auch bei hoch entwickelten Organismen vorhanden. Ergänzend zur bereits früh vorhandenen, angeborenen Form der Immunabwehr hat sich die erworbene Immunität erst später entwickelt [38, 55].

Der in dieser Arbeit untersuchte Antikörper BARB-4 gehört, wie bereits in Abschnitt 4.1.2 erwähnt, zur innate Immunabwehr. Dieser Teil des Immunsystems wird daher in den folgenden Abschnitten näher erläutert. Abbildung 34 zeigt das Vorkommen der beiden unterschiedlichen Immunitäten in den entsprechenden Organismen.



**Abbildung 34: Schematische Darstellung des Immunsystems verschiedener Organismen.** Die Grafik wurde nach Prokaryonten (dunkelgrau) und Eukaryonten (hellgrau) unterteilt, wobei die innate Immunabwehr rot und die adaptive Immunabwehr violett dargestellt wurden.

#### 4.2.1 Bedeutung und Funktionalität der innate Immunabwehr

Früher galt die innate Immunität als unspezifisches System, welches hauptsächlich zum Verdau von Pathogenen durch phagozytierende Zellen und zur Antigenpräsentation für immunkompetente Zellen dient. Neueren Erkenntnissen nach ist diese ursprüngliche Charakterisierung jedoch unzulänglich. Untersuchungen zeigten, dass die angeborene Immunität nicht nur die initiale Immunabwehr (*first line defense*) darstellt, sondern auch an der Aktivierung der adaptiven Immunität beteiligt ist. Die angeborene Immunabwehr kann dabei spezifisch zwischen eigenen (*self*) und fremden (*non-self*) Strukturen unterscheiden [22, 25, 28, 30, 33, 48, 192-193]. Diese Fähigkeit ist vor allem auf bestimmte Oberflächenrezeptoren zurückzuführen, die im Verlauf der Evolution erhalten geblieben sind. Diese sogenannten *pattern*

*recognition receptors* (PRRs) werden meist auf der Oberfläche unterschiedlicher Effektorzellen exprimiert, welche der innate Immunabwehr angehören [30, 34, 194-196]. Sie sind besonders häufig auf antigenpräsentierende Zellen (APC), wie z.B. Makrophagen oder dendritischen Zellen zu finden [197-199]. Ihre Spezifität ist durch Keimbahngene genetisch festgelegt und kann somit weitervererbt werden. PRRs unterliegen dabei keiner Affinitätsreifung. Alle Zellen eines bestimmten Zelltyps (z.B. Makrophagen) sind in der Lage Rezeptoren zu exprimieren, welche die selben Strukturen erkennen können. Einige dieser Zellen können sogar mehrere, unterschiedliche Rezeptoren exprimieren, die gegen verschiedene Strukturen gerichtet sind [196].

PRRs wie die Toll-ähnlichen Rezeptoren (*Toll-like receptors*, TLRs), die Scavenger Rezeptoren (*scavenger receptors*, SRs), die C-Typ Lektin Rezeptoren (*C-type lectin receptors*, CLRs), die NOD-ähnlichen Rezeptoren (*NOD-like receptors*, NLRs) und die  $\beta$ 2-Integrine erkennen pathogene Strukturen über hochkonservierte, charakteristische, molekulare Merkmale (*pathogen associated molecular pattern*, PAMP) [33-34, 38, 53, 199-200]. Diese Muster sind spezifisch für bestimmte Pathogene. Sie sind essentiell für deren Überleben und kommen im Wirtsorganismus selbst nicht vor. Es handelt sich dabei nicht um Einzelstrukturen, sondern um wiederkehrende Muster, die sich im Laufe der Evolution nicht verändert haben. Zu ihnen zählen bestimmte Carbohydrat- und Lipidbestandteile, die in Bakterien (z. B. Lipopolysaccharide und Peptidoglykane) vorkommen sowie körperfremde Nukleinsäuren aus Viren [196, 201]. PRRs erkennen aber nicht nur Strukturen körperfremder Erreger, sondern können neueren Erkenntnissen zufolge auch endogene Strukturen erkennen, die von gestressten oder pathogen veränderten Zellen exprimiert werden [202-203]. Die Erkennung des Pathogens führt dabei entweder zur Induktion der zellulären Signalkaskade oder zur sofortigen Phagozytose [196]. Die Aktivität der innate Immunabwehr ist außerdem Voraussetzung für die Induktion der adaptiven Immunität [33, 48]. Eine von antigenpräsentierenden T-Zellen unabhängige Aktivierung ermöglicht der innate Immunität hierbei die schnelle Beseitigung von Pathogenen. Eindringene Mikroorganismen lösen bereits nach einigen Minuten die ersten Immunreaktionen aus. Das angeborene Immunsystem ist dabei so wirksam, dass es viele Infektionen eigenständig abwehren kann. Es stellt also weitaus mehr als nur eine initiale

Schutzreaktion dar und ist somit von großer Bedeutung für den menschlichen Körper [204-206].

#### **4.2.2 Zelluläre und humorale Komponenten der innate Immunabwehr**

Die angeborene Immunität ermöglicht die Elimination von entarteten Zellen oder Krankheitserregern im humanen Organismus unmittelbar nach erfolgtem Kontakt. Körperfremde Strukturen werden als potentiell Pathogen erkannt und mit Hilfe bestimmter Zellen unschädlich gemacht [25-30]. Zu diesen zellulären Komponenten zählen unter anderem phagozytierende Zellen wie Makrophagen, Mastzellen, Granulozyten (insbesondere Neutrophile) sowie dendritische Zellen. Letztere spielen auch eine Rolle für die erworbene Immunität. Durch die Präsentation von phagozytierten Bakterienbestandteilen auf ihrer Zelloberfläche aktivieren sie die T-Zellen und induzieren das adaptive Immunsystem. Des Weiteren sind natürliche Killerzellen (NK-Zellen) ein Bestandteil der angeborenen Immunität. Sie können mit Hilfe bestimmter Rezeptoren (FcR und MHC1-Rezeptoren) pathogene Zellen erkennen und eliminieren. Zusätzlich zum zellulären Anteil des angeborenen Immunsystems existieren humorale Komponenten, die unterstützend freigesetzt werden. Hierzu zählen unter anderem Mediatoren wie Zytokine (z.B. Interferone und Interleukine), die von bestimmten Immunzellen ausgeschüttet werden und die Aktivierung und Bereitstellung weiterer Immunzellen bewirken [31, 207]. Ein weiterer Bestandteil der humoralen, innate Immunabwehr stellt das Komplementsystem dar. Es kann durch ein Pathogen über unterschiedliche Mechanismen aktiviert werden. Hierbei kommt es zur Initiierung einer Signalkaskade, die zur Ausbildung transmembranärer Poren (sogenannten *membrane attack complexes*) und somit zur Lyse der entsprechenden Zelle führen kann. Aktivierte Komplementfaktoren oder andere humorale Faktoren, wie beispielsweise natürliche Antikörper, können auch an die Oberfläche von Fremdpartikeln binden und so deren Erkennung durch eine gezielte Markierung erleichtern. Diese sogenannte Opsonierung führt anschließend dazu, dass Phagozyten diese erkennen und eliminieren [31].

Aufgrund der Vielzahl an Krankheitserregern ist es sehr wichtig, dass der Ablauf der innate Immunabwehr schnell und effizient erfolgt. Dies wird durch die eng miteinander verflochtenen, zellulären und humoralen Faktoren gewährleistet, die in

der Lage sind effektiv zusammenzuarbeiten. So schafft es das angeborene Immunsystem innerhalb von wenigen Stunden Pathogene zu beseitigen und Infektionen zuverlässig zu bekämpfen [204-205].

### **4.3 Immunogenität transformierter Zellen**

Bei näherer Betrachtung der täglichen Anzahl an sich teilenden Körperzellen verwundert es nicht, dass bei diesem Prozess oft spontane Mutationen auftreten. Transformationen gesunder Körperzellen sind daher häufige, sogar alltägliche auftretende Ereignisse. Um diesen Mutationen entgegen zu wirken und somit sicherzustellen, dass der menschliche Organismus nicht innerhalb kürzester Zeit von entarteten Zellen und den daraus resultierenden Tumoren übermannt wird, hat sich im Laufe der Evolution ein Immunsystem entwickelt, das die Manifestierung von Tumoren verhindert [16-17]. Dieses sogenannte angeborene Immunsystem des Menschen sorgt dafür, dass Tumorzellen entweder über eine komplementaktivierte Zelltoxizität oder über verschiedene Apoptosemechanismen vernichtet werden können. Hierbei spielen natürliche Antikörper eine große Rolle. Sie zirkulieren im Blutkreislauf von Tumorpatienten und gesunden Individuen und können auftretende Zellveränderungen sofort detektieren und eliminieren [41-42, 135, 208].

Die Fähigkeit eine entartete Körperzelle immunologisch zu erkennen, ist dabei auf ihre Transformation selbst zurück zu führen. Tumorzellen weisen aufgrund ihrer genetischen Veränderungen Abweichungen von der ursprünglichen Zellregulation und den Zellfunktionen auf, die ihnen das Überleben sichern [209]. Es können hierbei jedoch nicht nur zelluläre Prozesse modifiziert werden, sondern auch das phänotypische Erscheinungsbild der Zelle. Somit können beispielsweise Proteine, die in Tumorzellen vorkommen, Modifikationen aufweisen, die in gesunden Zellen nicht vorhanden sind. Sind diese tumorspezifisch veränderten Moleküle dabei auf der Oberfläche der Tumorzelle lokalisiert, können sie von der Immunabwehr als fremd erkannt und eliminiert werden. Solche Veränderungen haben somit nicht nur Vorteile für die betroffene maligne Zelle, sondern machen diese auch angreifbar. Tumorspezifische Modifikationen die mittels natürlicher Antikörper erkannt werden, wurden bereits mehrfach in der Literatur beschrieben [40, 122, 128, 138].

Bereits 50 Jahre nach Ehrlich's Seitenketten-Theorie postulierten F.M. Burnet und L. Thomas, dass das Immunsystem maßgeblich an der Überwachung von Tumoren beteiligt ist und veränderte Zellen, die bei der Tumorgenese auftreten als fremd einstufen [44-46]. Auslöser der innate Immunabwehr sind demnach also nicht nur in den Organismus eingedrungene Fremdpartikel, sondern auch pathogen entartete Körperzellen [35, 52-53, 55, 210].

#### **4.4 Charakteristische Eigenschaften natürlicher Antikörper**

Die natürlichen Immunglobuline bestehen wie die gereiften Antikörper aus verschiedenen Subklassen, wobei die meisten der natürlichen Antikörper der Immunglobulinklasse M zugeordnet werden können [54]. Sie spielen eine wichtige Rolle bei der Bekämpfung von entarteten Zellen im menschlichen Organismus. Der entscheidende Punkt dabei ist, dass natürliche Antikörper ohne eine exogene Stimulation durch die entsprechenden Antigene im Körper präsent sind. Sie können daher also nicht nur aus Krebspatienten, sondern auch aus gesunden Probanden isoliert werden [55]. Die Antikörper werden dabei von einer kleinen Untereinheit der B-Zellen produziert, den sogenannten B1-Lymphozyten. Diese Zellen unterscheiden sich von den konventionellen B2-Lymphozyten sowohl funktionell als auch phänotypisch [52, 55, 132, 211-212].

Die Immortalisierung natürlicher B-Zellen und die Isolierung ihrer Antikörper gelang mittels humaner Hybridomatechnologie. Unter den direkt aus Menschen isolierten Immunglobulinen befinden sich tumorspezifische Antikörper, welche hauptsächlich der IgM Subklasse angehören. Viele dieser Antikörper sind in der Lage, tumorspezifische, posttranslationale Modifikationen in Form von Carbohydratstrukturen zu erkennen. Tumorzellen können auf diese Weise spezifisch erkannt und eliminiert werden [17, 47, 55, 211, 213-214]. Vereinzelt wurden auch tumorreaktive IgG und IgA Antikörper isoliert [123]. Hierzu zählt unter anderem auch der in dieser Arbeit untersuchte, monoklonale IgG Antikörper BARB-4.

Die B-Lymphozyten der innate Immunabwehr produzieren Antikörper, welche über Keimbahngene kodiert werden und im Gegensatz zu den Antikörpern des adaptiven Immunsystems keiner Affinitätsreifung unterliegen. Natürliche Antikörper weisen



hierdurch eine geringere Affinität zu ihren Epitopen auf [133, 215]. Dies ermöglicht den natürlichen Antikörpern eine poly- bzw. oligospezifische Reaktivität. Sie erkennen statt eines einzelnen spezifischen Epitops konservative Muster in Form von Carbohydraten oder Glykolipiden an unterschiedlichen Molekülen. Hierdurch wird das Spektrum an Antigenen enorm erweitert [125, 133].

Trotz der niedrigeren Affinität zu den Epitopen weisen einige tumorreaktive, natürliche Antikörper dennoch eine hohe Reaktivität auf. Bei den IgMs potenziert die pentamere Struktur die Avidität der Antikörper [216]. Auch IgGs besitzen trotz geringerer Avidität eine hinreichende Reaktivität bezüglich ihrer Epitope. Dies bestätigten zumindest Untersuchungen, die innerhalb dieser Arbeit durchgeführt wurden. Die Isolierung und Identifizierung des BARB-4 Antigens gelang mit Hilfe der Affinitätschromatographie, welche eine hohe Reaktivität des IgGs BARB-4 mit seinem Target voraussetzt [123].

## **4.5 IgG Antikörper**

Immunglobuline können strukturell in 5 Klassen unterteilt werden. Man unterscheidet zwischen den monomeren IgD, IgE und IgG, den meist dimeren IgA und pentameren IgM Antikörpern. Sie werden hierbei nach der konstanten Region ihrer schweren Kette ( $\alpha$ -,  $\delta$ -,  $\epsilon$ -,  $\gamma$ - und  $\mu$ -Kette), die für jede einzelne Klasse spezifisch ist, unterschieden. Des Weiteren kann eine nähere Einteilung anhand der leichten Kette in kappa ( $\kappa$ ) und lambda ( $\lambda$ ) erfolgen. Die IgGs stellen hierbei die größte Gruppe der im menschlichen Organismus befindlichen Immunglobulin-Isotypen dar und besitzen zusätzlich die längste Halbwertszeit im Serum. Es ist daher nicht verwunderlich, dass sie auch die am genauesten untersuchte Immunglobulinklasse darstellen [217].

### **4.5.1 Struktur und Subklassen der IgG Antikörper**

Bereits in den 60er Jahren konnte die generelle Struktur des IgG Moleküls aufgeklärt werden. Seitdem ist bekannt, dass das IgG Immunglobulin aus insgesamt vier Polypeptidketten besteht, zwei identischen schweren Ketten und zwei identischen

leichten Ketten, die über Disulfidbrücken miteinander verknüpft sind. Die leichten und schweren Ketten können hierbei in zwei Regionen unterteilt werden, eine variable Region, welche am N-Terminus der Polypeptidkette lokalisiert ist und dem konstanten Bereich, der sich am C-terminalen Ende befindet. Die konstante Region ist wie der Name bereits andeutet, nahezu unverändert in ihrer Peptidstruktur, während die variable Region zwischen den einzelnen Antikörpern stark variieren kann. Aus den variablen Regionen der leichten und schweren Ketten setzen sich die zwei antigenbindenden Stellen des Antikörpers zusammen. Die Fähigkeit der Komplementaktivierung sowie das Anhängen an phagozytierende Zellen ist dem C-Terminus der schweren Ketten zuzuschreiben [218].

Die IgG Antikörper können weiter in Subklassen untergliedert werden, wobei vier verschiedene Subtypen von IgG Immunglobulinen unterschieden werden, die eine hohe Similarität (etwa 95%) in ihrem Fc-Teil aufweisen. Trotz dieser hohen Übereinstimmung unterscheiden sie sich relativ stark in ihren Gelenkregionen. Die Struktur der Gelenkregion verleiht dabei jeder der vier Subklassen ihre Flexibilität und ihr eigenes biologisches Profil. Beim Menschen sieht die Verteilung der IgG Subklassen wie nachfolgend beschrieben aus [219].

Der IgG1 stellt mit 67% den größten Anteil an im Serum befindlichem IgG dar. Er kann die Plazentaschranke überqueren und bindet mit hoher Affinität an den Fc-Rezeptor auf Phagozyten. Der Antikörper BARB-4, welcher in dieser Arbeit beschrieben wird, ist ein Immunglobulin des Isotyps G. Er konnte durch eine Sequenzierung der im Serum dominant vorliegenden Subklasse (IgG1) zugeordnet werden. Der IgG2-Isotyp stellt mit 22% die zweitgrößte Gruppe der IgG Antikörper dar. Er kann die Plazentaschranke ebenfalls überqueren und besitzt keine Affinität zum Fc-Rezeptor auf Phagozyten. Beide Subtypen sind geringere Komplementaktivatoren als der IgG3 Subtyp, der etwa 7% der im Serum befindlichen IgGs ausmacht. IgG4 Antikörper bilden mit 4% Serumanteil mengenmäßig das Schlusslicht. Sowohl IgG3 wie auch IgG4 Isotypen sind plazentagängig. Im Gegensatz zum IgG4 weist der IgG3 jedoch die Fähigkeit zur Komplementaktivierung auf [217].

Im menschlichen Organismus existieren insgesamt drei verschiedene gamma Fc-Rezeptoren (Fc $\gamma$ R) an die die IgG Antikörper binden können. Der Fc $\gamma$ RI (CD64) ist auf der Oberfläche von Monozyten, Makrophagen, dendritischen Zellen sowie Granulozyten zu finden. Der Fc $\gamma$ RII (CD32) ist auf den meisten myeloiden und

lymphoiden Zellen lokalisiert ist. Fc $\gamma$ RII und Fc $\gamma$ RIII (CD16) kommen dabei in den zwei unterschiedlichen Isoformen alpha und beta vor. Fc $\gamma$ RIII kann von neutrophilen Granulozyten, Makrophagen und NK-Zellen exprimiert werden. IgG1 und IgG3 können an alle drei Fc $\gamma$ R binden, während IgG2 nur an den Fc $\gamma$ RII und IgG4 nur an Fc $\gamma$ RII und Fc $\gamma$ RIII binden kann. Für die Bindung des IgGs an die Rezeptoren ist die Glykosilierung der Antikörper von großer Bedeutung [217, 220-221].

Eine solche glykosidische Verknüpfung konnte auch für den in dieser Arbeit beschriebenen BARB-4 Antikörper nachgewiesen werden. Untersuchungen bestätigten dabei ein für IgG1 Immunglobuline typisches N-Carbohydrat an der schweren Kette des BARB-4 Antikörpers [188-189].

#### **4.5.2 Rolle der IgG Antikörper in der Immunabwehr**

Die einzelnen Immunglobulin-Isotypen unterscheiden sich nicht nur, wie in Abschnitt 4.5.1 bereits erwähnt, hinsichtlich ihrer Struktur, sondern auch in ihren Funktionen und ihrer Lokalisation. Der dimere IgA Antikörper ist beispielsweise in Gebieten mit Schleimhäuten sowie im Speichel, in der Tränenflüssigkeit oder der Muttermilch lokalisiert, wo er die Ansiedlung von Pathogenen verhindert [222]. Das IgD Immunglobulin fungiert hauptsächlich als ein Antigenrezeptor auf B-Lymphozyten, kann aber auch frei im Serum zirkulieren. Außerdem kann es Basophile und Mastzellen aktivieren, welche daraufhin antimikrobielle Faktoren produzieren [217, 223-224]. IgE Antikörper binden hingegen an Allergene und lösen dadurch die Histaminausschüttung von Mastzellen und Basophilen aus. Dieser Isotyp ist jedoch nicht nur in die Allergieentstehung bzw. Hypersensitivität involviert, sondern schützt auch vor Parasiten. IgG Antikörper sind hauptsächlich gegen eindringende Fremdkörper gerichtet. Sie stellen den größten Immunglobulinanteil dar, den die humorale Immunabwehr gegen invasierende Pathogene vorzuweisen hat. Des Weiteren sind sie die einzigen Antikörper, die aufgrund ihrer Plazentagängigkeit eine passive, fetale Immunität gewährleisten. Immunglobuline der Klasse M kommen sowohl auf der Oberfläche von B-Zellen als auch in ungebundener Form vor. Sie zählen zu den Antikörpern, die bei einer Immunabwehr als erstes vor Ort sind [217, 224-225]. Dies zeigt, dass sich die einzelnen

Antikörperklassen durch ihre unterschiedlichen Aufgabenbereiche und Lokalisationen ergänzen. Durch ihr synergetisches Wirkprinzip komplettieren sie die humorale Immunantwort zu einer effektiven Waffe gegen Pathogene jeglicher Art und jeglichen Ortes. Diese gängige Einteilung in unterschiedliche Antikörperklassen gibt jedoch noch keinen Aufschluss über die Affinität und die genetische Kodierung eines einzelnen Antikörper-Isotypen, welche die Zugehörigkeit zur innatem oder adaptiven Immunabwehr bestimmen. Eine Zuordnung zu einem der beiden Systeme ermöglicht jedoch die entsprechende, antikörperproduzierende B-Zelle [226-228]. Man unterscheidet hierbei zwischen den B1- und den B2-Lymphozyten [52, 55, 132, 211-212]. Die B2-Zellen produzieren Antikörper, die einer Reifung unterliegen, und hierdurch ihre hohe Affinität zu einem spezifischen Antigen erhalten. Diese Antikörper gehören zur erworbenen Immunabwehr, da sie vor der Antikörperproduktion einen Erstkontakt des Organismus mit dem Antigen benötigen [136]. Der menschliche Körper produziert sehr viele Immunglobuline der Klasse G, die zur adaptiven Immunität gezählt werden und hoch affin mit ihrem entsprechenden Antigen reagieren. Nach einer Erstinfektion mit einem Antigen werden im humanen Organismus überwiegend Plasmazellen gebildet, die antigenspezifische IgGs produzieren. Die gamma Immunglobuline sind daher von großer Bedeutung für die adaptive Immunität und stellen sehr viele hoch spezifische Vertreter zur Verfügung, die gegen eine Reihe von Krankheiten schützen. Zu ihnen zählen beispielsweise IgG Antikörper gegen Pertussis oder das Influenza-Virus [229-231]. Im Gegensatz hierzu sind die sogenannte B1-Zellen an der natürlichen Immunität beteiligt. Diese meist CD5-positiven B-Zellen können polyreaktive bzw. oligoreaktive Antikörper produzieren, die konservierte Strukturen erkennen können. Sie unterliegen im Gegensatz zu Antikörpern der adaptiven Immunität keiner weiteren Reifung [133, 215, 232]. Für ihre Produktion ist auch kein vorangegangener Kontakt mit einem spezifischen Antigen erforderlich [233]. Sie befinden sich bereits im Blutkreislauf des Menschen und können so schnell mit einer körperfremden Struktur reagieren. Meist gehören die natürlichen Antikörper zur Klasse der IgM. Somit ist es auch nicht verwunderlich, dass bei einer humoralen Immunabwehrreaktion zuerst hauptsächlich IgM Antikörper auftreten. Sie scheinen aber nicht, wie lange Zeit angenommen, die einzigen Antikörper-Isotypen zu sein, die der innatem Immunabwehr angehören. Es wurden bereits IgG- und IgA-Isotypen gefunden, die den natürlichen Antikörpern zuzuordnen sind [123, 234]. Ihre genaue Bedeutung und die Rolle, die sie hierbei

spielen, ist jedoch weitestgehend noch nicht untersucht. Es bedarf daher weiterer Analysen, um diese Minderheit unter den natürlichen Antikörpern besser charakterisieren und verstehen zu können. Die Ergebnisse dieser Arbeit sollen dazu beitragen.

### **4.5.3 Natürliche, tumorspezifische IgG und IgM Antikörper im Vergleich**

Diese Arbeit sowie Untersuchungen, die in den letzten Jahren durchgeführt wurden, zeigen, dass die B-Zellen, welche an der Tumorummunologie beteiligt sind, nicht nur, wie bisher angenommen, natürliche IgM Antikörper produzieren [41]. Es konnten zusätzlich zu den vorhandenen tumorspezifischen IgM Antikörpern auch IgG Antikörper identifiziert werden, die eine Tumorspezifität aufweisen. Für beide Antikörperklassen konnte keine Affinitätsreifung nachgewiesen werden, weshalb es sich um natürlichen Antikörper handelt [122-123, 127]. Nachfolgend werden die einzelnen Aspekte dieser beiden, innerhalb der Arbeitsgruppe gefundenen, natürlichen Immunglobulinklassen besprochen.

#### **4.5.3.1 Genetik natürlicher Antikörper**

Bei den laborintern isolierten, tumorspezifischen Antikörper handelt es sich überwiegend um IgM Antikörper, welche nicht oder gering mutiert sind. Die Sequenzierung dieser natürlichen IgM Antikörper zeigte außerdem, dass die schweren Ketten dieser Antikörper überwiegend zu den Keimbahnfamilien VH3 und VH4 gehören. Das Keimbahngene IgHV3-30 (DP-49) konnte hierbei in über 50% der untersuchten Antikörper nachgewiesen werden. Ein solch hohes Vorkommen dieser Keimbahngene existiert im herkömmlichen B-Lymphozytenrepertoire so nicht. In externen Analysen, in denen peripher im Blut zirkulierende B-Lymphozyten untersucht wurden, konnte lediglich eine Verwendung von 56% VH3- und nur 20% VH4-Keimbahngenen beobachtet werden. Außerdem besitzen nur 8,5% aller Antikörper in einer normalen B-Zellpopulation das DP-49 Gen [235].

Das Muster, welches bei den natürlichen, tumorspezifischen IgM Antikörpern gefunden wurde, scheint somit keiner zufälligen Verteilung zu unterliegen. Untersuchungen konnten bestätigen, dass einige Keimbahngene generell häufiger Verwendung finden, als es durch eine zufällige Verteilung der zur Verfügung stehenden Genen zu erwarten ist [236]. Ein häufiges Vorkommen der VH3 und VH4-Keimbahngene konnten bereits für Antikörper gegen pathogene Keime nachgewiesen werden [237-238]. Beide Keimbahnfamilien scheinen jedoch auch an Antikörpern gegen Viren beteiligt zu sein [239].

Es verwundert daher nicht, dass auch der in dieser Arbeit beschriebene, tumorspezifische IgG Antikörper BARB-4 der VH3 Familie angehört. Analog zu vielen IgM Immunglobulinen konnte auch in der schweren Kette des BARB-4 Antikörpers das Keimbahngene DP-49 (IgHV3-30\*3) nachgewiesen werden.

Auffällig ist darüber hinaus die Verwendung bestimmter Keimbahngene in der leichten Kette der natürlichen Antikörper. Bei den IgM Immunglobulinen konnte überwiegend eine leichte Kette vom Subtyp lambda detektiert werden. Eine leichte Kette von diesem Subtyp konnte innerhalb dieser Arbeit auch für den untersuchten Antikörper BARB-4 bestätigt werden. Eine Verwendung der leichten lambda-Kette liegt bei einer Betrachtung der Gesamtheit aller B-Zellen um die 40% [240-241].

Die Ergebnisse bestätigen, dass sowohl natürliche IgM als auch natürliche IgG Antikörper über ganz bestimmte Keimbahngene kodiert werden, die sowohl die schwere als auch die leichte Kette umfassen. Eine VH3-Keimbahngencodierung der schweren Kette sowie ein lambda-Isotyp der leichten Kette scheint für die natürlichen Antikörper beider Immunglobulinklassen gängig zu sein.

#### **4.5.3.2 Funktionalität natürlicher Antikörper**

Bei dem Vergleich der beiden Antikörperklassen sind vor allem funktionelle Charakteristika besonders von Interesse, da diese für einen therapeutischen Einsatz der Antikörper von Bedeutung sind. Hierzu gehören insbesondere wachstumshemmende Eigenschaften und eine antikörperabhängige Eliminierung der Zelle.

Viele der natürlichen IgM Antikörper, die innerhalb der Arbeitsgruppe untersucht wurden, sind in der Lage das Tumorzellwachstum zu hemmen bzw. tumorspezifisch Apoptose zu induzieren [41]. Hierzu zählt beispielsweise der Antikörper SC-1. Er bindet an eine Variante des DAF (*decay accelerating factor*; auch bekannt als CD55), welche spezifisch auf Magenkarzinomzellen exprimiert wird. Dem Antikörper konnte mittels funktionellem Assay (MTT) eine inhibitorische Wirkung auf das Wachstum von Magenkarzinomzellen nachgewiesen werden [138]. Weiterführende Untersuchungen zeigten außerdem, dass durch die Bindung von SC-1 an das DAF<sup>SC-1</sup> Oberflächenprotein sowohl *in vitro* als auch *in vivo* Apoptose in Magenkarzinomzellen induziert wird [135]. Hierbei wurden vor allem Analysen bezüglich der Phosphorylierung bestimmter Proteine so wie der Aktivierung bestimmter Caspasen durchgeführt, die für den Verlauf der Apoptose wichtig sind. Es wurden in diesem Zusammenhang die dephosphorylierten Proteine hnRNP A1 und hnRNP A2 (*heterogeneous nuclear ribonucleoproteins A1 and A2*) identifiziert, welche für den apoptotischen Zelltod des Antikörpers ausschlaggebend sind. Dies konnte durch eine Inhibierung der Phosphorylierung mittels Serin-/Threoninphosphatase Inhibitor bestätigt werden, die zu einer Reduktion apoptotischer Zellen führte. Es konnte des Weiteren gezeigt werden, dass der Serinkinaseinhibitor H7 einen dosisabhängige Erhöhung der SC-1 abhängigen Apoptose bewirkt [142]. Untersuchungen zeigten außerdem eine Involvierung von Caspase 8 und 3 in die SC-1 induzierte Apoptose. Die Expression sowie die Aktivität beider Caspasen waren während der Apoptose erhöht [138]. Zusätzlich konnte eine erhöhte Expression von Caspase 2 24 h nach der Induktion der Apoptose festgestellt werden [142]. Der durch SC-1 induzierte Apoptoseweg in den Magenkarzinomzellen unterscheidet sich jedoch von dem üblichen extrinsischen Weg. Es findet keine Spaltung von Poly-(ADP-Ribose)-Polymerase (PARP) und kein Flip-Flop von Annexin statt [118, 142].

Ein weiterer, interessanter Vertreter der IgM Antikörper, dem ebenfalls eine Hemmung von Tumorzellen mit Hilfe eines MTT-Tests sowie eine antikörperabhängig Apoptose nachgewiesen werden konnte, ist SAM-6. Dieser Antikörper bindet an eine modifizierte Variante des GRP78 Proteins, welche nur auf der Zelloberfläche von Tumorzellen lokalisiert ist [122]. Die SAM-6 induzierte Apoptose ist dabei höchstwahrscheinlich auf einen gestörten Lipidhaushalt der Tumorzelle zurückzuführen, der möglicherweise durch die Endozytose des SAM-6 Antikörpers

und die damit verbundene intrazelluläre Anhäufung von oxLDL zustande kommt. Die unphysiologisch hohe Konzentration von oxLDL im Zytoplasma könnte dazu beitragen, Cytochrom C freizusetzen bzw. Caspasenkaskaden auszulösen, die letztendlich zum apoptotischen Zelltod führen. Bei einer näheren Untersuchung des Apoptose-Signalwegs konnten Gemeinsamkeiten mit der klassischen intrinsischen Signalkaskade detektiert werden. In diesem Zusammenhang konnte sowohl eine erhöhte Aktivität der Initiatorcaspase 9 wie auch die vermehrte Freisetzung von Cytochrom C aus den Mitochondrien nachgewiesen werden. Erstaunlicherweise wies jedoch auch die untersuchte Caspase 8 eine erhöhte Aktivität auf, welche eine Initiatorcaspase des extrinsischen Signalwegs darstellt. Es konnte außerdem eine erhöhte Aktivität der Effektorcaspasen 6 und 3 beobachtet werden. Wie diese Analysen der einzelnen Caspasen und des Cytochrom C zeigten, verläuft die SAM-6 vermittelte Apoptose spezifisch über einen Signalweg. Die Besonderheit hierbei ist, dass, Gemeinsamkeiten mit dem klassischen intrinsischen Signalweg vorliegen, die Initiation jedoch über einen externen Liganden (SAM-6, oxLDL bzw. SAM-6/oxLDL) angeregt und auch Caspase 8 aktiviert wird [178].

Für den IgG Antikörper BARB-4 konnte mittels MTT und Cell Death Detection ELISA<sup>PLUS</sup> ebenfalls eine wachstumshemmende sowie eine apoptotische Wirkung auf Tumorzellen nachgewiesen werden. Über welchen Signalweg die Apoptose jedoch genau abläuft ist bisher noch nicht bekannt. Diesbezüglich sind weitere Analysen nötig, die in nachfolgenden Arbeiten durchgeführt werden.

Des Weiteren wurde das Antikörperverhalten der einzelnen natürlichen Immunglobulin-Isotypen nach der Bindung an die Tumorzelle untersucht. Einigen IgM Immunglobulinen ist es möglich, nach dem Binden an die Tumorzellmembran endozytiert zu werden. Eine Internalisierung konnte beispielsweise bei den beiden bereits erwähnten IgM Antikörpern SC-1 und SAM-6 beobachtet werden [118, 178]. Auch für den Antikörper BARB-4 konnte nach der Bindung an die Tumorzelle eine Endozytose nachgewiesen werden.

#### **4.5.3.3 Epitope natürlicher Antikörper**

Das menschliche Immunsystem kann nicht nur durch die Präsentation und die Erkennung von hochspezifischen Peptidstrukturen aktiviert werden, sondern auch



durch bestimmte Lipid- oder Zuckerstrukturen. Die innate Immunabwehr detektiert beispielsweise körperfremde Partikel vorwiegend über diese nicht-proteinogenen Molekülbestandteile. Untersuchungen konnten in diesem Zusammenhang zeigen, dass die natürlichen, tumorspezifischen IgM Antikörper häufig Carbohydrat-Epitope auf Oberflächenmolekülen erkennen. Der Antikörper SC-1 reagiert z.B. mit einem N-Glykosid der posttranslational modifizierten Version des CD55 Oberflächenproteins, die nur von Magenkrebszellen exprimiert wird [138]. Ähnliches konnte auch bei dem Antikörper PAM-1 beobachtet werden. Dieser bindet an eine tumorspezifische Variante des CFR-1 (*cysteine-rich fibroblast growth factor receptor 1*), welche in dieser Form exklusiv auf der Oberfläche von Tumorzellen und Präkanzerosen exprimiert wird [128]. Der Antikörper erkennt bei seinem tumorspezifischen CFR-1 Antigen auch ein N-Carbohydrat [213]. Ein weiterer IgM Antikörper, SAM-6, bindet an ein modifiziertes GRP78 Protein, welches ebenfalls nur auf der Zelloberfläche von Tumorzellen lokalisiert ist. Er erkennt dabei ein tumorspezifisches O-Glykosid bei seinem Antigen [122]. Diese drei Beispiele verdeutlichen, dass sowohl tumorspezifische N- wie auch O-Carbohydratrest als Epitop für die IgM Antikörper vorliegen können. Untersuchungen innerhalb der Arbeitsgruppe zeigten jedoch auch, dass zwar prinzipiell beide Glykosilierungen möglich sind, jedoch meist eine N-glykosidische Modifikation als Epitop vorliegt. In externen Untersuchungen wurden auch für natürliche IgG Antikörper Carbohydrat-Epitope nachgewiesen [242-244]. Innerhalb dieser Arbeit konnte eine solche N- oder O-verknüpfte Zuckerstruktur als Epitop für den IgG Antikörper BARB-4 jedoch ausgeschlossen werden. Dies deutet darauf hin, dass natürliche Immunglobuline bevorzugt an Zuckerreste binden, prinzipiell aber auch andere tumorspezifische Strukturen erkennen können.

#### **4.5.3.4 Fazit des Vergleichs**

Die Heterogenität der Immunglobulinklassen könnte an die unterschiedlichen Bedürfnisse der natürlichen Immunität angepasst sein. IgG Antikörpern spielen dabei möglicherweise eine andere Rolle bezüglich ihrer Lokalisation im Körper als IgM Antikörper. Das angeborene Immunsystem könnte die unterschiedliche Verteilung von IgG und IgM Antikörper im Menschen nutzen, um seine Effektivität zu erhöhen.

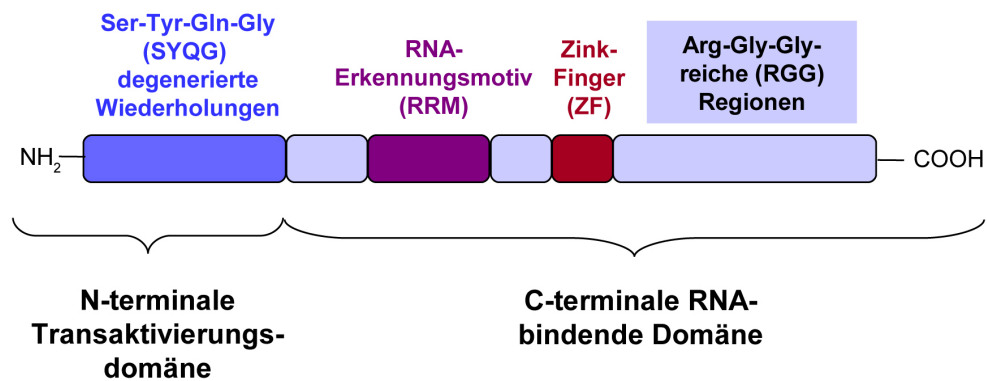
Je besser die Verteilung der natürlichen Antikörper in den einzelnen Körperkompartimenten ist, desto schneller können körperfremde Strukturen unschädlich gemacht und eliminiert werden. IgG Antikörper haben hierbei den Vorteil, Gewebe gut zu penetrieren und somit Schranken zu passieren, die für andere Antikörperklassen unüberwindbar sind [217]. Der Vergleich konnte auch zeigen, dass IgG Antikörper und IgM Immunglobulinen bezüglich ihren kodierenden Keimbahngenen sowie funktionellen Eigenschaften Ähnlichkeiten aufweisen. Um jedoch genauere Aussagen machen zu können, sind Untersuchungen weiterer natürlicher IgG Antikörper notwendig. Bezüglich der ermittelten Epitope von IgM und IgG Antikörpern können keine konkreten Schlüsse gezogen werden. Sowohl IgM wie auch IgG Antikörper können generell Carbohydrat-Epitope erkennen [122, 138, 242-244]. Ob die Gewichtung bei beiden Immunglobulinklassen zwischen Zucker-Epitopen und anderen Antikörperbindestellen ähnlich ist, konnte hier nicht geklärt werden, da der BARB-4 wie einige wenige IgM Antikörper nicht an ein solches Epitop bindet. Zukünftige Untersuchungen von natürlichen IgG Immunglobulinen sind für weitere Vergleiche unbedingt erforderlich, und können dazu beitragen, einen besseren Überblick über diese Gruppe von Antikörpern zu gewinnen.

## **4.6 TAF15**

### **4.6.1 Strukturelle Eigenschaften des TAF15 Wildtyps**

TAF15 (*TATA-binding protein-associated factor 15*) ist auch bekannt unter den Bezeichnungen TAF(II)68, TAF2N oder RBP56 (*RNA binding protein 56*) und gehört aufgrund seiner Struktur und seiner Funktionalität zur TET (TLS-EWS-TAF15) Proteinfamilie. Diese multifunktionale Familie besteht aus den drei humanen Proteinen EWS (*Ewing's sarcoma*), TLS (*translocated in liposarcoma*; auch bekannt als FUS (*fusion*)) und TAF15 sowie dem engverwandten Drosophila Protein Cabeza, welches auch unter dem Namen *sarcoma-associated RNA-binding fly homolog* (SARFH) bekannt ist. Alle vier Mitglieder sind RNA-bindende Proteine (*RNA-binding proteins*) zwischen denen eine hohe strukturelle und funktionelle Ähnlichkeit besteht [182, 245-247]. Wie die anderen humanen Mitglieder der TET Familie besteht TAF15 aus einem Serin-, Glycin-, Glutamin- und Tyrosin-reichen N-Terminus, einer RNA

bindenden Domäne, einem Cys2/Cys2-Zinkfinger und einer Arginin-, Glycin-, Glycin-reichen Region am C-Terminus [248]. Abbildung 35 zeigt die schematische Darstellung des TAF15 Proteins mit seinen zwei Hauptdomänen, der N-terminalen Transaktivierungsdomäne und der C-terminalen RNA-bindenden Domäne [249].



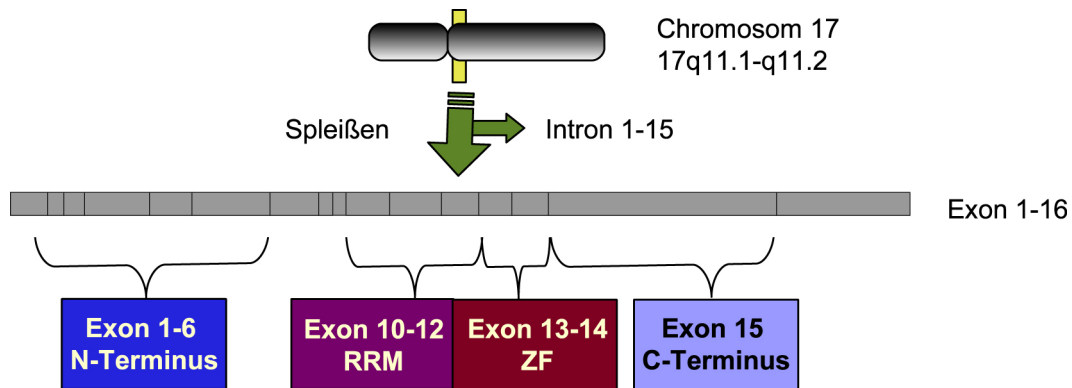
**Abbildung 35: Schematische Darstellung des TAF15 Proteins.** Modifiziert nach [249]. Das TAF15 Protein besteht aus einer N-terminalen Transaktivierungsdomäne und einer C-terminalen RNA-bindenden Domäne. Das RNA-Erkennungsmotiv (*RNA recognition motif*, RRM) ist in der Abbildung violett, der Cys2/Cys2-Zinkfinger ist rot und die Serin-, Glycin-, Gutamin- und Tyrosin-reiche Region am N-Terminus ist blau dargestellt. Die Arginin-Glycin-Glycin-reichen Regionen, die zwischen den anderen Regionen sowie am C-Terminus liegen, sind in hellblau dargestellt.

Hierbei kann mit Hilfe der N-terminalen Domäne die Transkription aktiviert werden, während die C-terminale Domäne nicht nur für die Bindung von RNA, sondern auch für die Bindung einzelsträngiger (*single stranded*; ss) DNA dient [245].

Das TAF15 Protein enthält dabei mehrere Stellen, an denen posttranslationale Modifikationen wie Phosphorylierung und Methylierung möglich sind. Diese Modifikationen können hierbei sowohl einen Einfluss auf die zellulären Funktionen ausüben als auch die subzelluläre Lokalisation beeinflussen [250-251].

Aufgrund der konservierten Struktur der TET Proteine wird sogar vermutet, dass sie vom gleichen Ursprunggen abstammen. Bei den humanen Mitgliedern der TET Familie äußert sich die genetische Ähnlichkeit besonders hinsichtlich der Anzahl und der Lokalisation ihrer Exons. Die in den zentralen Abschnitten der drei Gene befindlichen Exons kodieren eine homologe RNA-bindende Domäne und ein hochgradig konserviertes Zinkfinger-Motiv. Das TAF15 Gen ist auf dem Chromosom 17q11.1- q11.2 lokalisiert und umfasst 37 kb. Es besteht aus 16 Exons (zwischen 33 und 562 bp lang) und 15 Introns (zwischen 83 bp und 10 kb lang). Die längste Exon-

Sequenz stellt das Exon 15 dar. Es kodiert den C-Terminus, der 19 degenerierte DR(S) GG(G) YGG Wiederholungen enthält [248]. Eine schematische Darstellung des TAF15 auf mRNA-Ebene (Exon 1-16) zeigt Abbildung 36.



**Abbildung 36: Struktur des TAF15 auf mRNA-Ebene.** Das TAF15 Gen ist auf dem Chromosom 17 lokalisiert. Es befindet sich in dem Abschnitt 17q11.1-q11.2 (gelb markiert). Es besteht aus 16 Exons und 15 Introns. Die längste Exon-Sequenz bildet das Exon 15, welches den C-Terminus kodiert [248]. Nach dem Herausschneiden der 15 Introns beim Spleißen liegt TAF15 auf der mRNA-Ebene als etwa 2,2 kb großes Konstrukt vor (laut NCBI-Datenbank). Die Exons in denen die zu kodierenden Bereiche des Proteins liegen, sind farbig markiert. Die N-terminale Serin-, Glycin-, Gutamin- und Tyrosin-reiche Region innerhalb der Exons 1-6 ist dunkelblau dargestellt. Das RNA-Erkennungsmotiv (*RNA recognition motif*, RRM, innerhalb der Exons 10-12) ist violett, der Zinkfinger (ZF, innerhalb der Exons 13 und 14) ist rot markiert. Die Arginin-Glycin-Glycin-reiche Region am C-Terminus innerhalb des Exons 15 in hellblau dargestellt [185].

#### 4.6.2 Funktionelle Eigenschaften des TAF15 Wildtyps

TAF15 ist ein multifunktionales Protein, welches bei mehreren, zellulären Prozessen eine Rolle wichtige spielt. Neben seiner Funktion beim Spleißen und dem mRNA-Transport fungiert der TAF15-Wildtyp, wie auch die anderen humanen TET Proteine, als klassischer Transkriptionsfaktor [183]. Hierfür assoziiert es mit Komponenten der Transkriptionsmaschinerie. TAF15 ist ein RNA und ssDNA (*single strand DNA*, einzelsträngiger DNA) bindendes Protein, welches sowohl mit der RNA-Polymerase II als auch mit dem Transkriptionsfaktor IID (TFIID), einem Multiproteinkomplex aus TATA-bindendem Protein (*TATA-binding protein* (TBP)) und TBP-assoziierten Faktoren (TAF(II)s), interagieren kann [245]. TAF15 ist dabei direkt mit den Untereinheiten Rbp3, Rbp5 und Rbp7 der RNA-Polymerase II assoziiert [250]. Die Expression seiner Zielgene kann dabei über die Methylierung reguliert

werden. Die drei TAF15 Zielgene POLR3B, ID1 und CDK6 weisen beispielsweise durch Inhibierung der Methylierung des TAF15 eine geringere Expression auf. Die Methylierung sowie das dafür verantwortliche Enzym Protein-Arginin-N-Methyltransferase 1 (PRMT1) üben somit einen direkten Einfluss auf die Genexpression der TAF15 Zielgene aus [252]. Ein weiteres regulatorisches Enzym, das sich auf die Transkription von TAF15 auswirkt, ist die Thyrosinkinase v-Src. Sie bewirkt eine Phosphorylierung am N-Terminus von TAF15 und erhöht dessen Transaktivierungsaktivität und somit auch die Transkriptionsaktivität [253]. Die Expression der TAF15 Gene ist so durch unterschiedliche posttranslationale Modifikationen regulierbar.

TAF15 erfüllt jedoch nicht nur eine wichtige Aufgabe bei der Transkription, sondern ist auch, wie oben erwähnt, beim Spleißen und dem mRNA-Transport involviert. Es ist bekannt, dass TAF15 mit der humanen U1 snRNA (*small nuclear RNA*) spezifisch assoziieren kann, welcher eine äußerst wichtige Funktion beim Erkennen und Entfernen von Prä-mRNA-Introns zugeordnet wird. Diese liegt normalerweise zusammen mit sieben Sm Proteinen (B, D1, D2, D3, E, F und G) und drei U1-spezifischen RNP-Proteinen (U1-70K, U1-A und U1-C) in den spleißosomalen U1-Sm snRNP (*small nuclear ribonucleoprotein particle*) vor [254]. Ein Teil dieses Komplexes ist dabei am mRNA-Transport beteiligt. Die Überexpression des Proteins U1-70K bewirkt beispielsweise eine Inhibierung des nukleozytoplasmatischen mRNA-Transports [255].

#### **4.6.3 Lokalisation des TAF15 Wildtyps**

TAF15 kommt in fetalem und adultem, humanem Gewebe ubiquitär vor. Es gibt nur wenige Zellen, in denen TAF15 bisher nicht nachgewiesen werden konnte (z.B. Melanozyten und Herzmuskelzellen) [183]. Dabei ist es in zahlreichen Zellen sowohl im Nukleus wie auch im Cytoplasma lokalisiert. Die Lokalisation des TAF15 in den entsprechenden Kompartimenten ist zelltypspezifisch. Interessanterweise weist es ein ähnliches Expressionsmuster wie TLS/FUS auf. Im Gegensatz hierzu konnte EWS, das dritte Mitglied der humanen TET-Proteinfamilie, hauptsächlich im Kern detektiert werden [183]. Aufgrund der vielfältigen, zellulären Funktionen der TET-Familie, wie beispielsweise bei der Transkription, dem Spleißen oder dem mRNA-

Transport, ist die Lokalisation der Proteine im Nukleus und Cytoplasma plausibel. Den Proteinen ist es dabei sogar möglich, zwischen den einzelnen Kompartimenten zu shuttle[n] [252, 256-257]. Hierbei konnte beobachtet werden, dass die Methylierung einen Einfluss auf die subzelluläre Lokalisation hat [252, 258]. Die Arginin-Methylierung, die für das Shuttle[n] des TAF15 verantwortlich gemacht wird, ist eine posttranslationale Modifikation die durch die Protein-Arginin-N-Methyltransferase 1 (PRMT-1) katalysiert wird und AdoMet (S-Adenosylmethionin) als Methylgruppendonator benötigt [252, 259]. Aktuellere Untersuchungen zeigten, dass bei TAF15 der RGG-reiche C-Terminus, welcher mehrere Methylierungsstellen aufweist, für das Shuttle[n] verantwortlich ist. Durch die Inhibierung der TAF15-Methylierung konnte eine vermehrte Akkumulation im Zytoplasma detektiert werden. Es wird daher angenommen, dass die Methylgruppen für die Wiederaufnahmen des TAF15 in den Zellkern von Bedeutung sind [252].

#### **4.6.4 Translokation von TAF15 auf die Zelloberfläche**

Die Lokalisation von TAF15 in Tumorzellen beschränkt sich nicht nur, wie in der Literatur für eine Vielzahl von Zellen beschrieben, auf den Zellkern und das Zytoplasma [183]. Eine tumorspezifische Variante des Proteins, welches von dem Antikörper BARB-4 erkannt wird, konnte mittels FACS-Analysen auf der Zelloberfläche diverser maligner Zellen nachgewiesen werden. Über welchen Mechanismus es auf die Zellmembran gelangt, ist bisher allerdings nicht geklärt.

Möglicherweise ist diese Translokation durch eine Modifikation des Moleküls in Tumorzellen bedingt. Das eng verwandte EWS Protein, welches ebenfalls zur TET-Familie gehört, konnte auch schon auf der Zelloberfläche detektiert werden. Bei einer näheren Analyse stellte sich dabei heraus, dass es in einer extensiv argininmethylierten Form auf der Zellmembran vorliegt. Diese Modifikation wirkt sich dabei auf die physikochemischen Eigenschaften aus. Im EWS Molekül kommt es zu einer erhöhten Hydrophobizität sowie zur verminderten Ausbildung von Wasserstoffbrücken und ionischen Wechselwirkungen. Diese Eigenschaften können für das Passieren oder das Einbetten in Membranen förderlich sein und liefern somit eine mögliche Erklärung für die Oberflächenlokalisation [257].

Interessanterweise scheinen die veränderten Eigenschaften von malignen Zellen Einfluss auf die Lokalisation des EWS auf der Zelloberfläche zu haben. Die Proteinexpression des EWS auf der Zellmembran von Tumorzellen ist um ein Vielfaches höher als auf den getesteten, normalen Zellen [260]. Das TAF15 Protein konnte im Rahmen dieser Arbeit hingegen nur auf malignen Zellen extrazellulär nachgewiesen werden. Analog zu EWS könnte jedoch auch hier die Methylierung eine entscheidende Rolle spielen. Unterschiede in der TAF15 Methylierung bei malignen und nicht-malignen Zellen könnten hierbei ausschlaggebend sein. In diesem Zusammenhang zeigen weitere Untersuchungen, dass das Enzym MAT (Methioninadenosyltransferase) welches AdoMet (S-Adenosylmethionin; Substrat bei der enzymatischen Methylierung) synthetisiert, in einer abgewandelten Form in Tumoren existiert [261]. Zusätzlich wurde eine erhöhte Aktivität des MAT Enzyms in transformierten Zellen gefunden, was diese Annahme ebenfalls stützt [258].

Ein ähnliches Verhalten wie EWS, konnte auch bei Nucleolin, einem anderen RNA-bindenden Protein, festgestellt werden. Nucleolin shuttelt genau wie EWS und TAF15 zwischen Nukleus und Cytoplasma und konnte auch auf der Zellmembran nachgewiesen werden. Die C-terminale Domäne von Nucleolin ist wie bei den TET-Proteinen ebenfalls Glycin-reich und kann methyliert werden [260].

Wie das TAF15 Protein auf der Zellmembran vorliegt, ist nicht genau geklärt. Die durch die eventuell vorhandenen Methylgruppen hervorgerufenen hydrophoben Eigenschaften des Proteins würden jedoch eine Einbettung in die Membran nahe legen. Es wurden daher FACS-Analysen mit unterschiedlichen Anti-TAF15 Antikörpern durchgeführt, um diese Annahme zu bekräftigen. Ein extrazellulär lokalisiertes N-terminales Ende konnte dabei mittels Anti-TAF15 Antikörper gegen eine nahe am N-Terminus gelegene Peptidstruktur belegt werden. Ein gegen den C-Terminus gerichteter TAF15 Antikörper konnte hingegen keine Bindung im FACS nachweisen. Eine Einlagerung in die Membran als transmembranäres Protein wäre für TAF15 daher denkbar. Die Bindung am C-Terminus könnte allerdings auch aus sterischen Gründen verhindert werden. Daher wurden in dieser Arbeit zusätzlich theoretische Analysen auf mögliche transmembranäre Helices durchgeführt. Eine dieser Analysen offerierte eine potentielle transmembranäre Verankerung des TAF15 Proteins mit einem Transmembranbereich innerhalb des RRM (*RNA recognition motif*) zwischen Aminosäure 244 und 260, einem extrazellulären N-Terminus und einem intrazellulären C-Terminus. Bei zwei anderen theoretischen

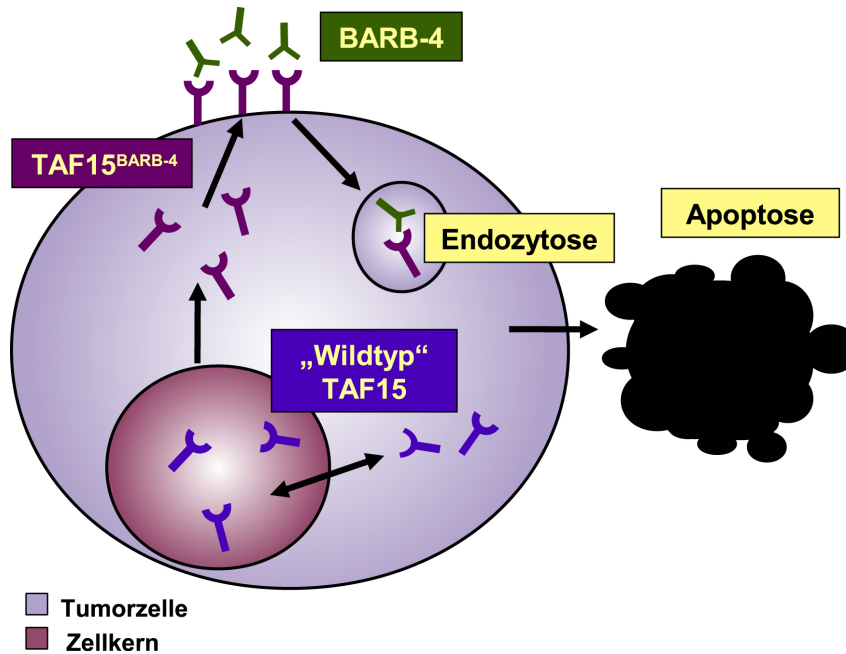
Untersuchungen konnte hingegen kein transmembranärer Bereich innerhalb des TAF15 Protein festgestellt werden. Durch die unterschiedlichen Aussagen der einzelnen Analysenprogramme liefern die theoretischen Untersuchungen keine weiteren Anhaltspunkte für die Anordnung des TAF15 auf der Zelloberfläche. TAF15 könnte daher, wie angenommen, als transmembranäres Membranprotein vorkommen. Es ist jedoch nicht auszuschließen, dass es auch als peripheres Membranprotein vorliegen könnte.

#### **4.6.5 Lokalisation von TAF15 in Tumorzellen**

In dieser Arbeit wurden mit Hilfe des Antikörpers BARB-4 eine tumorspezifische TAF15 Variante entdeckt. In immunhistochemischen Färbungen mit BARB-4 konnte die Lokalisation des Antigens auf der Tumorzellmembran und im Zytoplasma von Tumorzellen detektiert werden. Die Oberflächenlokalisierung auf Tumorzellen wurde dabei mittels FACS-Analysen bestätigt. Immunfluoreszenzanalysen zeigten, dass BARB-4 nach dem Binden an sein Antigen auf der Tumorzelle in die Zelle internalisiert wird. Der Antikörper inhibiert dabei die Zelladhäsion und die Zellmotilität in den analysierten Tumorzellen. BARB-4 ist außerdem in der Lage Apoptose in den untersuchten Tumorzellen zu induzieren.

Im Gegensatz dazu wurde der TAF15 Wildtyp nur im Cytoplasma und Nukleus detektiert [183]. Abbildung 37 zeigt die Lokalisation des BARB-4 Antigens (TAF15<sup>BARB-4</sup>) und des TAF15 Wildtyps in einer schematisch, dargestellten Tumorzelle.





**Abbildung 37: Schematische Darstellung einer Tumorzelle mit TAF15<sup>BARB-4</sup> und TAF15 Wildtyp.** TAF15<sup>BARB-4</sup> ist auf der Zelloberfläche sowie im Zytoplasma lokalisiert. Nach dem Binden des Antikörpers BARB-4 auf der Tumorzellmembran wird dieser durch Endozytose internalisiert und es kommt im Anschluss daran zur Induktion der Apoptose. Der TAF15 Wildtyp ist hingegen im Zellkern und im Zytoplasma lokalisiert.

#### 4.6.6 Rolle von TAF15 in Tumorzellen

Neben den bereits beschriebenen, regulären Funktionen in normalen Zellen, ist das TAF15 Protein zusätzlich in die Tumorentstehung involviert. Chromosomale Translokationen seines Gens führen zu Fusionsproteinen, welche in malignen Tumoren gefunden wurden [184-185, 262-264]. Das in dieser Arbeit isolierte und identifizierte BARB-4 Antigen stellt ebenfalls eine TAF15 Variante dar, die exklusiv in Tumorzellen vorkommt. Des Weiteren besitzt TAF15 einige Eigenschaften und Funktionen, die besonders für maligne Zellen von Bedeutung sind. Viele dieser Funktionen sind interessanterweise auch bei den anderen beiden TET-Proteinen EWS und TLS zu finden [250]. In den folgenden Abschnitten werden die einzelnen Funktionen und ihre mögliche Rolle in der Tumorentstehung bzw. -progression näher charakterisiert.

#### 4.6.6.1 Expression von TAF15 Fusionsproteinen in Tumoren

Chromosomale Abnormalitäten sind sehr gängige molekulare Veränderungen, die besonders bei der hämatologischen Malignität eine große Rolle spielen. Sie bestehen dabei häufig aus den oben genannten, chromosomalen Translokationen, seltener aus chromosomalen Inversionen, und können über zwei unterschiedliche Mechanismen zu malignen Neoplasien führen. Die dadurch auftretenden Abnormalitäten können entweder zur Aktivierung sogenannter Protoonkogene oder zur Entstehung von Genfusionen führen [265-266]. In der chronischen myeloiden Leukämie fusioniert beispielsweise bcr mit c-abl zu dem chimären Transkript bcr-abl, welches ein 210 kDa großes Fusionsprotein mit einer erhöhten Tyrosinkinaseaktivität und einer abnormalen Zelllokalisierung kodiert [267-268]. Chromosomale Veränderungen, wie sie bei der hämatologischen Malignität vorkommen, sind relativ untypisch für solide Tumoren. Dennoch gibt es Ausnahmen [253]. Eine dieser Ausnahmen stellt das zu TAF15 nah verwandte EWS Gen dar, welches in einer Vielzahl von soliden Tumoren einer Translokation unterliegt [269-279].

Auch TAF15 selbst, welches ursprünglich aufgrund der Homologie zu den beiden Protoonkogenen EWS und TLS/FUS identifiziert werden konnte, ist in diese chromosomalen Translokationen involviert [245, 280]. Eine charakteristische Translokation, t(9;17)(q22;q11.2), welche aus der Fusion des TAF15 Gens und des nukleären Rezeptor Gens NOR1 (auch bekannt als TEC oder CHN) resultiert, wurde in extraskelletalen myxoiden Chondrosarkomen (EMCs) gefunden [184, 262-264]. Eine weitere Genfusion des TAF15 mit dem Transkriptionsfaktor CIZ/NMP4 liegt bei der akuten Leukämie vor [185]. Für die Tumorentstehung könnte hierbei die Proteinüberexpression von Bedeutung sein, die durch die TAF15 Fusionsgene ausgelöst wird. Die N-Termini der TET Proteine (TAF15, TLS/FUS und EWS) werden bei der Fusion mit einer DNA-bindenden Domäne eines anderen Transkriptionsfaktors verknüpft. Im Vergleich zum ursprünglichen Transkriptionsfaktor konnte hierbei eine gesteigerte Transkriptionsaktivität der chimären Proteine festgestellt werden [186, 277-278, 281-282]. Dies ist darauf zurückzuführen, dass die N-terminale Transaktivierungsdomänen der TET-Proteine potenter sind als die Domänen ihrer Fusionspartner. Es wurde daher bereits mehrfach postuliert, dass TET Proteine in der Lage sind die Onkogenese verstärken

[182, 186, 245, 249, 282]. Der Einfluss der nachfolgend beschriebenen Transkriptionsverstärkung spielt hierbei ebenfalls eine Rolle.

#### **4.6.6.2 N-terminale TAF15 Domäne als Transkriptionsverstärker**

Signalübertragungswege können die Aktivität nukleärer Transkriptionsfaktoren modellieren und dadurch die Genexpression beeinflussen [283-284]. Der N-Terminus des TAF15 Proteins kann an den Thyrosinresten *in vivo* und *in vitro* durch das Enzym Thyrosinkinase v-Src phosphoryliert werden. Diese Modifikation fördert die Transaktivierungsaktivität des N-Terminus und somit die Transkriptionsaktivität. Der N-Terminus des TAF15 dient dabei möglicherweise als Überbrückungsfaktor zwischen der DNA und dem Transkriptionsapparat [253].

Interessanterweise wird die Thyrosinkinase v-Src in Krebszellen überexprimiert. Dies ermöglicht den TAF15 Fusionsproteinen (Abschnitt 4.6.6.1) in den entsprechenden humanen Krebsarten eine Erhöhung der Transkriptionsaktivität. Hervorgerufen durch den potenten TAF15 N-Terminus und die Phosphorylierung kann es durch die chimären Proteine zu einer mehrfach verstärkten Expression von Proteinen kommen, welche für die Tumorentstehung von Bedeutung ist [184-185, 253, 262-264]. Die Überexpression der Thyrosinkinase in Tumorzellen ermöglicht jedoch auch eine verstärkte Phosphorylierung der nicht fusionierten TAF15 Form und somit deren ebenfalls erhöhte Transkriptionsaktivität. Die Überexpression des TAF15 Zielgens ID1 (*inhibitor of DNA-binding 1, dominant negative helix-loop-helix protein*) in Krebsgewebe konnte bereits nachgewiesen werden. Es kann dabei mit der proteosomalen Untereinheit S5A reagieren und zentrosomale Abnormalitäten verursachen. Des Weiteren kann ID1 die Lebensspanne von Epithelialzellen verlängern und die Differenzierung inhibieren [285-286]. Dies sind Funktionen, die für Krebszellen essentiell sind. Auch CDK6 (*cyclin-dependent kinase 6*), ein weiteres Protein, dessen Expression durch TAF15 beeinflusst wird, soll einen hemmenden Einfluss auf die Zelldifferenzierung haben [287]. Es kann bei Krebs ebenfalls überexprimiert vorliegen [288]. Die durch eine Phosphorylierung erhöhte Aktivität des Transkriptionsfaktors TAF15 hat somit einen Einfluss auf wichtige Zellprozesse, die einen Vorteil für Tumorzellen mit sich bringen.

Ebenso wie die Phosphorylierung verstärkt auch die Bindung des glykolytischen Proteins GAPDH an die N-terminale Domäne (NTD) des TAF15 die Transkriptionsaktivität. Dies konnte bereits für die Transkription des Fusionsproteins TAF15-TEC nachgewiesen werden [289].

Die beiden, beschriebenen Mechanismen ermöglichen der zuvor bereits effektiven NTD des TAF15 eine Verstärkung ihrer Potenz. Sie weisen somit eine direkte Interaktion mit genau dem Part des TAF15 Moleküls auf, der maßgeblich an der Tumorentstehung beteiligt zu sein scheint.

#### **4.6.6.3 Überexpression von TAF15 in Tumorzellen**

In dieser Arbeit konnte eine erhöhte TAF15 Expression in Tumorzellen bzw. -gewebe auf Protein- und mRNA-Ebene nachgewiesen werden. Um die Überexpression des Proteins in einer malignen Zelle verstehen zu können, muss der Nutzen geklärt werden, den die Tumorzelle hieraus ziehen kann.

Ein erstaunlicher, funktioneller Aspekt, der hierbei wichtig erscheint, ist eine mögliche Involvierung in die zelluläre Stressantwort. Das Protein TAF15 konnte, genau wie die nah verwandten TLS/FUS und EWS Proteine, nach Hitzeeinwirkung oder oxidativem Stress in Stressgranula (SGs; *stress granules*) zusammen mit dem Stressmarker TIA-1 detektiert werden [183]. SGs sind Partikel, die im Zytoplasma von Zellen vorkommen, welche umgebungsbedingtem Stress ausgesetzt sind. Sie entstehen durch eine Translationsinitiation unter Abwesenheit von eIF2-GTP-tRNA<sub>i</sub><sup>Met</sup> und bestehen aus Präinitiationskomplexen, mRNA und RNA-bindenden Proteinen [26, 290]. Das Ziel der SGs ist es, die RNAs von schädlichen Konditionen, wie sie bei Stress entstehen, zu schützen. Die Zusammenlagerung der RNAs in diesen phasendichten Kügelchen hält sie davon ab, mit schädlichen Chemikalien zu reagieren und rettet so die Information ihrer RNA-Sequenz [291]. Welche Rolle das TAF15 Protein hierbei besitzt, ist noch unklar und bedarf genaueren Analysen.

Eine Kolokalisation der TET Proteine mit TIA-1 konnte ebenfalls bei der Mehrheit der Zellen beobachtet werden, die mit TAF15 oder FUS transformiert wurden und diese Proteine anschließend überexprimieren [183]. Es ist daher anzunehmen, dass die

TET Proteine an der zellulären Stressantwort beteiligt sind und eine Überexpression der entsprechenden Proteine die Anordnung in den Stressgranula verursacht.

Aufgrund einer schlechten Vaskularisation und immunologischen Attacken sind maligne Zellen permanentem Stress ausgesetzt [122, 135, 292]. Es ist in diesem Zusammenhang nicht verwunderlich, dass Proteine, die an der Stressantwort beteiligt sind, vermehrt in malignen Zellen vorkommen, da sie dort protektiv wirken und so für den Erhalt der Zelle sorgen.

#### **4.6.6.4 Involvierung des TAF15 Proteins in die Apoptose**

Als Apoptose bezeichnet man den physiologischen Zelltod, bei dem sich eine entsprechende Zelle mit Hilfe eines Selbstzerstörungsprozess eliminiert. Apoptose kann dabei sowohl extrinsisch, z.B. durch Binden des Tumornekrosefaktor oder FAS-Liganden an der Zelloberfläche, wie auch intrinsisch, z.B. durch ein stark geschädigtes Erbgut, induziert werden. Sie ist Teil des Zellstoffwechsels, der zur Aufrechterhaltung der Homöostase oder der Elimination geschädigter Zellen dient und der von der betroffenen Zelle selbst aktiv durchgeführt wird [293-295]. Dieser Zelltod gewährleistet daher eine für das umliegende Gewebe unschädliche Beseitigung der entsprechenden Zelle. Es kommt daher auch zu keinen Entzündungsreaktionen wie bei dem nekrotischen Zelltod [179, 296]. Für die Apoptose spielt eine Gruppe von proteolytischen Enzymen, die sogenannten Caspasen, eine wichtige Rolle [179]. Je nachdem auf welchem Weg die Apoptose ausgelöst wird, kommt es zur Aktivierung der einzelnen Caspasen. Während der extrinsische Apoptoseweg eine aktive Caspase 8 verläuft, um die Caspasenkaskade zu aktivieren, ist für den intrinsischen Weg die aktive Form von Caspase 9 entscheidend. Sogenannte Effektorcaspasen (Caspase 3, 6, 7) führen anschließend zum Zelltod [297-298]. Sie sind selbst am Abbau von Proteinen beteiligt oder aktivieren weitere Zielproteine durch eine limitierte Proteolyse [179]. Dies führt durch den Verdau des Zytoskeletts, die Zerstörung des Nukleus sowie der Fragmentation der DNA zu einem Zerfall der Zelle in Form von Vesikeln (*apoptotic bodies*), welche anschließend mittels Phagozytose entsorgt werden können [295].

Wie bereits in Abschnitt 4.5.3.2 ausführlich beschrieben, kann der IgG BARB-4 wie viele andere natürliche IgM Antikörper, die innerhalb der Arbeitsgruppe gefunden wurden, bei Tumorzellen Apoptose induzieren. Einer dieser Antikörper ist der IgM SC-1. Er ist in der Lage über sein Target CD55<sup>SC-1</sup>, welches auf der Oberfläche von Magenkarzinomzellen exprimiert wird, Apoptose zu induzieren [138]. Bei diesem Vorgang wurde vor allem die Phosphorylierung bestimmter Proteine sowie die Aktivierung bestimmter Caspasen untersucht, die für den Verlauf der Apoptose wichtig sind. Hierbei konnte sowohl eine erhöhte Expression als auch eine Aktivität der Caspasen 8 und 3 beobachtet werden [138, 142]. Außerdem konnte eine erhöhte Expression von Caspase 2 in einer späten Phase der Apoptose festgestellt werden [142]. Trotz der Aktivierung der Apoptose durch einen Liganden (CD55<sup>SC-1</sup>) an der Magenkarzinomzelloberfläche unterscheidet sich der Apoptoseweg des SC-1 von dem üblichen durch FAS induzierten Weg. Im Gegensatz zu diesem klassischen Weg findet bei der SC-1 induzierten Apoptose keine Spaltung von Poly-(ADP-Ribose)-Polymerase (PARP) und kein Flip-Flop von Annexin statt [118, 142].

Ein weiterer IgM Antikörper, der Apoptose induziert, ist SAM-6. Er bindet an eine tumorspezifisch modifizierte Form des GRP78 Moleküls, welche auf der Tumorzellmembran exprimiert wird [122]. Bei Tumorzellen, die mit dem IgM Antikörper SAM-6 inkubiert wurden, konnte eine erhöhte Aktivität der Caspasen 9, 8, 6, und 3 sowie eine Freisetzung von Cytochrom C aus den Mitochondrien während des Apoptosevorgangs beobachtet werden [178].

Bei dem IgG Antikörper BARB-4, welcher in dieser Arbeit beschrieben wird, konnte zwar gezeigt werden, dass der Antikörper ebenfalls Apoptose in Tumorzellen induzieren kann, jedoch ist der genau Mechanismus über den die Apoptose abläuft noch nicht bekannt. Interessanterweise konnte jedoch eine tumorspezifische TAF15 Variante als Antigen für den monoklonalen, humanen Antikörper BARB-4 nachgewiesen werden.

TAF15 wurde schon im Zusammenhang mit Apoptose beschrieben. Das Protein konnte bereits als Caspasensubstrat identifiziert werden. Die beiden Caspasen 3 und 7 waren dabei in der Lage, sowohl das Protein als auch das Fusionsprotein TAF15-CIZ/NMP4 (siehe Abschnitt 4.6.6.1) im N-terminalen Bereich zu spalten. Welche Auswirkung das TAF15 auf die Apoptose hat oder welche Rolle es dabei spielt, ist noch unklar. Die mit TAF15 eng verwandten EWS und TLS Proteine liefern diesbezüglich jedoch einen interessanten Anhaltspunkt. Untersuchungen zeigten,

dass eine Überexpression von EWS- und TLS-Fusionsproteinen in Tumorzellen ausreicht, um eine durch zytotoxische Substanzen und Serumentzug ausgelöste Apoptose vollständig zu verhindern [282, 299]. Eine Überexpression von TAF15 Fusionsproteinen könnte daher ebenfalls eine Hemmung der Apoptose bewirken.

Bis jetzt konnte in Untersuchungen jedoch kein anti-apoptotischer Effekt bei einer Überexpression des Fusionsproteins TAF15-CIZ/NMP4 beobachtet werden. Auch verändertes, nicht spaltbares TAF15 zeigte keine Auswirkung auf die induzierte Apoptose der damit transfizierten Zellen [300]. Einen weiteren Aspekt, welcher eine wichtige Rolle spielen könnte, stellt die bereits erwähnte v-Src Kinase dar. Sie phosphoryliert den N-Terminus des TAF15 bei der Proteinsequenz <sup>106</sup>DQPD/Y<sup>110</sup>, welche auch als Caspaseschnittstelle identifiziert werden konnte [253, 300]. Es ist bewiesen, dass die Phosphorylierung das Spalten und die Aktivierung von Caspasevorstufen blockieren kann [301-302]. Daher ist anzunehmen, dass die modifizierte (phosphorylierte) Form des TAF15 Proteins eine erhöhte Proteolysestabilität besitzt und es hierdurch, wie bei den EWS- und TLS-Fusionsproteinen, zur Inhibierung der Apoptose kommen kann. Die durch TAF15 möglicherweise unterdrückte Apoptose kann auch erklären, wie es durch das Protein oder seine Fusionsproteine zur Immortalisierung von Zellen und somit zur Tumorentstehung kommt.

Unsere Ergebnisse, bei denen eine tumorspezifische TAF15 Variante als Antigen für den apoptoseinduzierenden Antikörper BARB-4 identifiziert werden konnte, unterstützen die Annahme, dass TAF15 in die Apoptose involviert ist. Eine Bindung des Antikörpers an sein Target könnte eine möglicherweise vorliegende Hemmung der Apoptose durch TAF15 aufheben. Über welchen Signalweg die BARB-4 induzierte Apoptose abläuft und welche Rolle dabei sein TAF15 Antigen hat, ist bis jetzt jedoch noch ungeklärt und muss in nachfolgenden Arbeiten genauer analysiert werden.

#### **4.6.6.5 Rolle von TAF15 in der Zelladhäsion und der Zellbeweglichkeit**

Zelladhäsion und Zellbeweglichkeit spielen eine große Rolle in der Kanzerogenese. Besonders bei der Metastasierung sind die beiden zelluläre Prozesse von Bedeutung

[191]. Als Metastasierung bezeichnet man den Vorgang bei dem sich einzelne Krebszellen aus dem Tumor ablösen und über das Blut oder die Lymphe in andere Körperareale wandern, in denen sie sich neu ansiedeln und vermehren. Die Fähigkeit eines Tumors Metastasen auszubilden verschlechtert die Heilungschancen der betroffenen Patienten meist drastisch. Das Potential zur Metastasierung hängt dabei von mehreren Faktoren, wie beispielsweise seiner Umgebung oder der Angiogenese ab. Hauptsächlich ist jedoch der molekulare Phänotyp des Tumors ausschlaggebend. Einzelne Zellen des Primärtumors können sich genetisch verändern und so wichtige Eigenschaften wie beispielsweise invasives Wachstum erlangen, welche für eine Metastasierung essentiell sind. Diese Veränderung ist jedoch nicht nur funktionell, sondern wirkt sich auch auf den Phänotyp der entsprechenden Tumorzelle aus. In zahlreichen Analysen konnte bestätigt werden, dass phänotypische Unterschiede zwischen primären und sekundären Tumorzellen bestehen. So existieren beispielsweise unterschiedliche Expressionslevel von Adhäsionsproteinen wie CD44, CD54 und CD146 zwischen metastasierenden und nicht-metastasierenden Tumorzellen [303-306]. Für die nachfolgende Betrachtung spielen sowohl das äußere Erscheinungsbild (Phänotyp) der metastasierenden Zelle als auch ihre funktionellen Aspekte eine wichtige Rolle. Bei dem Antikörper BARB-4 konnte eine hemmende Wirkung auf die Tumorzellmotilität und Tumorzelladhäsion festgestellt werden. Wie oben beschrieben, sind dies wichtige Vorgänge bei der Entstehung von Metastasen. Die Beweglichkeit bzw. das Ausbreitungsvermögen von metastasierenden Zellen ist essentiell für die Migration in den Blutstrom und die Invasion der Tumorzelle in neue Gewebeareale. Die Adhäsion unterstützt die Anhaftung der intravaskulär lokalisierten Tumorzellen im Blut an das Endothelium der Blutgefäße [191]. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass der natürliche, monoklonale Antikörper BARB-4 eine tumorspezifische TAF15 Variante als Target erkennt. TAF15 scheint dabei ebenso wie BARB-4 in beide Prozesse involviert zu sein.

Das Protein wurde kolokalisiert mit den *focal adhesion/spreading initiation center* Markern Vinculin, FAK und RACK1 in zytoplasmatischen Granula in der Nähe der Zytoplasmamembran detektiert. Genau wie das nah verwandte TLS/FUS Protein konnte TAF15 auch in den sogenannten Ausbreitungsinitiationszentren (SICs, *Spreading initiation center*) nachgewiesen werden [183]. Vorherige Untersuchungen des TLS/FUS zeigten dabei einen stimulierenden Effekt des Proteins auf die frühe



Zellausbreitung [307]. Zusätzlich konnte auch ein Zusammenhang zwischen TLS/FUS und *NMDA receptor-adhesion protein signaling* Komplexen beobachtet werden [308]. Ein weiterer Aspekt, der die Involvierung von TAF15 in die Zelladhäsion bekräftigt, stellt die Thyrosinkinase v-Src dar. Alle drei humanen TET-Proteine interagieren mit v-Src, einem Enzym, welches indirekt die Adhäsion beeinflussen kann [309]. Eine Funktion von TAF15 in den beiden zellulären Prozessen ist daher sehr naheliegend. Welche Rolle das Protein in diesem Zusammenhang spielt und welche Funktionen es genau besitzt, ist jedoch noch unklar.

Wie bereits erwähnt, ist eine tumorspezifische Variante des TAF Proteins das Target des BARB-4 Antikörpers, der sowohl die Tumorzelladhäsion als auch die Tumorzellmotilität inhibieren kann. Unsere Untersuchungen stützen daher die Annahme, dass das TAF15 Protein in beide Vorgänge involviert ist. Dieses Ergebnis liefert durch die direkte Attackierung charakteristischer Eigenschaften von Krebszellen einen wichtigen Aspekt bezüglich der potenten Anti-Tumorwirkung des Antikörpers. Des Weiteren konnte in immunhistochemischen Untersuchungen gezeigt werden, dass der Antikörper BARB-4 sowohl Zellen von Primärtumoren als auch Metastasen bindet. Dies ist bemerkenswert, da sich der Phänotyp von metastasierenden Zellen und Primärtumorzellen, wie oben beschrieben, unterscheidet. Das TAF15<sup>BARB-4</sup> muss daher trotz der Unterschiede in den Zelloberflächen in beiden Zelltypen exprimiert werden. Dies könnte vor allem für therapeutische Ansätze von Bedeutung sein. Der Antikörper BARB-4 könnte deshalb in einer Therapie nicht nur gegen Primärtumoren genutzt werden, sondern auch gegen Metastasen. Einer Metastasierung könnte gegebenenfalls auch schon bei der Behandlung eines Primärtumors mit BARB-4 durch dessen Effekte auf metastasierende Zellen entgegengewirkt werden.

#### **4.6.7 Modifikationen von TAF15**

Proteine können, wie bereits in Abschnitt 4.3 erwähnt, bei einer Zelltransformation Veränderungen unterliegen. Diese Änderungen innerhalb des Proteins können dabei auf unterschiedlichen Ebenen entstehen. Man kann hierbei zwischen der Mutation

(Veränderung auf DNA-Ebene), der Modifikation auf mRNA-Ebene (posttranskriptionale Modifikation) und Proteinebene (co- bzw. posttranslationalen Modifikationen) unterscheiden [32, 310-312]. Da das im Rahmen dieser Arbeit gefundene TAF15<sup>BARB-4</sup> nur in Tumorzellen detektiert werden konnte, der TAF15-Wildtyp jedoch ubiquitär vorkommt, ist eine solche Veränderung sehr wahrscheinlich. Immunhistochemische Färbungen mit Anti-TAF15 und BARB-4 Antikörper auf Tumor- und Normalgewebe stützten diese Annahme. Sie zeigten, dass der Anti-TAF15 Antikörper sowohl das Tumor- als auch das Normalgewebe färben kann. Hingegen reagierte BARB-4 nur mit dem Tumorgewebe. Des Weiteren konnte mit den beiden Antikörpern ein unterschiedliches Verteilungsmuster ihrer Antigene beobachtet werden. Der Anti-TAF15 Antikörper färbte auf dem untersuchten Normalgewebe nur den Nukleus, während er auf dem entsprechenden Tumorgewebe zusätzlich mit dem Zytoplasma und der Zellmembran reagieren konnte. Der Antikörper BARB-4, welcher nur auf dem Tumorgewebe band, reagierte hingegen nur mit dem Zytoplasma und der Zellmembran. Dieses Ergebnis deutet auf eine Koexistenz von TAF15<sup>BARB-4</sup> und dem TAF15-Wildtyp in Tumorgewebe hin, wobei der Anti-TAF15 Antikörper mit beiden Proteinformen reagieren kann, während BARB-4 nur mit TAF15<sup>BARB-4</sup> interagiert.

Auch Immunfluoreszenzanalysen bekräftigen eine Koexistenz unterschiedlicher TAF15 Proteinformen in Tumorzellen. In einer Simultanfärbung mit Anti-TAF15 und BARB-4 Antikörper lag Anti-TAF15 sowohl intra- als auch extranukleär vor, während BARB-4 nur extranukleär detektiert werden konnte. Beide Antikörper lagen dabei extranukleär kolokalisiert vor.

TAF15 weist normalerweise mehrere unterschiedliche Proteinmodifikationen auf. Hierzu zählen die posttranslationalen Modifikationen Methylierung und Phosphorylierung. Diese sind für das Protein von großer Bedeutung und können seine Lokalisation und Funktionen beeinflussen bzw. regulieren [252-253]. In einigen Tumoren konnten außerdem auch genetische Veränderungen in Form von Fusionsgenen festgestellt werden [184-185, 262-264]. Diese TAF15 Fusionsproteine stellen Chromosomenmutationen dar. In den chimären Proteinen ist nach der Genfusion nur noch der N-Terminus des TAF15 enthalten, nicht jedoch das C-terminale Ende [184-185, 262-264]. Eine solche Mutation konnte für das BARB-4 Antigen ausgeschlossen werden. Bei der Peptidmassen-Fingerprint Analyse mittels MALDI-MS, die zur Identifizierung des BARB-4 Antigens herangezogen wurde,

---

konnten einige Peptidfragmente der C-terminalen RNA-bindenden Domäne zugeordnet werden.

In einer Sequenzierung von TAF15 in Tumorzellen konnten außerdem keine relevanten Veränderungen auf cDNA-Ebene detektiert werden, welche für die Tumorspezifität von TAF15<sup>BARB-4</sup> ausschlaggebend sein könnten. Zwar traten einzelne Basenaustauschmutationen auf, diese erwiesen sich jedoch als stille und somit nicht relevante Mutationen. Es war innerhalb dieser Untersuchung auch kein Hinweis auf eine mögliche Modifikation von TAF15 auf mRNA-Ebene, wie beispielsweise einer Spleißvariante, ersichtlich.

Das BARB-4 Antigen wurde innerhalb dieser Arbeit zusätzlich auf tumorspezifische Carbohydratstrukturen untersucht, welche in Tumorzellen häufig durch Antikörper erkannt werden. Mit Hilfe natürlicher IgM Antikörper wurden in der Vergangenheit bereits mehrere, unterschiedliche Proteine entdeckt, die tumorspezifische N- oder O-Carbohydratstrukturen aufwiesen [122, 128, 138]. Für den BARB-4 Antikörper konnte eine solche Zuckerstruktur als Epitop jedoch ausgeschlossen werden. Glykosidase-Analysen zeigten hierbei weder nach N- noch nach O-Carbohydratverdau einen Bindungsverlust des Antikörpers an sein Antigen.

Des Weiteren konnte in Western Blot-Analysen mit Anti-TAF15 Antikörper auf Zelllysaten aus gesunden Zellen und Tumorzellen gezeigt werden, dass es sich höchstwahrscheinlich um eine kleinere Modifikation handelt, welche nicht mit dieser Analysenmethode detektiert werden kann. Sowohl das untersuchte Zelllysate aus malignen Zellen als auch das Lysat aus nicht-malignen Zellen wiesen eine TAF15 Bande auf exakt der gleichen Höhe auf. Möglich sind daher Veränderungen von kleineren Gruppen des TAF15 Moleküls sowie Veränderungen in der Faltung. Es existieren somit zahlreiche Möglichkeiten für eine tumorspezifische Modifikation des TAF15<sup>BARB-4</sup>.

#### **4.6.8 Bedeutung des BARB-4 Antikörpers und des TAF15<sup>BARB-4</sup> Antigens**

Das Antigen des tumorspezifischen BARB-4 Antikörpers stellt eine neue TAF15 Variante dar, die exklusiv von Tumorzellen exprimiert wird. Das Vorkommen dieses Antigens in vielen, unterschiedlichen Tumorgeweben sowie die Lokalisation des

TAF15<sup>BARB-4</sup> auf der Tumorzellmembran bieten möglicherweise sowohl für den Antikörper BARB-4 wie auch für sein Target neue Einsatzmöglichkeiten in Tumortherapie und –diagnostik. In der Tumordiagnostik könnten beide Moleküle dazu beitragen, dass malignes Gewebe leicht identifiziert und dadurch frühzeitig eliminiert werden kann. Durch die tumorspezifische Expression des BARB-4 Antigens könnte im therapeutischen Bereich außerdem gezielt Tumorzellen attackiert werden, während das umliegende Gewebe nicht in diesen Vorgang integriert wäre. Ein selektiver Angriff auf Tumorzellen ermöglicht eine verringerte Zytotoxizität und würde somit eine schonende Therapieoption darstellen. Des Weiteren handelt es sich bei BARB-4 um einen voll humanen, natürlichen Antikörper. Er wurde aus dem menschlichen Organismus isoliert und umgeht somit die Gefahr von der humanen Immunabwehr als Immunogen identifiziert zu werden. In der Tumortherapie aktuell verwendete Antikörper wie beispielsweise Trastuzumab oder Cetuximab kommen zwar wie BARB-4 von der Immunglobulinklasse G, sind aber hauptsächlich humanisiert oder chimär, da es nur sehr wenige, voll humane Antikörper (z.B. Panitumumab) gibt, die bereits therapeutisch zum Einsatz kommen [57, 76, 313-314]. Die chimären und humanisierten Antikörper weisen jedoch nicht nur körperfremde Eiweißbestandteile auf, sondern sind meist auch gegen Differenzierungsantigene gerichtet, welche zwar auf Tumoren überexprimiert werden, jedoch nicht tumorspezifisch sind. Trotz der Minimierung des Fremdproteinanteils in diesen chimären bzw. humanisierten Antikörpern und der dadurch häufig geringeren Toxizität besteht auch weiterhin der Bedarf an neuen Antikörpern, die besser verträglich sind und die vor allem eine höhere Tumorspezifität aufweisen [71, 73]. Dieses Ziel kann jedoch nur mit einem rein humanen Antikörper erreicht werden, der in der Lage ist tumorspezifische Antigene zu erkennen.

Mit dem voll humanen, natürlichen IgM Antikörper SC-1 konnten in der Vergangenheit bereits erste Erfolge erzielt werden. Der tumorspezifische Antikörper wurde in klinischen Studien in der Chirurgischen Klinik der Universität Würzburg und der Missionsärztlichen Klinik Würzburg getestet. Hierbei konnte sowohl eine gute Verträglichkeit als auch Wirksamkeit des Immunglobulins bei den Patienten verzeichnet werden [143]. Die Untersuchungen zeigten eine Tumorregression von 60% bei SC-1 behandelten Patienten sowie eine erhöhte Überlebensrate nach 3 Jahren im Vergleich zu der 3-Jahresüberlebensrate der deutschen Magenkarzinomstudie [126, 130, 144-146]. Wie dieses Beispiel zeigt, stellen die

humane Herkunft sowie die Tumorspezifität, welche auch BARB-4 besitzt, große Vorteile dar. Diese beiden Aspekte heben den Antikörper BARB-4 von den aktuell tumortherapeutisch eingesetzten Immunglobulinen ab und könnten den Antikörper somit für die Tumortherapie bedeutend machen.

Die aufgeführten, unterschiedlichen Einsatzmöglichkeiten in Tumordiagnostik und -therapie zeigen also, dass sowohl der Antikörper BARB-4 als auch sein Antigen TAF15<sup>BARB-4</sup> von großem Interesse sein könnten. Beide Moleküle eröffnen jedoch vor allem in der zielgerichteten Tumortherapie neue Wege, die zu einer sehr effektiven, schonenderen und nebenwirkungsärmeren Behandlung von Patienten beitragen können.



## 5 Zusammenfassung

Der humane, monoklonale IgG Antikörper BARB-4 konnte mit Hilfe der Hybridomatechnologie aus einem an Magenkarzinom erkrankten Patienten isoliert werden. BARB-4 stellt aufgrund seiner Keimbahnkodierung einen Bestandteil der innaten Immunität dar und ist eines der wenigen tumorspezifischen IgG Immunglobuline, die diesem Teil des Immunsystems zugeordnet werden können.

Innerhalb dieser Arbeit konnte die Zielstruktur des Antikörpers identifiziert und näher charakterisiert werden. Das BARB-4 Antigen wurde hierbei über ein affinitätschromatographisches Verfahren aus Tumorzellmembranextrakten aufgereinigt und anschließend mittels MALDI-MS über die Peptidmassen-Fingerprint Methode analysiert. Das dabei isolierte Protein konnte eindeutig als humanes TAF15 identifiziert werden. Diese auf der Zellmembran von Tumoren exprimierte TAF15 Variante besitzt ein Molekulargewicht von etwa 78 kDa. Sie kommt im Gegensatz zum Wildtyp exklusiv in Tumorzellen vor und konnte nicht in Normalgewebe nachgewiesen werden. Immunhistochemische Untersuchungen mit BARB-4 und Anti-TAF15 Antikörper auf Tumor- und Normalgewebe deuteten dabei auf eine Koexistenz von Wildtyp und tumorspezifischer TAF15-Variante in malignem Gewebe hin und legten somit eine tumorspezifische Modifikation des TAF15<sup>BARB-4</sup> nahe. Ein Carbohydrat-Epitop, wie es sehr häufig bei den natürlichen IgM Antikörpern vorkommt, konnte hier jedoch ausgeschlossen werden.

In funktionellen Analysen konnte gezeigt werden, dass die Bindung des BARB-4 Antikörpers auf Tumorzellen einen Einfluss auf diverse zelluläre Prozesse ausübt. Durch die Bindung hemmte der Antikörper das Zellwachstum von Tumorzellen und induzierte deren Apoptose. Weitere interessante Eigenschaften des BARB-4, die bei Tumorzellen beobachtet werden konnten, sind vor allem für metastasierende Zellen von Bedeutung. Nach erfolgter Antikörperinkubation konnte bei Tumorzellen eine Inhibierung der Zelladhäsion und der Zellbeweglichkeit nachgewiesen werden. Diese beiden zellulären Prozesse sind wichtig für sich im Körper ausbreitende, maligne Zellen. In allen durchgeführten Analysen handelte es sich um vom Antikörper direkt vermittelte Effekte.

Weitere Untersuchungen wurden durchgeführt, um das Bindungsverhalten des Antikörpers genauer charakterisieren zu können. Immunfluoreszenzanalysen zeigten

dabei, dass der Antikörper BARB-4 nach der Bindung an die Tumorzellmembran internalisiert wird.

Die Erforschung des BARB-4 Antikörpers und seiner Zielstruktur TAF15<sup>BARB-4</sup> auf Krebszellen ermöglicht sowohl neue Einblicke in die Funktionsweise der innatens Immunität als auch neue Optionen für die zielgerichtete Tumorthherapie. Die Identifizierung einer extrazellulären, tumorspezifischen TAF15 Variante bietet eine neue Möglichkeit für Diagnostik- und Therapieansätze. Durch die exklusive Expression auf Tumorzellen ermöglicht diese TAF15-Variante gezielt maligne Zellen zu attackieren ohne dabei gesunde Zellen zu beeinflussen. Durch das Vorkommen des TAF15<sup>BARB-4</sup> in den verschiedensten Tumorentitäten könnte diese Zielstruktur für die Therapie vieler unterschiedlicher, maligner Erkrankungen genutzt werden. Aufgrund seiner funktionellen Eigenschaften, wie der Hemmung der Tumorzellmotilität und Tumorzelladhäsion, könnte der BARB-4 Antikörper besonders für die Prävention einer Metastasierung von Bedeutung sein.



## 6 Summary

BARB-4, a human monoclonal IgG antibody originally isolated from a stomach cancer patient using human hybridoma technology, is a germ-line encoded and innate immunity-related antibody, as are only few other tumor-specific IgG immunoglobulins.

In this study, the antigen of the BARB-4 antibody was identified and characterized. The potential target was isolated from tumor cell membrane extracts using affinity chromatography and further analyzed by a peptide mass fingerprint method (MALDI-MS). By this approach, we identified a human TAF15 protein with a molecular weight of approximately 78 kDa. In contrast to the wild-type TAF15 protein, this TAF15 variant is exclusively present in tumor cells and could not be detected in normal tissue. Immunohistochemical stainings revealed a coexistence of wild-type TAF15 and tumor-specific TAF15<sup>BARB-4</sup> in malignant tissue suggesting a tumor-specific modification of BARB-4 antigen. Importantly, a carbohydrate as potential epitope, typical for natural IgM antibodies, could be excluded.

Functional analyses demonstrated that BARB-4 inhibits proliferation of tumor cells and induces apoptosis. In addition, incubation of tumor cells with BARB-4 diminished cell adhesion and motility, which are crucial steps during formation of metastases. We applied additional assays to obtain more detailed information about the binding properties of the antibody. Specifically, immunofluorescence approaches confirmed binding of BARB-4 to the tumor cell surface and its subsequent internalisation by endocytosis. All these findings appear to be directly antibody-mediated effects.

The characterization of the BARB-4 antibody and its target TAF15<sup>BARB-4</sup> may lead to deeper insights into the function of the innate immune system. Moreover, the identification of a tumor-specific antibody offers novel opportunities for the diagnosis of malignant tumors and may foster the development of novel, antibody-based therapeutic approaches. Based on the exclusive expression of TAF15<sup>BARB-4</sup> on tumor cell surface, BARB-4 enables the discrimination of malignant and normal tissues, and the expression of TAF15<sup>BARB-4</sup> in various cancer entities might be the basis for the development of tumor-specific therapies. By arresting tumor cell adhesion and tumor cell motility, BARB-4 could be especially useful for the prevention of metastases in malignant tumors.



## 7 Abkürzungsverzeichnis

Im Laufe der Arbeit verwendete Abkürzungen:

$\beta$	beta
$\lambda$	lambda
$\kappa$	kappa
$\mu\text{g}$	Mikrogramm
$\mu\text{l}$	Mikroliter
$\mu\text{M}$	mikromolar
$\mu\text{m}$	Mikrometer
5-FU	5-Fluorouracil
ABTS	Diammonium-2,2'azinobis-(3-ethylbenzthiazolin-6-sulfonsäure)
ADCC	<i>antibody-dependent cellular cytotoxicity</i> , antikörperabhängige zelluläre Zytotoxizität
ADCP	<i>antibody-dependent cellular phagozytosis</i> , antikörperabhängige zelluläre Phagozytose
AdoMet	S-Adenosylmethionin
ADP	Adenosindiphosphat
AE1/3	Keratin
APC	<i>antigen-presenting cell</i> , antigenpräsentierende Zelle
APS	Ammoniumperoxodisulphat
Arg	Arginin, Dreibuchstabencode der Aminosäure
BCA	Bicinchoninsäure
bcr	breakpoint cluster region
BiP	<i>immunoglobulin binding protein</i>
BLAST	<i>Basic Local Alignment Search Tool</i>
bp	Basenpaare
BSA	<i>bovine serum albumin</i> (Rinder Serum Albumin)
c-abl	<i>cellular Abelson murine leukemia viral oncogene homolog</i>
CAM	<i>cell adhesion molecule</i> ,
CD	<i>cluster of differentiation</i> , Differenzierungsantigen
CDC	<i>complement-dependent cytotoxicity</i> , komplementabhängige Zytotoxizität
CDK	<i>cyclin-dependent kinase</i>
cDNA	<i>complementary DNA</i> , komplementäre DNA
CDR	<i>complementarity determining region</i> , Antigenbindestelle des Antikörpers
CEA	<i>carcinogenic embryonic antigen</i> , karzinogenembryonales Antigen
CFR	<i>cysteine-rich fibroblast growth factor receptor</i>
$C_H$	konstanter Teil der schweren Kette eines Antikörpers
CHN	Synonym für NOR1
CIZ	<i>CAS-interacting zinc finger protein</i>
$C_L$	konstanter Teil der leichten Kette eines Antikörpers
CLL	chronische, lymphatische Leukämie

---

CLRs	C-type lectin receptors
cm	Zentimeter
CNBr	Cyanogenbromid
CO <sub>2</sub>	Kohlenstoffdioxid
Cy	Cyanin
Cys	Cystein
D	Asparaginsäure, Einbuchstabencode der Aminosäure
DAB	Diaminobenzidin
DAF	<i>decay-acelerating factor</i> , CD55
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
DEPC-Wasser	Wasser versetzt mit Diethylpyrocarbonat, RNasefrei
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTPs	Deoxynukleosidtriphosphate
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGFR	<i>epidermal growth factor receptor</i>
eIF2-GTP-tRNA <sub>i</sub> <sup>Met</sup>	Komplex aus dem <i>eukaryotic initiation factor 2</i> , GTP und methioningekoppelter Initiator-tRNA
ELISA	<i>enzyme linked immunosorbent assay</i> , enzymgekoppelter Immunadsorptionstest
EMCs	extraskellettale myxoide Chondrosarkome
EpCAM	<i>epithelial cell adhesion molecule</i>
ErB2	HER2/neu
ESL	E-Selektin Ligand
EWS	<i>Ewing's sarcoma</i>
ExpPASy	<i>Expert Protein Analysis System</i>
Fa.	Firma
Fab	<i>antigen binding fragment</i> , Antigen bindendes Fragment des Antikörpers
FACS	<i>fluorescence activated cell sorting /scanning</i> , Durchflusszytometrie
FAK	<i>focal adhesion kinase</i>
Fc	<i>crystallizable fragment</i> , kristallisierbares Fragment des Antikörpers
Fc <sub>γ</sub> R	gamma Fc-Rezeptor
FcR	Fc-Rezeptor
FcRn	neonataler Fc-Rezeptor
FCS	<i>fetal calf serum</i> , Fetales Kälberserum
FGF	<i>fibroblast growth factor</i>
FGFR	<i>fibroblast growth factor receptor</i>
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FPLC	<i>fast protein liquid chromatography</i>
FR	<i>framework region</i> , Stabilisierungselement des Antikörpers
FUS	<i>fusion</i>

---

---

g	Gramm
G	Glycin, Einbuchstabencode der Aminosäure
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase
Gln	Glutamin, Dreibuchstabencode der Aminosäure
Gly	Glycin, Dreibuchstabencode der Aminosäure
GPI	Glykosylphosphatidylinositol
GRP	<i>glucose-regulated protein</i>
h	Stunde
HAMA	<i>human anti-mouse antibodies</i>
HAT	Hypoxanthin-Aminopterin-Thymidin
HCl	Salzsäure
HCl	Salzsäure
HEPES	4-(2-Hydroxyethyl)-piperazin-1-ethansulfonsäure
HER2/neu	<i>human epidermal growth factor receptor 2</i> , ErbB2
HF	High-Fidelity
HLA-DR	humanes Leukozytenantigen DR, MHC Klasse II Oberflächenrezeptor
HMMTOP	<i>Hidden Markov Model Topology Program</i>
HRP	<i>horseradish peroxidase</i> , Meerrettichperoxidase
HSP	<i>heat shock protein</i> , Hitzeschockprotein
ID	<i>inhibitor of DNA-binding, dominant negative helix-loop-helix protein</i>
Ig	Immunglobulin
kb	Kilobasen
kDa	Kilodalton
l	Liter
LB	lysogeny broth
M	Molar
m/V	Gewichtsprozent
m/z	Masse/Ladungsverhältnis
mA	Milliampere
mA	Milliampere
mAb	<i>monoclonal antibody</i> , monoklonaler Antikörper
MALDI	<i>matrix assisted laser desorption ionization</i> , matrix-unterstützte Laserdesorption/ Ionisation
MAT	Methioninadenosyltransferase
mg	Milligramm
MHC	<i>major histocompatibility complex</i>
Millipore®-Wasser	Wasser auf der Milli-Qplus PF Aufbereitungsanlage
min	Minute
Mio.	Millionen
ml	Milliliter
mM	millimolar
mm	Millimeter

---

---

M-MLV	Moloney Maus Leukämie Virus
M-MLV	Moloney murine leukemia virus
mRNA	<i>messenger RNA</i>
MS	Massenspektrometrie
MTT	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid
NAD	Nicotinamidadenindinukleotid; NADH (reduzierte Form), NAD <sup>+</sup> (oxidierte Form)
NADP	Nicotinamidadenindinukleotidphosphat, NADPH (reduzierte Form), NADP <sup>+</sup> (oxidierte Form)
NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i>
ng	Nanogramm
NK-Zelle	Natürliche Killerzelle
NLRs	NOD-ähnliche Rezeptoren
nM	nanomolar
nm	Nanometer
NMDA	<i>N-Methyl-D-Aspartat</i>
NMP	<i>nuclear matrix protein</i>
NOD	<i>nucleotid binding and oligomerization domain</i>
Nonidet P40	Nonylphenylpolyethylenglykol
NOR	<i>neuron-derived orphan receptor</i> , nukleärer Rezeptor der Subfamilie 4, Gruppe A, Mitglied 3 (NR4A3)
NTD	N-terminale Domäne
Oligo-dT	Oligodeoxythymidin
oxLDL	oxidiertes <i>low density lipoprotein</i> ,
P	Prolin, Einbuchstabencode der Aminosäure
PAMP	<i>pathogen associated molecular pattern</i> , pathogenassoziierte molekulare Muster
PARP	Poly-(ADP-Ribose)-Polymerase
PBS	<i>phosphate buffered saline</i> (Phosphat gepufferte Salzlösung)
PCR	polymerase chain reaction, Polymerasekettenreaktion
PEO	Polyethylenoxid
pmol	Picomol
POD	Peroxidase
POLR3B	<i>polymerase (RNA) III (DNA directed) polypeptide B</i>
ppm	<i>parts per milion</i>
PRMT	Protein-Arginin-N-Methyltransferase
PRRs	<i>pattern recognition receptors</i>
PSA	prostataspezifisches Antigen
Q	Glutamin, Einbuchstabencode der Aminosäure
R	Arginin, Einbuchstabencode der Aminosäure
RACK	<i>receptor for activated C-kinase</i>
RBP	<i>RNA-binding protein</i>
RISC	<i>RNA induced silencing complex</i>
RLRs	<i>RIG-1 (retinoic acid inducible gene 1-) like receptors</i>

---

---

RNA	Ribonukleinsäure
RNAi	RNA-Interferenz
RPMI	Roswell Park Memorial Institut
RRM	<i>RNA recognition motif</i> , RNA-Erkennungsmotiv
s	Sekunde
S	Serin, Einbuchstabencode der Aminosäure
SARFH	<i>sarcoma-associated RNA-binding fly homolog</i> , Drosophila Protein Cabeza
scFv	<i>single chain variable fragment</i>
SDS	<i>sodium dodecylsulfate</i> (Natriumdodecylsulfat)
SDS-PAGE	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese
Ser	Serin, Dreibuchstabencode der Aminosäure
SGs	<i>stress granules</i> , Partikel im Zytoplasma die an der Stressantwort beteiligt sind
SICs	<i>spreading initiation center</i> , Ausbreitungs-Initiationszentren
siRNA	<i>small interfering ribonucleic acid</i>
snRNA	<i>small nuclear RNA</i> , kleine nukleäre RNA
snRNP	small nuclear ribonucleoprotein particle
SOB	super optimal broth
SOC	SOB Medium mit 20 mM Glucose
SRs	Scavenger Rezeptoren
ssDNA	<i>single strand DNA</i> , einzelsträngige DNA
TAF	<i>TATA-binding protein-associated factor</i>
TBE	Tris-Borat-EDTA
TBP	TATA-binding protein
TBS	Tris bufferd saline
TCEP	Tris(2-carboxyethyl) phosphin
TEC	Synonym für NOR1
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin
TET	TLS-EWS-TAF15
TFIID	Transkriptionsfaktor IID
TIA	T-cell-restricted intracellular antigen
TLRs	<i>toll-like receptors</i>
TLS	<i>translocated in liposarcoma</i>
TMbase	Datenbank aus natürlich vorkommenden Transmembranproteinen
TMHMM	<i>Tied Mixture Hidden Markov Model</i>
TMpred	<i>Prediction of Transmembrane Regions and Orientation</i>
TNF	Tumornekrosefaktor
TRAIL	<i>tumor necrosis factor (TNF)- related, apoptosis-inducing ligand</i>
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
tRNA	<i>transfer RNA</i>
Tyr	Tyrosin, Dreibuchstabencode der Aminosäure
U	<i>unit</i> , Einheit

---

UICC	<i>Union internationale contre le cancer</i>
upm	Umdrehungen pro Minute
UV	ultraviolett
V/V	Volumenprozent
VEGF	<i>vascular endothelial growth factor</i>
V <sub>H</sub>	variabler Teil der schweren Kette eines Antikörpers
V <sub>L</sub>	variabler Teil der leichten Kette eines Antikörpers
v-Src	viral-sarcoma
WinMDI	<i>Windows Multiple Document Interface Flow Cytometry</i>
x g	x-fache Erdbeschleunigung
Y	Tyrosin, Einbuchstabencode der Aminosäure
ZF	Zinkfinger



## 8 Literaturverzeichnis

1. Statistisches Bundesamt, *Statistisches Jahrbuch 2007*. 2007.
2. Parkin, D.M., et al., *Global cancer statistics, 2002*. CA Cancer J Clin, 2005. 55(2): p. 74-108.
3. Robert-Koch-Institut (Hrsg) und die Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e. V. (Hrsg). *Krebs in Deutschland 2005/2006. Häufigkeiten und Trends*. 7. Ausgabe. Berlin, 2010
4. Einstein, A.J., M.J. Henzlova, and S. Rajagopalan, *Estimating risk of cancer associated with radiation exposure from 64-slice computed tomography coronary angiography*. Jama, 2007. 298(3): p. 317-23.
5. Vennervald, B.J. and K. Polman, *Helminths and malignancy*. Parasite Immunol, 2009. 31(11): p. 686-96.
6. Lin, C.S., et al., *A potential role for Helicobacter pylori heat shock protein 60 in gastric tumorigenesis*. Biochem Biophys Res Commun. 392(2): p. 183-9.
7. Marahatta, S.B., et al., *Cancer: determinants and progression*. Nepal Med Coll J, 2005. 7(1): p. 65-71.
8. Baer, H.J., et al., *Familial Risk of Cancer and Knowledge and Use of Genetic Testing*. J Gen Intern Med.
9. Fernandez, E., S. Gallus, and C. La Vecchia, *Nutrition and cancer risk: an overview*. J Br Menopause Soc, 2006. 12(4): p. 139-42.
10. Moore, G.E., *Cancer: 100 different diseases*. Am J Nurs, 1966. 66(4): p. 749-56.
11. Hanahan, D. and R.A. Weinberg, *The hallmarks of cancer*. Cell, 2000. 100(1): p. 57-70.
12. Weinberg, R.A., *How cancer arises*. Sci Am, 1996. 275(3): p. 62-70.
13. Cohen, S.M. and L.B. Ellwein, *Genetic errors, cell proliferation, and carcinogenesis*. Cancer Res, 1991. 51(24): p. 6493-505.
14. Zimonjic, D., et al., *Derivation of human tumor cells in vitro without widespread genomic instability*. Cancer Res, 2001. 61(24): p. 8838-44.
15. Duesberg, P., *Das Chaos in den Chromosomen*. Spektrum der Wissenschaft, 2007. 10: p. 55f.

16. Greaves, M., *Darwinian medicine: a case for cancer*. Nat Rev Cancer, 2007. 7(3): p. 213-21.
17. Vollmers, P.H. and S. Brandlein, *Natural monoclonal antibodies and cancer*. Recent Pat Anticancer Drug Discov, 2008. 3(2): p. 84-7.
18. Du Pasquier, L., *Meeting the demand for innate and adaptive immunities during evolution*. Scand J Immunol, 2005. 62 Suppl 1: p. 39-48.
19. Williams, M.J., *Regulation of antibacterial and antifungal innate immunity in fruitflies and humans*. Adv Immunol, 2001. 79: p. 225-59.
20. Rinkevich, B., *Invertebrates versus vertebrates innate immunity: In the light of evolution*. Scand J Immunol, 1999. 50(5): p. 456-60.
21. Milner, E.C., et al., *Human innate B cells: a link between host defense and autoimmunity?* Springer Semin Immunopathol, 2005. 26(4): p. 433-52.
22. Karin, M., T. Lawrence, and V. Nizet, *Innate immunity gone awry: linking microbial infections to chronic inflammation and cancer*. Cell, 2006. 124(4): p. 823-35.
23. Nurnberger, T., et al., *Innate immunity in plants and animals: striking similarities and obvious differences*. Immunol Rev, 2004. 198: p. 249-66.
24. Du Pasquier, L., *The immune system of invertebrates and vertebrates*. Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol, 2001. 129(1): p. 1-15.
25. Greenberg, S. and S. Grinstein, *Phagocytosis and innate immunity*. Curr Opin Immunol, 2002. 14(1): p. 136-45.
26. Mekori, Y.A. and D.D. Metcalfe, *Mast cells in innate immunity*. Immunol Rev, 2000. 173: p. 131-40.
27. Moretta, L., et al., *Natural killer cells: a mystery no more*. Scand J Immunol, 2002. 55(3): p. 229-32.
28. Kawai, T. and S. Akira, *Innate immune recognition of viral infection*. Nat Immunol, 2006. 7(2): p. 131-7.
29. Dunn, G.P., L.J. Old, and R.D. Schreiber, *The three Es of cancer immunoediting*. Annu Rev Immunol, 2004. 22: p. 329-60.
30. Akira, S., S. Uematsu, and O. Takeuchi, *Pathogen recognition and innate immunity*. Cell, 2006. 124(4): p. 783-801.

31. Parkin, J. and B. Cohen, *An overview of the immune system*. Lancet, 2001. 357(9270): p. 1777-89.
32. Vollmers, H.P. and S. Brandlein, *Natural antibodies and cancer*. N Biotechnol, 2009. 25(5): p. 294-8.
33. Pasare, C. and R. Medzhitov, *Toll-like receptors: linking innate and adaptive immunity*. Adv Exp Med Biol, 2005. 560: p. 11-8.
34. Medzhitov, R., *Toll-like receptors and innate immunity*. Nat Rev Immunol, 2001. 1(2): p. 135-45.
35. Janeway, C.A., Jr., *Approaching the asymptote? Evolution and revolution in immunology*. Cold Spring Harb Symp Quant Biol, 1989. 54 Pt 1: p. 1-13.
36. Arment, M.A. and M.J. Fenton, *Toll-like receptors: a family of pattern-recognition receptors in mammals*. Genome Biol, 2002. 3(8): p. REVIEWS3011.
37. Palsson-McDermott, E.M. and L.A. O'Neill, *Building an immune system from nine domains*. Biochem Soc Trans, 2007. 35(Pt 6): p. 1437-44.
38. Janeway, C.A., Jr. and R. Medzhitov, *Innate immune recognition*. Annu Rev Immunol, 2002. 20: p. 197-216.
39. Balducci, L. and C. Beghe, *Cancer and age in the USA*. Crit Rev Oncol Hematol, 2001. 37(2): p. 137-45.
40. Brandlein, S. and H.P. Vollmers, *Natural IgM antibodies, the ignored weapons in tumour immunity*. Histol Histopathol, 2004. 19(3): p. 897-905.
41. Vollmers, H.P. and S. Brandlein, *Natural antibodies and cancer*. J Autoimmun, 2007. 29(4): p. 295-302.
42. Erttmann, R., et al., *Naturally occurring humoral cytotoxicity against neuroblastoma (NB) cells in healthy persons and NB patients*. Pediatr Hematol Oncol, 1996. 13(6): p. 545-8.
43. Brigl, M. and M.B. Brenner, *CD1: antigen presentation and T cell function*. Annu Rev Immunol, 2004. 22: p. 817-90.
44. Burnet, M., *Immunological Factors in the Process of Carcinogenesis*. Br Med Bull, 1964. 20: p. 154-8.
45. Burnet, F.M., *The concept of immunological surveillance*. Prog Exp Tumor Res, 1970. 13: p. 1-27.

46. Thomas, L., *On immunosurveillance in human cancer*. Yale J Biol Med, 1982. 55(3-4): p. 329-33.
47. Vollmers, H.P., et al., *SC-1, a functional human monoclonal antibody against autologous stomach carcinoma cells*. Cancer Res, 1989. 49(9): p. 2471-6.
48. Ochsenbein, A.F. and R.M. Zinkernagel, *Natural antibodies and complement link innate and acquired immunity*. Immunol Today, 2000. 21(12): p. 624-30.
49. Medzhitov, R. and C.A. Janeway, Jr., *Innate immunity: impact on the adaptive immune response*. Curr Opin Immunol, 1997. 9(1): p. 4-9.
50. Hoebe, K., E. Janssen, and B. Beutler, *The interface between innate and adaptive immunity*. Nat Immunol, 2004. 5(10): p. 971-4.
51. Iwasaki, A. and R. Medzhitov, *Toll-like receptor control of the adaptive immune responses*. Nat Immunol, 2004. 5(10): p. 987-95.
52. Vollmers, H.P. and S. Brandlein, *The "early birds": natural IgM antibodies and immune surveillance*. Histol Histopathol, 2005. 20(3): p. 927-37.
53. Medzhitov, R. and C.A. Janeway, Jr., *Decoding the patterns of self and nonself by the innate immune system*. Science, 2002. 296(5566): p. 298-300.
54. Vollmers, H.P. and S. Brandlein, *Natural IgM antibodies: the orphaned molecules in immune surveillance*. Adv Drug Deliv Rev, 2006. 58(5-6): p. 755-65.
55. Brandlein, S., et al., *Natural IgM antibodies and immunosurveillance mechanisms against epithelial cancer cells in humans*. Cancer Res, 2003. 63(22): p. 7995-8005.
56. Maloney, D.G., et al., *IDEC-C2B8: results of a phase I multiple-dose trial in patients with relapsed non-Hodgkin's lymphoma*. J Clin Oncol, 1997. 15(10): p. 3266-74.
57. Murdoch, D. and J. Sager, *Will targeted therapy hold its promise? An evidence-based review*. Curr Opin Oncol, 2008. 20(1): p. 104-11.
58. Press, M.F. and H.J. Lenz, *EGFR, HER2 and VEGF pathways: validated targets for cancer treatment*. Drugs, 2007. 67(14): p. 2045-75.
59. Biotech Fresenius, *Hintergrundmaterial zur Entwicklung trifunktionaler Antikörper, ASCO 2007*. 2007.

60. Pardoll, D.M., *Therapeutic vaccination for cancer*. Clin Immunol, 2000. 95(1 Pt 2): p. S44-62.
61. Nestle, F.O., *Dendritic cell vaccination for cancer therapy*. Oncogene, 2000. 19(56): p. 6673-9.
62. Renner, C., L. Trumper, and M. Pfreundschuh, *Tumour vaccines: a new immunotherapeutic approach in oncology*. Ann Hematol, 2000. 79(12): p. 651-9.
63. von Mehren, M. and L.M. Weiner, *Monoclonal antibody-based therapy*. Curr Opin Oncol, 1996. 8(6): p. 493-8.
64. Breedveld, F.C., *Therapeutic monoclonal antibodies*. Lancet, 2000. 355(9205): p. 735-40.
65. Glennie, M.J. and P.W. Johnson, *Clinical trials of antibody therapy*. Immunol Today, 2000. 21(8): p. 403-10.
66. Ehrlich, P., *Croonian lecture: on immunity with special reference to cell life.*, in *Proceedings of the Royal Society of London*. 1900. p. 424-448.
67. Kohler, G. and C. Milstein, *Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity*. 1975. J Immunol, 2005. 174(5): p. 2453-5.
68. Galfre, G. and C. Milstein, *Preparation of monoclonal antibodies: strategies and procedures*. Methods Enzymol, 1981. 73(Pt B): p. 3-46.
69. Dunbar, B.S. and S.M. Skinner, *Preparation of monoclonal antibodies*. Methods Enzymol, 1990. 182: p. 670-9.
70. Maloney, D.G., *Antibody therapy has arrived. Now where does it fit?* Ann Oncol, 1999. 10(6): p. 619-21.
71. Dickman, S., *Antibodies stage a comeback in cancer treatment*. Science, 1998. 280(5367): p. 1196-7.
72. McNeil, C., *Monoclonal antibodies progress to the next generation*. J Natl Cancer Inst, 1995. 87(23): p. 1738-9.
73. Carter, P.J., *Potent antibody therapeutics by design*. Nat Rev Immunol, 2006. 6(5): p. 343-57.
74. Drewe, E. and R.J. Powell, *Clinically useful monoclonal antibodies in treatment*. J Clin Pathol, 2002. 55(2): p. 81-5.

75. Goldenberg, D.M. and H.A. Nabi, *Breast cancer imaging with radiolabeled antibodies*. Semin Nucl Med, 1999. 29(1): p. 41-8.
76. Adams, G.P. and L.M. Weiner, *Monoclonal antibody therapy of cancer*. Nat Biotechnol, 2005. 23(9): p. 1147-57.
77. Carter, P., L. Smith, and M. Ryan, *Identification and validation of cell surface antigens for antibody targeting in oncology*. Endocr Relat Cancer, 2004. 11(4): p. 659-87.
78. van Oers, M.H., 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(10): p. 3295-301.
79. Baeuerle, P.A. and O. Gires, *EpCAM (CD326) finding its role in cancer*. Br J Cancer, 2007. 96(3): p. 417-23.
80. Tjandra, J.J., L. Ramadi, and I.F. McKenzie, *Development of human anti-murine antibody (HAMA) response in patients*. Immunol Cell Biol, 1990. 68 ( Pt 6): p. 367-76.
81. Borchmann, P., G. Riethmuller, and A. Engert, *[Monoclonal antibodies: development and clinical prospects]*. Internist (Berl), 2001. 42(6): p. 803-4, 807-14.
82. Reynolds, J.C., et al., *Anti-murine antibody response to mouse monoclonal antibodies: clinical findings and implications*. Int J Rad Appl Instrum B, 1989. 16(2): p. 121-5.
83. Ober, R.J., et al., *Differences in promiscuity for antibody-FcRn interactions across species: implications for therapeutic antibodies*. Int Immunol, 2001. 13(12): p. 1551-9.
84. Presta, L.G., et al., *Engineering therapeutic antibodies for improved function*. Biochem Soc Trans, 2002. 30(4): p. 487-90.
85. Presta, L.G., *Molecular engineering and design of therapeutic antibodies*. Curr Opin Immunol, 2008. 20(4): p. 460-70.
86. Sears, H.F., et al., *Phase-I clinical trial of monoclonal antibody in treatment of gastrointestinal tumours*. Lancet, 1982. 1(8275): p. 762-5.
87. Sears, H.F., et al., *Effects of monoclonal antibody immunotherapy on patients with gastrointestinal adenocarcinoma*. J Biol Response Mod, 1984. 3(2): p. 138-50.

88. Herlyn, M., et al., *Colorectal carcinoma-specific antigen: detection by means of monoclonal antibodies*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1979. 76(3): p. 1438-42.
89. Riethmuller, 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(5): p. 1788-94.
90. Neye, H., *Monoklonale Antikörper: Ximab, Zumab und Umab als Arzneimittel*. Pharmazeutische Zeitung, 2006.
91. Gonzales, N.R., et al., *Minimizing the immunogenicity of antibodies for clinical application*. Tumour Biol, 2005. 26(1): p. 31-43.
92. Khazaeli, M.B., R.M. Conry, and A.F. LoBuglio, *Human immune response to monoclonal antibodies*. J Immunother Emphasis Tumor Immunol, 1994. 15(1): p. 42-52.
93. Strachan, T. and A.P. Read, *Gene therapy and other molecular genetic-based therapeutic approaches: Principles of molecular genetic-based approaches to treating disease*. New York; Human Molecular Genetics, 2nd edition, 1999(22.1.1).
94. LoBuglio, A.F., et al., *Mouse/human chimeric monoclonal antibody in man: kinetics and immune response*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1989. 86(11): p. 4220-4.
95. Winter, G. and W.J. Harris, *Humanized antibodies*. Immunol Today, 1993. 14(6): p. 243-6.
96. Suntharalingam, G., et al., *Cytokine storm in a phase 1 trial of the anti-CD28 monoclonal antibody TGN1412*. N Engl J Med, 2006. 355(10): p. 1018-28.
97. Steinitz, M., et al., *EB virus-induced B lymphocyte cell lines producing specific antibody*. Nature, 1977. 269(5627): p. 420-2.
98. Olsson, L. and H.S. Kaplan, *Human-human hybridomas producing monoclonal antibodies of predefined antigenic specificity*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1980. 77(9): p. 5429-31.
99. Pfaff, M., et al., *Human monoclonal antibody against a tissue polypeptide antigen-related protein from a patient with a signet-ring cell carcinoma of the stomach*. Cancer Res, 1990. 50(16): p. 5192-8.
100. Schlom, J., D. Wunderlich, and Y.A. Teramoto, *Generation of human monoclonal antibodies reactive with human mammary carcinoma cells*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1980. 77(11): p. 6841-5.

101. Glassy, M.C., *Immortalization of human lymphocytes from a tumor-involved lymph node*. *Cancer Res*, 1987. 47(19): p. 5181-8.
102. Glassy, M.C. and R.O. Dillman, *Molecular biotherapy with human monoclonal antibodies*. *Mol Biother*, 1988. 1(1): p. 7-13.
103. Vollmers, H.P., et al., *Human monoclonal antibodies from stomach carcinoma patients react with Helicobacter pylori and stimulate stomach cancer cells in vitro*. *Cancer*, 1994. 74(5): p. 1525-32.
104. Brandlein, S., 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(9): p. 2052-61.
105. Brandlein, S., et al., *Human monoclonal IgM antibodies with apoptotic activity isolated from cancer patients*. *Hum Antibodies*, 2002. 11(4): p. 107-19.
106. Faller, G., et al., *HAB-1, a new heteromyeloma for continuous production of human monoclonal antibodies*. *Br J Cancer*, 1990. 62(4): p. 595-8.
107. Smith, G.P., *Filamentous fusion phage: novel expression vectors that display cloned antigens on the virion surface*. *Science*, 1985. 228(4705): p. 1315-7.
108. McCafferty, J., et al., *Phage antibodies: filamentous phage displaying antibody variable domains*. *Nature*, 1990. 348(6301): p. 552-4.
109. Marks, J.D., et al., *By-passing immunization. Human antibodies from V-gene libraries displayed on phage*. *J Mol Biol*, 1991. 222(3): p. 581-97.
110. Hoogenboom, H.R., *Selecting and screening recombinant antibody libraries*. *Nat Biotechnol*, 2005. 23(9): p. 1105-16.
111. Griffiths, A.D. and A.R. Duncan, *Strategies for selection of antibodies by phage display*. *Curr Opin Biotechnol*, 1998. 9(1): p. 102-8.
112. Vaughan, T.J., J.K. Osbourn, and P.R. Tempest, *Human antibodies by design*. *Nat Biotechnol*, 1998. 16(6): p. 535-9.
113. Tomizuka, K., et al., *Double trans-chromosomic mice: maintenance of two individual human chromosome fragments containing Ig heavy and kappa loci and expression of fully human antibodies*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2000. 97(2): p. 722-7.
114. Bruggemann, M. and M.S. Neuberger, *Strategies for expressing human antibody repertoires in transgenic mice*. *Immunol Today*, 1996. 17(8): p. 391-7.



115. Davis, C.G., M.L. Gallo, and J.R. Corvalan, *Transgenic mice as a source of fully human antibodies for the treatment of cancer*. *Cancer Metastasis Rev*, 1999. 18(4): p. 421-5.
116. Green, L.L., *Antibody engineering via genetic engineering of the mouse: XenoMouse strains are a vehicle for the facile generation of therapeutic human monoclonal antibodies*. *J Immunol Methods*, 1999. 231(1-2): p. 11-23.
117. Yang, X.D., et al., *Development of ABX-EGF, a fully human anti-EGF receptor monoclonal antibody, for cancer therapy*. *Crit Rev Oncol Hematol*, 2001. 38(1): p. 17-23.
118. Hensel, F., 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(11): p. 1553-63.
119. Yachi, A., K. Imai, and T. Higashide, *[Development of monoclonal antibodies to human tumor markers]*. *Gan To Kagaku Ryoho*, 1983. 10(8): p. 1774-80.
120. Reichert, J.M. and V.E. Valge-Archer, *Development trends for monoclonal antibody cancer therapeutics*. *Nat Rev Drug Discov*, 2007. 6(5): p. 349-56.
121. Zhou, F.L., et al., *Serological identification and bioinformatics analysis of immunogenic antigens in multiple myeloma*. *Cancer Immunol Immunother*, 2006. 55(8): p. 910-7.
122. Rauschert, N., et al., *A new tumor-specific variant of GRP78 as target for antibody-based therapy*. *Lab Invest*, 2008. 88(4): p. 375-86.
123. Schatz, N., et al., *Diagnostic and therapeutic potential of a human antibody cloned from a cancer patient that binds to a tumor-specific variant of transcription factor TAF15*. *Cancer Res*, 2010. 70(1): p. 398-408.
124. Vollmers, H.P., et al., *Differential expression of apoptosis receptors on diffuse and intestinal type stomach carcinoma*. *Cancer*, 1997. 79(3): p. 433-40.
125. Vollmers, H.P. and S. Brandlein, *Nature's best weapons to fight cancer. Revival of human monoclonal IgM antibodies*. *Hum Antibodies*, 2002. 11(4): p. 131-42.
126. Vollmers, H.P., 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(3): p. 549-52.
127. Brandlein, S., et al., *PAM-1, a natural human IgM antibody as new tool for detection of breast and prostate precursors*. *Hum Antibodies*, 2004. 13(4): p. 97-104.

128. Brandlein, S., et al., *CFR-1 receptor as target for tumor-specific apoptosis induced by the natural human monoclonal antibody PAM-1*. *Oncol Rep*, 2004. 11(4): p. 777-84.
129. Hensel, F., et al., *A novel proliferation-associated variant of CFR-1 defined by a human monoclonal antibody*. *Lab Invest*, 2001. 81(8): p. 1097-108.
130. Illert, B., et al., *Human antibody SC-1 reduces disseminated tumor cells in nude mice with human gastric cancer*. *Oncol Rep*, 2005. 13(4): p. 765-70.
131. Hensel, F., et al., *Mitogenic autoantibodies in Helicobacter pylori-associated stomach cancerogenesis*. *Int J Cancer*, 1999. 81(2): p. 229-35.
132. Casali, P. and E.W. Schettino, *Structure and function of natural antibodies*. *Curr Top Microbiol Immunol*, 1996. 210: p. 167-79.
133. Avrameas, S., *Natural autoantibodies: from 'horror autotoxicus' to 'gnothi seauton'*. *Immunol Today*, 1991. 12(5): p. 154-9.
134. Coutinho, A., M.D. Kazatchkine, and S. Avrameas, *Natural autoantibodies*. *Curr Opin Immunol*, 1995. 7(6): p. 812-8.
135. Vollmers, H.P. and S. Brandlein, *Death by stress: natural IgM-induced apoptosis*. *Methods Find Exp Clin Pharmacol*, 2005. 27(3): p. 185-91.
136. Baumgarth, N., J.W. Tung, and L.A. Herzenberg, *Inherent specificities in natural antibodies: a key to immune defense against pathogen invasion*. *Springer Semin Immunopathol*, 2005. 26(4): p. 347-62.
137. Abastado, J.P., *Apoptosis: function and regulation of cell death*. *Res Immunol*, 1996. 147(7): p. 443-56.
138. Hensel, F., et al., *Characterization of glycosylphosphatidylinositol-linked molecule CD55/decay-accelerating factor as the receptor for antibody SC-1-induced apoptosis*. *Cancer Res*, 1999. 59(20): p. 5299-306.
139. Suriano, R., et al., *Differences in glycosylation patterns of heat shock protein, gp96: implications for prostate cancer prevention*. *Cancer Res*, 2005. 65(14): p. 6466-75.
140. Vollmers, H.P., et al., *Tumor-specific apoptosis induced by the human monoclonal antibody SC-1: a new therapeutical approach for stomach cancer*. *Oncol Rep*, 1998. 5(1): p. 35-40.
141. Vollmers, H.P., et al., *Apoptosis of stomach carcinoma cells induced by a human monoclonal antibody*. *Cancer*, 1995. 76(4): p. 550-8.

- 
142. Hermann, R., et al., *Deactivation of regulatory proteins hnRNP A1 and A2 during SC-1 induced apoptosis*. Hum Antibodies, 2001. 10(2): p. 83-90.
  143. Beutner, U., et al., *Neoadjuvant therapy of gastric cancer with the human monoclonal IgM antibody SC-1: impact on the immune system*. Oncol Rep, 2008. 19(3): p. 761-9.
  144. Vollmers, H.P., et al., *[Adjuvant immunotherapy of stomach carcinoma with antibody-induced apoptosis]*. Zentralbl Chir, 2000. 125 Suppl 1: p. 37-40.
  145. Timmermann, W., et al., *[Induction of apoptosis by preoperative passive immunotherapy in resectable stomach carcinoma]*. Kongressbd Dtsch Ges Chir Kongr, 2002. 119: p. 396-7.
  146. Siewert, J.R., et al., *Relevant prognostic factors in gastric cancer: ten-year results of the German Gastric Cancer Study*. Ann Surg, 1998. 228(4): p. 449-61.
  147. Burrus, L.W., et al., *Identification of a cysteine-rich receptor for fibroblast growth factors*. Mol Cell Biol, 1992. 12(12): p. 5600-9.
  148. Stieber, A., et al., *MG160, a membrane protein of the Golgi apparatus which is homologous to a fibroblast growth factor receptor and to a ligand for E-selectin, is found only in the Golgi apparatus and appears early in chicken embryo development*. Exp Cell Res, 1995. 219(2): p. 562-70.
  149. Steegmaier, M., et al., *The E-selectin-ligand ESL-1 is a variant of a receptor for fibroblast growth factor*. Nature, 1995. 373(6515): p. 615-20.
  150. Steegmaier, M., et al., *The E-selectin-ligand ESL-1 is located in the Golgi as well as on microvilli on the cell surface*. J Cell Sci, 1997. 110 ( Pt 6): p. 687-94.
  151. Yamaguchi, F., et al., *Identification of MG-160, a FGF binding medial Golgi sialoglycoprotein, in brain tumors: an index of malignancy in astrocytomas*. Int J Oncol, 2003. 22(5): p. 1045-9.
  152. Pohle, T., et al., *Lipoptosis: tumor-specific cell death by antibody-induced intracellular lipid accumulation*. Cancer Res, 2004. 64(11): p. 3900-6.
  153. Fu, Y. and A.S. Lee, *Glucose regulated proteins in cancer progression, drug resistance and immunotherapy*. Cancer Biol Ther, 2006. 5(7): p. 741-4.
  154. Li, J. and A.S. Lee, *Stress induction of GRP78/BiP and its role in cancer*. Curr Mol Med, 2006. 6(1): p. 45-54.
  155. Team, R.D.C., *A language and environment for statistical computing*. R Foundation for Statistical Computing, 2005. Vienna, Austria
-

156. Chazotte, B., *Labeling pinocytotic vesicles and cytoplasm with fluorescent dextrans or ficolls for imaging*. Cold Spring Harb Protoc, 2009. 2009(11): p. pdb prot4951.
157. Fissell, W.H., et al., *Size and conformation of Ficoll as determined by size-exclusion chromatography followed by multiangle light scattering*. Am J Physiol Renal Physiol, 2010. 298(1): p. F205-8.
158. English, D. and B.R. Andersen, *Single-step separation of red blood cells. Granulocytes and mononuclear leukocytes on discontinuous density gradients of Ficoll-Hypaque*. J Immunol Methods, 1974. 5(3): p. 249-52.
159. Zamore, P.D., et al., *RNAi: double-stranded RNA directs the ATP-dependent cleavage of mRNA at 21 to 23 nucleotide intervals*. Cell, 2000. 101(1): p. 25-33.
160. Peralta-Zaragoza, O., V.H. Bermudez-Morales, and V. Madrid-Marina, *[RNA interference: biogenesis molecular mechanisms and its applications in cervical cancer]*. Rev Invest Clin, 2010. 62(1): p. 63-80.
161. Elbashir, S.M., et al., *Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells*. Nature, 2001. 411(6836): p. 494-8.
162. Elbashir, S.M., W. Lendeckel, and T. Tuschl, *RNA interference is mediated by 21- and 22-nucleotide RNAs*. Genes Dev, 2001. 15(2): p. 188-200.
163. Mosmann, T., *Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays*. J Immunol Methods, 1983. 65(1-2): p. 55-63.
164. Denizot, F. and R. Lang, *Rapid colorimetric assay for cell growth and survival. Modifications to the tetrazolium dye procedure giving improved sensitivity and reliability*. J Immunol Methods, 1986. 89(2): p. 271-7.
165. Berridge, M.V. and A.S. Tan, *Characterization of the cellular reduction of 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT): subcellular localization, substrate dependence, and involvement of mitochondrial electron transport in MTT reduction*. Arch Biochem Biophys, 1993. 303(2): p. 474-82.
166. Berridge, M.V., Tan, A. S., McCoy, K. D. & Wang, R, *The Biochemical and Cellular Basis of Cell Proliferation Assays That Use Tetrazolium Salts*. Biochemica, 1996.
167. Smith, P.K., et al., *Measurement of protein using bicinchoninic acid*. Anal Biochem, 1985. 150(1): p. 76-85.

168. Slocum, T.L. and J.D. Deupree, *Interference of biogenic amines with the measurement of proteins using bicinchoninic acid*. Anal Biochem, 1991. 195(1): p. 14-7.
169. Wiechelman, K.J., R.D. Braun, and J.D. Fitzpatrick, *Investigation of the bicinchoninic acid protein assay: identification of the groups responsible for color formation*. Anal Biochem, 1988. 175(1): p. 231-7.
170. Laemmli, U.K., *Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4*. Nature, 1970. 227(5259): p. 680-5.
171. Sambrook, J., Fritsch, E. F., Maniatis, T., *Molecular cloning: a laboratory manual*. New York; Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.
172. Righetti, P.G., et al., *Quantitative proteomics: a review of different methodologies*. Eur J Mass Spectrom (Chichester, Eng), 2004. 10(3): p. 335-48.
173. Tugirimana, P.L. and J.R. Delanghe, *Development of an affordable dye-stained microalbuminuria screening test*. Nephrol Dial Transplant, 2009. 24(5): p. 1485-90.
174. Brockmoller, J. and R.M. Kamp, *Two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis of ribosomal proteins in the nanogram range*. Biol Chem Hoppe Seyler, 1985. 366(9): p. 901-6.
175. Towbin, H., T. Staehelin, and J. Gordon, *Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1979. 76(9): p. 4350-4.
176. Chomczynski, P. and N. Sacchi, *Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction*. Anal Biochem, 1987. 162(1): p. 156-9.
177. Davis, E.G., M.J. Wilkerson, and B.R. Rush, *Flow cytometry: clinical applications in equine medicine*. J Vet Intern Med, 2002. 16(4): p. 404-10.
178. Brandlein, S., et al., *The human IgM antibody SAM-6 induces tumor-specific apoptosis with oxidized low-density lipoprotein*. Mol Cancer Ther, 2007. 6(1): p. 326-33.
179. Taylor, R.C., S.P. Cullen, and S.J. Martin, *Apoptosis: controlled demolition at the cellular level*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2008. 9(3): p. 231-41.
180. Platis, D., et al., *Lock-and-key motif as a concept for designing affinity adsorbents for protein purification*. J Chromatogr A, 2006. 1128(1-2): p. 138-51.

181. Yumioka, R., et al., *Screening of effective column rinse solvent for Protein-A chromatography*. *Protein Expr Purif*, 2010. 70(2): p. 218-23.
182. Law, W.J., K.L. Cann, and G.G. Hicks, *TLS, EWS and TAF15: a model for transcriptional integration of gene expression*. *Brief Funct Genomic Proteomic*, 2006. 5(1): p. 8-14.
183. Andersson, M.K., et al., *The multifunctional FUS, EWS and TAF15 proto-oncoproteins show cell type-specific expression patterns and involvement in cell spreading and stress response*. *BMC Cell Biol*, 2008. 9: p. 37.
184. Attwooll, C., et al., *Identification of a novel fusion gene involving hTAFII68 and CHN from a t(9;17)(q22;q11.2) translocation in an extraskeletal myxoid chondrosarcoma*. *Oncogene*, 1999. 18(52): p. 7599-601.
185. Martini, A., et al., *Recurrent rearrangement of the Ewing's sarcoma gene, EWSR1, or its homologue, TAF15, with the transcription factor CIZ/NMP4 in acute leukemia*. *Cancer Res*, 2002. 62(19): p. 5408-12.
186. Riggi, N., et al., *Sarcomas: genetics, signalling, and cellular origins. Part 1: The fellowship of TET*. *J Pathol*, 2007. 213(1): p. 4-20.
187. Kobata, A., *A retrospective and prospective view of glycopathology*. *Glycoconj J*, 1998. 15(4): p. 323-31.
188. Yamaguchi, Y., et al., *Glycoform-dependent conformational alteration of the Fc region of human immunoglobulin G1 as revealed by NMR spectroscopy*. *Biochim Biophys Acta*, 2006. 1760(4): p. 693-700.
189. Krapp, S., et al., *Structural analysis of human IgG-Fc glycoforms reveals a correlation between glycosylation and structural integrity*. *J Mol Biol*, 2003. 325(5): p. 979-89.
190. Tan, S., H.T. Tan, and M.C. Chung, *Membrane proteins and membrane proteomics*. *Proteomics*, 2008. 8(19): p. 3924-32.
191. Vollmers, H.P. and W. Birchmeier, *Monoclonal antibodies inhibit the adhesion of mouse B 16 melanoma cells in vitro and block lung metastasis in vivo*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1983. 80(12): p. 3729-33.
192. Dunn, G.P., L.J. Old, and R.D. Schreiber, *The immunobiology of cancer immunosurveillance and immunoediting*. *Immunity*, 2004. 21(2): p. 137-48.
193. Moretta, L., et al., *Human NK cells and their receptors*. *Microbes Infect*, 2002. 4(15): p. 1539-44.

194. Heine, H. and E. Lien, *Toll-like receptors and their function in innate and adaptive immunity*. Int Arch Allergy Immunol, 2003. 130(3): p. 180-92.
195. Janeway, C.A., Jr., 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: p. 657-66.
196. Medzhitov, R. and C.A. Janeway, Jr., *How does the immune system distinguish self from nonself?* Semin Immunol, 2000. 12(3): p. 185-8; discussion 257-344.
197. Keler, T., V. Ramakrishna, and M.W. Fanger, *Mannose receptor-targeted vaccines*. Expert Opin Biol Ther, 2004. 4(12): p. 1953-62.
198. Harenberg, A., et al., *Gene profiling analysis of ALVAC infected human monocyte derived dendritic cells*. Vaccine, 2008. 26(39): p. 5004-13.
199. Areschoug, T. and S. Gordon, *Pattern recognition receptors and their role in innate immunity: focus on microbial protein ligands*. Contrib Microbiol, 2008. 15: p. 45-60.
200. Medzhitov, R. and C. Janeway, Jr., *The Toll receptor family and microbial recognition*. Trends Microbiol, 2000. 8(10): p. 452-6.
201. Blasius, A.L. and B. Beutler, *Intracellular toll-like receptors*. Immunity, 2010. 32(3): p. 305-15.
202. Beg, A.A., *Endogenous ligands of Toll-like receptors: implications for regulating inflammatory and immune responses*. Trends Immunol, 2002. 23(11): p. 509-12.
203. Chen, K., et al., *Toll-like receptors in inflammation, infection and cancer*. Int Immunopharmacol, 2007. 7(10): p. 1271-85.
204. Netea, M.G., et al., *Toll-like receptors and the host defense against microbial pathogens: bringing specificity to the innate-immune system*. J Leukoc Biol, 2004. 75(5): p. 749-55.
205. Beutler, B., *Innate immunity: an overview*. Mol Immunol, 2004. 40(12): p. 845-59.
206. Martin, F. and J.F. Kearney, *B1 cells: similarities and differences with other B cell subsets*. Curr Opin Immunol, 2001. 13(2): p. 195-201.
207. Marodi, L., *Innate cellular immune responses in newborns*. Clin Immunol, 2006. 118(2-3): p. 137-44.

208. Ollert, M.W., et al., *Normal human serum contains a natural IgM antibody cytotoxic for human neuroblastoma cells*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1996. 93(9): p. 4498-503.
209. Weihua, Z., et al., *Survival of cancer cells is maintained by EGFR independent of its kinase activity*. Cancer Cell, 2008. 13(5): p. 385-93.
210. Ochsenbein, A.F., et al., *Control of early viral and bacterial distribution and disease by natural antibodies*. Science, 1999. 286(5447): p. 2156-9.
211. Bohn, J., *Are natural antibodies involved in tumour defence?* Immunol Lett, 1999. 69(3): p. 317-20.
212. Dono, M., G. Cerruti, and S. Zupo, *The CD5+ B-cell*. Int J Biochem Cell Biol, 2004. 36(11): p. 2105-11.
213. Vollmers, H.P. and S. Brandlein, *Tumors: too sweet to remember?* Mol Cancer, 2007. 6: p. 78.
214. Boes, M., *Role of natural and immune IgM antibodies in immune responses*. Mol Immunol, 2000. 37(18): p. 1141-9.
215. Tonegawa, S., *Somatic generation of immune diversity*. Biosci Rep, 1988. 8(1): p. 3-26.
216. Delves, P.J., et al., *Roitt's Essential Immunology*. Blackwell Publishing, 2006. 11th edn.
217. Schroeder, H.W., Jr. and L. Cavacini, *Structure and function of immunoglobulins*. J Allergy Clin Immunol, 2010. 125(2 Suppl 2): p. S41-52.
218. Lucas, A.H., *Immunoglobulin Gene Construction: Human*. Encyclopedia of Life Sciences, 2003.
219. Roux, K.H., L. Strelets, and T.E. Michaelsen, *Flexibility of human IgG subclasses*. J Immunol, 1997. 159(7): p. 3372-82.
220. Hudson, P.J. and C. Souriau, *Recombinant antibodies for cancer diagnosis and therapy*. Expert Opin Biol Ther, 2001. 1(5): p. 845-55.
221. Brooks, D.G., et al., *Structure and expression of human IgG FcRII(CD32). Functional heterogeneity is encoded by the alternatively spliced products of multiple genes*. J Exp Med, 1989. 170(4): p. 1369-85.
222. Woof, J.M. and J. Mestecky, *Mucosal immunoglobulins*. Immunol Rev, 2005. 206: p. 64-82.



223. Chen, K., et al., *Immunoglobulin D enhances immune surveillance by activating antimicrobial, proinflammatory and B cell-stimulating programs in basophils*. Nat Immunol, 2009. 10(8): p. 889-98.
224. Geisberger, R., M. Lamers, and G. Achatz, *The riddle of the dual expression of IgM and IgD*. Immunology, 2006. 118(4): p. 429-37.
225. Lux, A., et al., *The pro and anti-inflammatory activities of immunoglobulin G*. Ann Rheum Dis, 2010. 69 Suppl 1: p. i92-96.
226. Babai, B., et al., *Depletion of peritoneal CD5+ B cells has no effect on the course of Leishmania major infection in susceptible and resistant mice*. Clin Exp Immunol, 1999. 117(1): p. 123-9.
227. Mix, E., R. Goertsches, and U.K. Zett, *Immunoglobulins--basic considerations*. J Neurol, 2006. 253 Suppl 5: p. V9-17.
228. Casali, P. and A.L. Notkins, *CD5+ B lymphocytes, polyreactive antibodies and the human B-cell repertoire*. Immunol Today, 1989. 10(11): p. 364-8.
229. White, O.J., et al., *Th2-polarisation of cellular immune memory to neonatal pertussis vaccination*. Vaccine, 2010. 28(14): p. 2648-52.
230. Wrammert, J., et al., *Rapid cloning of high-affinity human monoclonal antibodies against influenza virus*. Nature, 2008. 453(7195): p. 667-71.
231. Hendriks, L.H., et al., *IgG responses after booster vaccination with different pertussis vaccines in Dutch children 4 years of age: effect of vaccine antigen content*. Vaccine, 2009. 27(47): p. 6530-6.
232. Forster, I., H. Gu, and K. Rajewsky, *Germline antibody V regions as determinants of clonal persistence and malignant growth in the B cell compartment*. EMBO J, 1988. 7(12): p. 3693-703.
233. Hayakawa, K., et al., *The "Ly-1 B" cell subpopulation in normal immunodeficient, and autoimmune mice*. J Exp Med, 1983. 157(1): p. 202-18.
234. Afeltra, A., et al., *[CD5 positive b-lymphocytes in autoimmunity: possible role in Graves' disease]*. Riv Eur Sci Med Farmacol, 1995. 17(5): p. 167-74.
235. Brezinschek, H.P., R.I. Brezinschek, and P.E. Lipsky, *Analysis of the heavy chain repertoire of human peripheral B cells using single-cell polymerase chain reaction*. J Immunol, 1995. 155(1): p. 190-202.
236. Newkirk, M.M. and J.D. Rioux, *Immunoglobulin gene usage in the human anti-pathogen response*. Infect Agents Dis, 1995. 4(3): p. 153-60.

237. Adderson, E.E., et al., *Restricted Ig H chain V gene usage in the human antibody response to Haemophilus influenzae type b capsular polysaccharide*. J Immunol, 1991. 147(5): p. 1667-74.
238. Silverman, G.J. and A.H. Lucas, *Variable region diversity in human circulating antibodies specific for the capsular polysaccharide of Haemophilus influenzae type b. Preferential usage of two types of VH3 heavy chains*. J Clin Invest, 1991. 88(3): p. 911-20.
239. Huang, D.F., et al., *Sequence analyses of three immunoglobulin G anti-virus antibodies reveal their utilization of autoantibody-related immunoglobulin Vh genes, but not V lambda genes*. J Clin Invest, 1992. 90(6): p. 2197-208.
240. Ermel, R.W., et al., *Preferential utilization of a novel V lambda 3 gene in monoclonal rheumatoid factors derived from the synovial cells of rheumatoid arthritis patients*. Arthritis Rheum, 1994. 37(6): p. 860-8.
241. Spatz, L.A., et al., *Cloning and sequence analysis of the VH and VL regions of an anti-myelin/DNA antibody from a patient with peripheral neuropathy and chronic lymphocytic leukemia*. J Immunol, 1990. 144(7): p. 2821-8.
242. Osman, N., et al., *Combined transgenic expression of alpha-galactosidase and alpha1,2-fucosyltransferase leads to optimal reduction in the major xenoepitope Galalpha(1,3)Gal*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1997. 94(26): p. 14677-82.
243. Deriy, L., et al., *In vivo targeting of vaccinating tumor cells to antigen-presenting cells by a gene therapy method with adenovirus containing the alpha1,3galactosyltransferase gene*. Cancer Gene Ther, 2005. 12(6): p. 528-39.
244. Parker, W., et al., *Naturally occurring anti-alpha-galactosyl antibodies: relationship to xenoreactive anti-alpha-galactosyl antibodies*. Glycobiology, 1999. 9(9): p. 865-73.
245. Bertolotti, A., et al., *hTAF(II)68, a novel RNA/ssDNA-binding protein with homology to the pro-oncoproteins TLS/FUS and EWS is associated with both TFIID and RNA polymerase II*. Embo J, 1996. 15(18): p. 5022-31.
246. Stolow, D.T. and S.R. Haynes, *Cabeza, a Drosophila gene encoding a novel RNA binding protein, shares homology with EWS and TLS, two genes involved in human sarcoma formation*. Nucleic Acids Res, 1995. 23(5): p. 835-43.
247. Immanuel, D., H. Zinszner, and D. Ron, *Association of SARFH (sarcoma-associated RNA-binding fly homolog) with regions of chromatin transcribed by RNA polymerase II*. Mol Cell Biol, 1995. 15(8): p. 4562-71.

248. Morohoshi, F., et al., *Genomic structure of the human RBP56/hTAFII68 and FUS/TLS genes*. *Gene*, 1998. 221(2): p. 191-8.
249. Corveleyn, A., et al., *Cellular transformation of NIH3T3 fibroblasts by CIZ/NMP4 fusions*. *J Cell Biochem*, 2005. 94(6): p. 1112-25.
250. Tan, A.Y. and J.L. Manley, *The TET family of proteins: functions and roles in disease*. *J Mol Cell Biol*, 2009. 1(2): p. 82-92.
251. Burd, C.G. and G. Dreyfuss, *Conserved structures and diversity of functions of RNA-binding proteins*. *Science*, 1994. 265(5172): p. 615-21.
252. Jobert, L., M. Argentini, and L. Tora, *PRMT1 mediated methylation of TAF15 is required for its positive gene regulatory function*. *Exp Cell Res*, 2009. 315(7): p. 1273-86.
253. Lee, H.J., et al., *Stimulation of hTAFII68 (NTD)-mediated transactivation by v-Src*. *FEBS Lett*, 2004. 564(1-2): p. 188-98.
254. Jobert, L., et al., *Human U1 snRNA forms a new chromatin-associated snRNP with TAF15*. *EMBO Rep*, 2009. 10(5): p. 494-500.
255. Romac, J.M. and J.D. Keene, *Overexpression of the arginine-rich carboxy-terminal region of U1 snRNP 70K inhibits both splicing and nucleocytoplasmic transport of mRNA*. *Genes Dev*, 1995. 9(11): p. 1400-10.
256. Zinszner, H., et al., *TLS (FUS) binds RNA in vivo and engages in nucleocytoplasmic shuttling*. *J Cell Sci*, 1997. 110 ( Pt 15): p. 1741-50.
257. Belyanskaya, L.L., P.M. Gehrig, and H. Gehring, *Exposure on cell surface and extensive arginine methylation of ewing sarcoma (EWS) protein*. *J Biol Chem*, 2001. 276(22): p. 18681-7.
258. Belyanskaya, L.L., O. Delattre, and H. Gehring, *Expression and subcellular localization of Ewing sarcoma (EWS) protein is affected by the methylation process*. *Exp Cell Res*, 2003. 288(2): p. 374-81.
259. Lee, H.W., S. Kim, and W.K. Paik, *S-adenosylmethionine: protein-arginine methyltransferase. Purification and mechanism of the enzyme*. *Biochemistry*, 1977. 16(1): p. 78-85.
260. Srivastava, M. and H.B. Pollard, *Molecular dissection of nucleolin's role in growth and cell proliferation: new insights*. *Faseb J*, 1999. 13(14): p. 1911-22.
261. Kotb, M. and A.M. Geller, *Methionine adenosyltransferase: structure and function*. *Pharmacol Ther*, 1993. 59(2): p. 125-43.

262. Sjogren, H., et al., *Fusion of the EWS-related gene TAF2N to TEC in extraskeletal myxoid chondrosarcoma*. *Cancer Res*, 1999. 59(20): p. 5064-7.
263. Hisaoka, M., et al., *TFG is a novel fusion partner of NOR1 in extraskeletal myxoid chondrosarcoma*. *Genes Chromosomes Cancer*, 2004. 40(4): p. 325-8.
264. Panagopoulos, I., et al., *Fusion of the RBP56 and CHN genes in extraskeletal myxoid chondrosarcomas with translocation t(9;17)(q22;q11)*. *Oncogene*, 1999. 18(52): p. 7594-8.
265. Rabbitts, T.H., *Chromosomal translocations in human cancer*. *Nature*, 1994. 372(6502): p. 143-9.
266. Rabbitts, T.H. and M.R. Stocks, *Chromosomal translocation products engender new intracellular therapeutic technologies*. *Nat Med*, 2003. 9(4): p. 383-6.
267. Sawyers, C.L., *The bcr-abl gene in chronic myelogenous leukaemia*. *Cancer Surv*, 1992. 15: p. 37-51.
268. O'Dwyer, M.E., M.J. Mauro, and B.J. Druker, *STI571 as a targeted therapy for CML*. *Cancer Invest*, 2003. 21(3): p. 429-38.
269. Zucman, J., et al., *Combinatorial generation of variable fusion proteins in the Ewing family of tumours*. *Embo J*, 1993. 12(12): p. 4481-7.
270. Bonin, G., et al., *Chimeric EWS-FLI1 transcript in a Ewing cell line with a complex t(11;22;14) translocation*. *Cancer Res*, 1993. 53(16): p. 3655-7.
271. Delattre, O., et al., *Gene fusion with an ETS DNA-binding domain caused by chromosome translocation in human tumours*. *Nature*, 1992. 359(6391): p. 162-5.
272. Sorensen, P.H., et al., *A second Ewing's sarcoma translocation, t(21;22), fuses the EWS gene to another ETS-family transcription factor, ERG*. *Nat Genet*, 1994. 6(2): p. 146-51.
273. Zucman, J., et al., *EWS and ATF-1 gene fusion induced by t(12;22) translocation in malignant melanoma of soft parts*. *Nat Genet*, 1993. 4(4): p. 341-5.
274. Rauscher, F.J., 3rd, et al., *Novel oncogenic mutations in the WT1 Wilms' tumor suppressor gene: a t(11;22) fuses the Ewing's sarcoma gene, EWS1, to WT1 in desmoplastic small round cell tumor*. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*, 1994. 59: p. 137-46.

275. Karnieli, E., et al., *The IGF-I receptor gene promoter is a molecular target for the Ewing's sarcoma-Wilms' tumor 1 fusion protein*. J Biol Chem, 1996. 271(32): p. 19304-9.
276. Brown, A.D., et al., *Promoters containing ATF-binding sites are de-regulated in cells that express the EWS/ATF1 oncogene*. Oncogene, 1995. 10(9): p. 1749-56.
277. Ohno, T., V.N. Rao, and E.S. Reddy, *EWS/Fli-1 chimeric protein is a transcriptional activator*. Cancer Res, 1993. 53(24): p. 5859-63.
278. Bailly, R.A., et al., *DNA-binding and transcriptional activation properties of the EWS-FLI-1 fusion protein resulting from the t(11;22) translocation in Ewing sarcoma*. Mol Cell Biol, 1994. 14(5): p. 3230-41.
279. May, W.A., et al., *The Ewing's sarcoma EWS/FLI-1 fusion gene encodes a more potent transcriptional activator and is a more powerful transforming gene than FLI-1*. Mol Cell Biol, 1993. 13(12): p. 7393-8.
280. Morohoshi, F., et al., *Cloning and mapping of a human RBP56 gene encoding a putative RNA binding protein similar to FUS/TLS and EWS proteins*. Genomics, 1996. 38(1): p. 51-7.
281. Mao, X., et al., *The FLI-1 and chimeric EWS-FLI-1 oncoproteins display similar DNA binding specificities*. J Biol Chem, 1994. 269(27): p. 18216-22.
282. Janknecht, R., *EWS-ETS oncoproteins: the linchpins of Ewing tumors*. Gene, 2005. 363: p. 1-14.
283. Chang, F., et al., *Signal transduction mediated by the Ras/Raf/MEK/ERK pathway from cytokine receptors to transcription factors: potential targeting for therapeutic intervention*. Leukemia, 2003. 17(7): p. 1263-93.
284. Roberts, A.B., et al., *Smad3: a key player in pathogenetic mechanisms dependent on TGF-beta*. Ann N Y Acad Sci, 2003. 995: p. 1-10.
285. Hasskarl, J., D.S. Mern, and K. Munger, *Interference of the dominant negative helix-loop-helix protein ID1 with the proteasomal subunit S5A causes centrosomal abnormalities*. Oncogene, 2008. 27(12): p. 1657-64.
286. Yu, X., et al., *Inhibitor of DNA binding-1 overexpression in prostate cancer: relevance to tumor differentiation*. Pathol Oncol Res, 2009. 15(1): p. 91-6.
287. Kohrt, D.M., et al., *Distinct subcellular distribution of cyclin dependent kinase 6*. Cell Cycle, 2009. 8(17): p. 2837-43.

288. Lim, J.T., M. Mansukhani, and I.B. Weinstein, *Cyclin-dependent kinase 6 associates with the androgen receptor and enhances its transcriptional activity in prostate cancer cells*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2005. 102(14): p. 5156-61.
289. Kim, S., J. Lee, and J. Kim, *Regulation of oncogenic transcription factor hTAF(II)68-TEC activity by human glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH)*. Biochem J, 2007. 404(2): p. 197-206.
290. Anderson, P. and N. Kedersha, *Stressful initiations*. J Cell Sci, 2002. 115(Pt 16): p. 3227-34.
291. Anderson, P. and N. Kedersha, *RNA granules*. J Cell Biol, 2006. 172(6): p. 803-8.
292. Feldman, D.E., V. Chauhan, and A.C. Koong, *The unfolded protein response: a novel component of the hypoxic stress response in tumors*. Mol Cancer Res, 2005. 3(11): p. 597-605.
293. Desharnais, P., et al., *Involvement of CD45 in DNA fragmentation in apoptosis induced by mitochondrial perturbing agents*. Apoptosis, 2008. 13(2): p. 197-212.
294. Ledgerwood, E.C. and I.M. Morison, *Targeting the apoptosome for cancer therapy*. Clin Cancer Res, 2009. 15(2): p. 420-4.
295. Barinaga, M., *Death by dozens of cuts*. Science, 1998. 280(5360): p. 32-4.
296. Afonso, L., et al., *Interactions with apoptotic but not with necrotic neutrophils increase parasite burden in human macrophages infected with Leishmania amazonensis*. J Leukoc Biol, 2008. 84(2): p. 389-96.
297. Pugazhenthii, S., et al., *Simian varicella virus induces apoptosis in monkey kidney cells by the intrinsic pathway and involves downregulation of bcl-2 expression*. J Virol, 2009. 83(18): p. 9273-82.
298. Pericolini, E., et al., *Involvement of glycoreceptors in galactoxylomannan-induced T cell death*. J Immunol, 2009. 182(10): p. 6003-10.
299. Yi, H., et al., *Inhibition of apoptosis by normal and aberrant Fli-1 and erg proteins involved in human solid tumors and leukemias*. Oncogene, 1997. 14(11): p. 1259-68.
300. Alves, J., et al., *TAF15 and the leukemia-associated fusion protein TAF15-CIZ/NMP4 are cleaved by caspases-3 and -7*. Biochem Biophys Res Commun, 2009. 384(4): p. 495-500.

301. Fuentes-Prior, P. and G.S. Salvesen, *The protein structures that shape caspase activity, specificity, activation and inhibition*. *Biochem J*, 2004. 384(Pt 2): p. 201-32.
302. Krippner-Heidenreich, A., et al., *Targeting of the transcription factor Max during apoptosis: phosphorylation-regulated cleavage by caspase-5 at an unusual glutamic acid residue in position P1*. *Biochem J*, 2001. 358(Pt 3): p. 705-15.
303. Clark, E.A., et al., *Genomic analysis of metastasis reveals an essential role for RhoC*. *Nature*, 2000. 406(6795): p. 532-5.
304. Fidler, I.J. and M.L. Kripke, *Metastasis results from preexisting variant cells within a malignant tumor*. *Science*, 1977. 197(4306): p. 893-5.
305. Hart, I.R. and I.J. Fidler, *Cancer invasion and metastasis*. *Q Rev Biol*, 1980. 55(2): p. 121-42.
306. Leth-Larsen, R., et al., *Metastasis-related plasma membrane proteins of human breast cancer cells identified by comparative quantitative mass spectrometry*. *Mol Cell Proteomics*, 2009. 8(6): p. 1436-49.
307. de Hoog, C.L., L.J. Foster, and M. Mann, *RNA and RNA binding proteins participate in early stages of cell spreading through spreading initiation centers*. *Cell*, 2004. 117(5): p. 649-62.
308. Husi, H., et al., *Proteomic analysis of NMDA receptor-adhesion protein signaling complexes*. *Nat Neurosci*, 2000. 3(7): p. 661-9.
309. Frame, M.C., et al., *v-Src's hold over actin and cell adhesions*. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2002. 3(4): p. 233-45.
310. Pleasance, E.D., et al., *A comprehensive catalogue of somatic mutations from a human cancer genome*. *Nature*, 2010. 463(7278): p. 191-6.
311. Emerit, I., *Reactive oxygen species, chromosome mutation, and cancer: possible role of clastogenic factors in carcinogenesis*. *Free Radic Biol Med*, 1994. 16(1): p. 99-109.
312. Kiss, T., *Small nucleolar RNA-guided post-transcriptional modification of cellular RNAs*. *EMBO J*, 2001. 20(14): p. 3617-22.
313. Nelson, A.L., E. Dhimolea, and J.M. Reichert, *Development trends for human monoclonal antibody therapeutics*. *Nat Rev Drug Discov*, 2010.
314. Ramadori, G., S. Cameron, and B. Tschechne, *Long-Lasting Tumor Response in Patients with Panitumumab Monotherapy for Chemorefractory Metastatic*
-

*Colorectal Carcinoma - A Report of Two Cases.* Case Rep Oncol, 2010. 3(2):  
p. 154-159.



## Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei all denen ganz herzlich bedanken, die mich während der Anfertigung dieser Arbeit begleitet und unterstützt haben.

Herrn Prof. Dr. H. P. Vollmers danke ich für die äußerst interessante Themenstellung meiner Dissertation und die Betreuung während meiner Arbeit. Besonders bedanken möchte ich mich für die guten Arbeitsbedingungen im Labor, sein entgegengebrachtes Vertrauen sowie die Freiheiten, die er mir bei der Umsetzung der Arbeit ließ.

Herrn Prof. Dr. H. K. Müller-Hermelink und Herrn Prof. Dr. A. Rosenwald, Pathologisches Institut, danke ich für die Möglichkeit meine Arbeit an Ihrem Institut anzufertigen. Herrn Prof. Dr. Rosenwald danke ich außerdem für die Übernahme der Betreuung meiner Arbeit nach dem Ableben von Herrn Prof. Dr. Vollmers.

Herrn Prof. Dr. U. Fischer, Lehrstuhl für Biochemie, danke ich sehr für die Vertretung meiner Arbeit vor dem Fachbereich Chemie und Pharmazie.

Des weiteren danke ich der Fa. Patrys für die finanzielle Unterstützung meiner Arbeit. Ich danke besonders Dr. Frank Hensel für die Zusammenarbeit, sowie Dr. Arndt-René Kelter, der mich durch fachliche Diskussionen und Anregungen im Bereich der Molekularbiologie unterstützt hat.

Ganz besonders bedanken möchte ich mich auch bei Dr. Stephanie Brändlein für die geduldige Betreuung während meiner Arbeit und die sehr interessanten wissenschaftlichen Diskussionen. Ihre Tipps und Anregungen fachlicher oder privater Natur waren dabei stets hilfreich. Durch ihre offene Art trug sie maßgeblich zu dem tollen, freundschaftlichen Arbeitsklima innerhalb der Arbeitsgruppe bei. Vielen Dank für deine Unterstützung !

Ein riesiger Dank geht natürlich auch an alle anderen Mitglieder der Arbeitsgruppe. Meiner Vorgängerin, Dr. Nicole Rauschert, danke ich für die tolle Einführung in die Arbeitsmethoden. Miriam Eckstein, Kerstin Schragner, Nadine Gutermuth, Caroline

Gosa-Hock, sowie Tanja Grimmig und Annette Huber danke ich sehr für die super Unterstützung und die freundschaftliche Atmosphäre im Labor sowie ihre stete Hilfsbereitschaft in allen Lebenslagen. Vielen lieben Dank Mädels, auch für die vielen, lustigen Escobar-, Biergarten-, oder Laby-Abende, sowie die zahlreichen Diskussionen über die schönen bzw. interessanten Dinge im Leben!!! Ich werde den Laboralltag mit euch sehr vermissen!

Vielen Dank auch an Tina Grieb für ihre tatkräftige Unterstützung bei den molekularbiologischen Methoden. Ihr und Jacqueline Maar danke ich auch für viele lustige und unterhaltsame Mittagspausen.

Außerdem möchte ich mich ganz herzlich bei der Arbeitsgruppe Serfling, insbesondere bei Martin Väth und Thomas Benkert für die vielen wissenschaftlichen Ratschläge und Anregungen bei übergreifenden Fragestellungen bedanken. Martin Väth danke ich außerdem für die tatkräftige Einführung und Unterstützung am Konfokalmikroskop.

Des Weiteren möchte ich mich bei Gerhard Walter sowie bei allen anderen Mitarbeitern des Pathologischen Instituts für ihre Kollegialität und das angenehme Arbeitsklima danken.

Meiner ganzen Familie, insbesondere meinen Eltern und meiner Schwester Isabell, möchte ich für ihre Liebe sowie die unermüdliche und tatkräftige Unterstützung in allen Lebenslagen danken. Vielen Dank, dass ihr immer für mich da seid und mich in all meinen Vorhaben unterstützt!

Zuletzt möchte ich Florian Staub, für seine Liebe, seine unermüdliche Geduld und sein Verständnis danken, durch die er mich während der Entstehung dieser Arbeit sehr unterstützt hat. Danke für deine Kraft und den Rückhalt, den du mir gegeben hast! Ich bin sehr froh einen so wundervollen Menschen an meiner Seite zu haben!!!