

**Tumorimmunität:
Spezifität, Genetik und Funktion
natürlicher IgM-Antikörper**

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

vorgelegt von
Stephanie Brändlein

aus
Werneck

Würzburg 2003

Eingereicht am:.....

Mitglieder der Promotionskommission:

Vorsitzender: Prof. Dr. R. Hedrich

Gutachter: Prof. Dr. H. P. Vollmers

Gutachter: Prof. Dr. E. Buchner

Tag des Promotionskolloquiums:.....

Doktorurkunde ausgehändigt am:.....

meiner Familie

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung	1
1.1 Immunität.....	1
1.2 Transformation.....	2
1.3 Therapeutische Antikörper.....	6
1.3.1 Murine Antikörper.....	9
1.3.2 Humanisierte Antikörper.....	11
1.3.3 Humane Antikörper.....	15
1.4 Humane Hybridoma Technologie.....	18
1.5 Antikörper SC-1.....	20
1.6 Antikörper PAM-1.....	23
1.7 Ziel der Arbeit.....	25
2 Material und Methoden	27
2.1 Materialien.....	27
2.1.1 Bezugsquellen der verwendeten Verbrauchsmittel.....	27
2.1.2 Geräte.....	29
2.1.3 Soft- und Hardware.....	29
2.1.4 Medien, Lösungen, Puffer.....	30
2.1.5 Bakterienstamm.....	34
2.1.6 Zelllinien.....	34
2.1.7 Mäuse.....	36
2.1.8 Patientenmaterial.....	36
2.2 Zellkultur und bakteriologische Methoden.....	36
2.2.1 Kultivierung der Bakterien.....	36
2.2.2 Kultivierung von Karzinomzelllinien und Hybridomen.....	37
2.2.3 Kryokonservierung eukaryotischer Zellen.....	38
2.2.4 Auftauen eukaryotischer Zellen.....	38
2.2.5 Zellzahlbestimmung.....	38
2.2.6 Herstellung humaner monoklonaler Antikörper durch somatische Hybridisierung.....	39
2.2.6.1 Gewinnung von Lymphozyten aus Patientenmaterial.....	39

2.2.6.2 Somatische Hybridisierung.....	40
2.2.6.3 Reklonierung der Antikörper-produzierenden Hybridome.....	41
2.2.7 MTT-Proliferationstest	41
2.2.8 Apoptose-Test (Cell Death Detection ELISA ^{PLUS} , Roche, Mannheim)	42
2.3 Immunhistochemische Methoden	44
2.3.1 Antikörper-ELISA	44
2.3.2 Herstellung von Kryo-Schnitten	45
2.3.3 Herstellung von Zytospin-Präparaten	46
2.3.4 Herstellung von Paraffin-Schnitten	46
2.3.5 Immunperoxidase-Färbung von Kryoschnitten und Zytospin- Präparaten	46
2.3.6 Immunperoxidase-Färbung von Paraffinschnitten mit den Antikörpern PAM-1 und LM-1	48
2.3.7 Immunperoxidase-Färbung von Paraffinschnitten mit den Antikörpern PM-1, PM-2, CM-1 und CM-2	49
2.3.8 Verwendete Antikörper für Immunperoxidase-Färbungen	49
2.3.9 Enzymatischer Verdau von Proteinen auf Zytospins.....	51
2.3.9.1 Verdau mit N-Glykosidase	51
2.3.9.2 Verdau mit O-Glykosidase	52
2.3.10 Durchflusszytometrie (FACS-Analyse).....	52
2.3.10.1 Vorbereitung der Zellen.....	52
2.3.10.2 FACS-Messung	53
2.4 Biochemische Methoden	54
2.4.1 Präparation von Membranproteinen aus Zelllinien	54
2.4.2 Proteinbestimmung.....	54
2.4.2.1 Quantifizierung nach Bradford	55
2.4.2.2 Quantifizierung mittels BCA-Assay.....	55
2.4.3 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	55
2.4.4 Coomassie-Färbung	56
2.4.5 Western-Blotting	56
2.4.6 Immunodetektion.....	57
2.4.7 Enzymatischer Verdau von Membranprotein-Extrakten mit N-Glykosidase und nachfolgende Western-Blot Analyse.....	57
2.4.8 Antikörperreinigung über FPLC.....	58

2.5 Molekularbiologische Methoden.....	59
2.5.1 RNA-Isolierung aus Geweben.....	59
2.5.2 RNA-Isolierung aus Tumorzelllinien.....	59
2.5.3 Konzentrationsbestimmung von RNA.....	60
2.5.4 Reverse Transkription von mRNA in cDNA.....	60
2.5.5 Polymerasekettenreaktion (PCR).....	61
2.5.6 GAPDH-PCR zur Qualitätskontrolle der cDNA-Synthese und zur Quantifizierung der cDNA-Menge.....	62
2.5.7 Primer-Sequenzen.....	62
2.5.8 Agarose-Gelelektrophorese.....	63
2.5.9 Aufreinigung der PCR-Produkte für die Klonierung.....	64
2.5.10 Auffüllen der 3'-Überhänge doppelsträngiger DNA aus der PCR.....	64
2.5.11 Klonierung von PCR-Produkten in den pCR-Script Klonierungsvektor.....	64
2.5.12 Transformation kompetenter Bakterien.....	65
2.5.13 Mini-Plasmid-Isolierung.....	65
2.5.14 Restriktionsanalyse.....	66
2.5.15 DNA-Sequenzierung.....	66
2.5.16 Auswertung der Sequenzierung.....	67
3 Ergebnisse.....	68
3.1 Antikörper PAM-1.....	68
3.1.1 Expression von CFR-1/PAM-1 auf normalen Geweben.....	68
3.1.2 Expression von CFR-1/PAM-1 auf Tumoren.....	70
3.1.2.1 Immunperoxidase-Färbung auf Paraffinschnitten.....	70
3.1.2.2 Durchflusszytometrische Messung (FACS-Analyse).....	73
3.1.3 Expression von CFR-1/PAM-1 auf Präkanzerosen.....	75
3.1.4 Expression von CFR-1/PAM-1 in Proliferationszonen.....	78
3.1.5 Analyse der Expression von CFR-1/PAM-1 mittels RT-PCR.....	79
3.1.6 Zusammenfassung der CFR-1/PAM-1 Expression.....	80
3.2 Isolierung und Charakterisierung des Antikörpers LM-1.....	82
3.2.1 Ursprung des Antikörpers LM-1.....	82
3.2.2 Analyse der Tumorspezifität des Antikörpers LM-1.....	83

3.2.3 Genetische Analyse der variablen Region der schweren Immunglobulin-Kette des Antikörpers LM-1	86
3.2.4 Funktionelle Analyse des Antikörpers LM-1	88
3.2.4.1 Proliferationstest (MTT-Assay).....	89
3.2.4.2 Apoptose-Test (Cell Death Detection ELISA ^{PLUS}).....	91
3.2.5 Western-Blot Analyse.....	92
3.2.6 Einfluss der Proteinglykosylierung auf die Bindung des Antikörpers LM-1	94
3.3 Isolierung und Charakterisierung der Antikörper PM-1 und PM-2.....	96
3.3.1 Ursprung der Antikörper PM-1 und PM-2	96
3.3.2 Analyse der Tumorspezifität der Antikörper PM-1 und PM-2.....	98
3.3.3 Genetische Analyse der variablen Region der schweren Immunglobulin-Kette der Antikörper PM-1 und PM-2.....	101
3.3.4 Genetische Analyse der variablen Region der leichten Immunglobulin-Kette der Antikörper PM-1 und PM-2.....	103
3.3.5 Funktionelle Analyse der Antikörper PM-1 und PM-2	105
3.3.5.1 Proliferationstest (MTT-Assay).....	105
3.3.5.2 Apoptose-Test (Cell Death Detection ELISA ^{PLUS}).....	108
3.3.6 Western-Blot Analyse	109
3.3.7 Einfluss der Proteinglykosylierung auf die Bindung der Antikörper PM-1 und PM-2.....	111
3.4 Isolierung und Charakterisierung der Antikörper CM-1 und CM-2.....	114
3.4.1 Ursprung der Antikörper CM-1 und CM-2	114
3.4.2 Analyse der Tumorspezifität der Antikörper CM-1 und CM-2.....	116
3.4.3 Genetische Analyse der variablen Region der schweren Immunglobulin-Kette der Antikörper CM-1 und CM-2.....	120
3.4.4 Genetische Analyse der variablen Region der leichten Immunglobulin-Kette der Antikörper CM-1 und CM-2.....	123
3.4.5 Funktionelle Analyse der Antikörper CM-1 und CM-2	125
3.4.5.1 Proliferationstest (MTT-Assay).....	125
3.4.5.2 Apoptose-Test (Cell Death Detection ELISA ^{PLUS}).....	128
3.4.6 Western-Blot Analyse.....	129
3.4.7 Einfluss der Proteinglykosylierung auf die Bindung der Antikörper CM-1 und CM-2	130

3.5 Isolierung von tumorspezifischen Antikörpern aus Milz-Lymphozyten gesunder Probanden.....	132
3.5.1 Ergebnisse der durchgeführten Fusionen.....	132
3.5.2 Ursprung der Antikörper N-1 und N-2.....	133
3.5.3 Analyse der Tumorspezifität der Antikörper N-1 und N-2.....	135
3.5.4 Genetische Analyse der variablen Region der schweren und leichten Immunglobulin-Kette des Antikörpers N-1.....	138
3.5.5 Funktionelle Analyse der Antikörper N-1 und N-2.....	141
3.5.5.1 Proliferationstest (MTT-Assay).....	141
3.5.5.2 Apoptose-Test (Cell Death Detection ELISA ^{PLUS}).....	142
4 Diskussion.....	144
4.1 Antikörper PAM-1.....	145
4.2 Antikörper LM-1, PM-1, PM-2, CM-1 und CM-2.....	149
4.3 Angeborene Immunität.....	151
4.4 Natürliche B-Zellen.....	153
4.5 IgM-Antikörper.....	155
4.5.1 IgM Genetik.....	160
4.5.2 IgM Funktion.....	164
4.5.3 IgM Epitope.....	168
4.6 IgM-Antikörper in gesunden Probanden.....	169
4.7 Résumé.....	170
5 Zusammenfassung.....	171
6 Summary.....	173
7 Literaturverzeichnis.....	175
7.1 Verwendete Literatur.....	175
7.2 Veröffentlichungen, Vorträge, Poster.....	193
7.2.1 Wissenschaftliche Veröffentlichungen.....	193
7.2.2 Poster/Vorträge.....	195
8 Abkürzungsverzeichnis.....	198

1 Einleitung

1.1 Immunität

Jeder Organismus verfügt über ein Immunsystem, das für die Erkennung und Beseitigung infektiöser Partikel und spontan transformierter Zellen verantwortlich ist. Bei Invertebraten besteht dieses System nur aus einer angeborenen, unveränderbaren Immunität, d.h. sie sind mit einer bestimmten Anzahl von genetisch determinierten Rezeptoren ausgestattet, die ohne weitere Reifung für die primäre Erkennung von „Nicht-Selbst“-Strukturen und für die Auslösung einer zellulären und humoralen Immunantwort ausreichen (Kimbrell and Beutler, 2001; Cooper et al., 2002; Hoffmann and Reichhart, 2002; Magor and Magor, 2001). Vertebraten besitzen neben dieser primären zusätzlich eine sekundäre, erworbene Immunität, die durch Reifung und Mutation eine zusätzliche, höhere Variabilität der Rezeptoren erreichen kann (Du Pasquier, 2001; Rinkevich, 1999; Williams, 2001). Die Immunität sowohl der primären als auch der sekundären Abwehr setzt sich aus einer zellulären und einer humoralen Komponente zusammen. Zur zellulären Abwehr gehören T-Zellen, Makrophagen, NK-Zellen, zur humoralen Abwehr zählen Antikörper.

Bereits vor über 100 Jahren formulierte der Mikrobiologe und spätere Nobelpreisträger Paul Ehrlich die Idee, dass der Organismus über Moleküle im Blut verfügt, die einerseits als Rezeptoren auf Blutzellen für fremde Antigene dienen, die aber gleichzeitig auch von diesen Zellen ins Blut abgegeben werden. Auf Grund der gabelförmigen Strukturen dieser genetisch determinierten Proteine wurde seine Theorie auch „side chain theory“ genannt (Ehrlich, 1900).

Unabhängig von Ehrlich wurde fast zur gleichen Zeit von zwei anderen deutschen Wissenschaftlern, dem Arzt und Infektionsbiologen von Behring und dem Komplement-Chemiker Buchner, die Theorie der Existenz bestimmter Eiweißmoleküle im Blut zur Abwehr unterstützt. Bei diesen auch als „magic bullets“ (Zauberbulen) bezeichneten Molekülen handelt es sich um Antikörper. Antikörper spielen eine zentrale Rolle bei der humoralen Immunantwort der Vertebraten. Sie erkennen und binden nicht nur Pathogene oder fremde Strukturen, sondern sie verfügen darüber hinaus auch über bestimmte Effektor-Mechanismen, welche allein oder zusammen mit anderen Komponenten des Körpers (beispielsweise Komplement) zur Vernichtung fremder Partikel und maligner Zellen führen.

Bis Mitte der 90er Jahre wurde angenommen, dass für die Erkennung und Abwehr von fremden Strukturen und Zellen ausschließlich die sekundäre Immunität verantwortlich ist, welche durch die fremden Strukturen induziert und „trainiert“ wird und nach einer gewissen Reifung hochspezifische Antikörper und Zellen produziert. Obwohl es schon Ende der 80er Jahre hinsichtlich der Immunität sowohl gegen infektiöse Partikel (Janeway, 1989) als auch gegen maligne Zellen (Vollmers et al., 1989) Hinweise für eine wichtige Rolle der natürlichen Immunität gab, wurde sie aus immunologischer Sicht weiterhin als unspezifisch definiert und hauptsächlich für die Entstehung von autoreaktiven Molekülen verantwortlich gemacht. Inzwischen hat sich wissenschaftlich erhärtet, dass die angeborene Abwehr eine viel größere Rolle in der Abwehr fremder Partikel und Zellen spielt als bisher angenommen und die sekundäre Immunität erst durch die primäre Abwehr induziert wird (Fearon and Locksley, 1996; Janeway and Medzhitov, 2002; Bohn, 1999; Medzhitov and Janeway, 1997).

So erfolgt die Erkennung und Beseitigung infektiöser Partikel bei Invertebraten und bei Säugetieren primär über die angeborene Immunität (Moretta et al., 2002; Amakata et al., 2001; Soloski, 2001; Berczi et al., 2000). Dabei sind hauptsächlich Natürliche Killerzellen (NK) für die zelluläre, B1(CD5+)-B-Zellen und natürliche Antikörper für die humorale Ebene der Abwehr verantwortlich. Hinsichtlich der spezifischen Erkennung und Beseitigung spontan transformierter Zellen sind die zellulären, molekularen und genetischen Mechanismen allerdings weiterhin unklar (Medzhitov, 2001; Bohn, 1999): Müssen spontan transformierte Zellen erst eine Reifung und Entstehung immunkompetenter Zellen induzieren oder ist das Repertoire der natürlichen, angeborenen Immunität wie bei der Abwehr infektiöser Partikel ausreichend für eine spezifische Immunantwort?

1.2 Transformation

Tumore entstehen aus einzelnen Zellen (klonale Proliferation) durch irreversible genetische Veränderungen, deren Akkumulation zur Entartung der Zelle führt (Cohen and Ellwein, 1991). Der Vorgang der Kanzerogenese kann sich über Jahrzehnte hinziehen, wodurch die Bildung von Tumoren mit dem Alter stark ansteigt (Cohen, 1994; Balducci and Beghé, 2001). Krebs entsteht nicht wie manche andere Krankheit unvermittelt und als Folge eines einmaligen Ereignisses. Der mehrstufige Vorgang der Krebsentstehung beginnt

mit dem Auftreten von Fehlern in der molekularen Steuerung der betroffenen Zellsysteme, lange bevor eine Tumorerkrankung diagnostizierbar wird. Die Initiation der Tumorentstehung umfasst die direkten Auswirkungen von kanzerogenen Substanzen auf die DNA, wodurch Mutationen und veränderte Genexpressionen hervorgerufen werden können. Dies wiederum kann dazu führen, dass die Zellen weniger sensibel auf Inhibitoren (negative Wachstumsfaktoren) oder die Induktion von Apoptose reagieren und es so zur Zell-Proliferation kommt. Die Tumorpromotion ist in einer frühen Phase reversibel und wird als Vermehrung der initiierten Zellen angesehen. Während dieses Prozesses erscheinen progressive phänotypische Veränderungen und genomische Instabilitäten (Aneuploidie, Mutationen, Gen-Amplifikationen). Diese genetischen Veränderungen werden an die Tochterzelle weitergegeben und erhöhen die Wahrscheinlichkeit der Umwandlung der initiierten Zellen in maligne Neoplasmen, die zu Tumoren heranwachsen können. Diese Stufe der Kanzerogenese wird Tumorprogression genannt. Bei der Krebsentstehung muss zusätzlich berücksichtigt werden, dass neben der Exposition des Individuums mit chemischen Substanzen aus Nahrung und Umwelt, auf welche die Mehrzahl der menschlichen Tumore zurückgeführt wird, eine genetische Prädisposition eines Individuums eine wichtige Rolle spielen kann.

Der entscheidende Wendepunkt in der Entstehung von Krebs, und damit auch für den Patienten, ist aber die Initiation von lokaler Invasion und tumorinduzierter Neovaskularisation als Grundlage der Dissemination von Tumorzellen. Jedoch haben weniger als 0,05 Prozent der zirkulierenden Tumorzellen das Potential zu metastasieren. Die geschilderte Abfolge von Tumorinitiation, Invasion und Metastasierung ist eine komplexe Kaskade von biochemischen und genetischen Ereignissen und deren Auswirkungen auf unterschiedliche Signaltransduktionswege.

Trotz der Komplexität der Karzinogenese bildet eine Deregulation sowohl der Zell-Proliferation als auch der Apoptose die minimale gemeinsame Plattform, auf der sich jede Neoplasie vollzieht. Auf molekularer Ebene wird nach heutigem Wissen die maligne Transformation vor allem durch Defekte in den Proto-Onkogenen und Tumorsuppressorgenen ausgelöst (Weinberg, 1996). In der normalen Zelle ist ihr Zusammenspiel ausgewogen: In Abhängigkeit vom Ort und von der Zeit kodieren sie Proteine, die Zellwachstum und -teilung unterstützen bzw. unterdrücken. Die Onko- und Suppressorgene sind deshalb die genetische Basis des Krebsrisikos, auf welche die äußeren und inneren Faktoren einwirken.

Dies macht gleichzeitig den dualistischen Charakter der Krebsrisikofaktoren deutlich: Auf der einen Seite die endogene, onkogen- und regulatorgenabhängige Empfindlichkeit des Individuums zur Krebsbildung, auf der anderen Seite die exogenen, mutations- und promotionsbedingenden Kanzerogene der Umwelt.

Die Transformation einer „normalen“ Zelle zu einer malignen Zelle hat nicht nur zur Folge, dass sich auch die Eigenschaften dieser Zelle verändern (Wachstumsverhalten, Zellkontakte, Regulation), sondern fast immer ändert sich auch der Phänotyp der Zelle. Dies bedeutet, dass Tumorzellen neue oder veränderte Strukturen auf der Zelloberfläche exprimieren, welche für das veränderte Wachstum der Zelle unabdingbar sind. Diese Strukturen können vom Immunsystem als fremd erkannt werden, da sie sich von körpereigenen, normalen Strukturen unterscheiden. Die meisten neoplastischen Zellen werden vom Immunsystem sehr früh erkannt und beseitigt, daher stellt der manifeste Tumor eher eine Ausnahme dar, nicht etwa die Regel.

Die neu exprimierten Strukturen auf Tumorzellen werden als Tumorantigene bezeichnet. Die Tumorantigene lassen sich in die Gruppen der Tumor-spezifischen (TSA) und der Tumor-assoziierten Antigene (TAA) unterteilen. Tumor-spezifische Antigene werden ausschließlich bei Tumorzellen und nicht in anderen Zellen des Körpers gefunden. Tumor-assoziierte Antigene hingegen sind nicht alleine auf Tumorzellen beschränkt und werden auch in normalen Zellen exprimiert.

TSA sind zum einen virale Antigene onkogener Viren, deren genetische Information nicht Bestandteil der Zelle war, z.B. Epitope von E7, einem Onkoprotein des humanen Papilloma Virus 16 (HPV16), welches in den meisten Zervikalkarzinomen präsentiert wird (Lowy et al., 1994; zur Hausen, 2000). Zum anderen zählen zu den TSA strukturelle Veränderungen bereits vorhandener Moleküle durch äußere chemische oder physikalische Einwirkung ohne genetische Determinierung wie beispielsweise MAG (multiple antigenic glycopeptide) (Lo-Man et al., 2001).

Zur großen, sehr heterogenen Gruppe der TAA gehören modifizierte Antigene, also Antigene, die im Tumor in mutierter Form vorkommen, wie z.B. das Tumorsuppressorgen p53 (Deppert et al., 2000; Cadwell and Zambetti, 2001), das Proto-Onkogen-Produkt Ras (Kerkhoff and Rapp, 2001; McMahon and Woods, 2001; Adjei, 2001) und HER-2/neu, das in ca. 30% der Brust- und Ovarialkarzinome überexprimiert ist (Kaptain et al., 2001; Fisk et al., 1995).

Weiterhin umfasst die Gruppe der TAA Antigene, welche von Genen kodiert werden, die im normalen adulten Gewebe nicht exprimiert werden. Hierzu zählen die Genfamilien MAGE, BAGE und GAGE (Van den Eynde and Boon, 1997; Sadanaga et al., 2001; Castelli et al., 2000). Die Expression dieser Gene konnte für Tumoren unterschiedlichster histologischer Herkunft nachgewiesen werden. Die Ursache für die tumorspezifische Expression scheint im Falle der MAGE-Gene im Zusammenhang mit einer unspezifischen, genomweiten Demethylierung der DNA zu stehen, die zu einer Aktivierung des MAGE-Promotors führt.

Weiterhin gehören ubiquitäre Differenzierungsantigene zu den TAA, Proteine also, deren Gene in Tumoren überexprimiert sind, dies aber auch in normalen Körperzellen zu finden sind. Hier seien EGF (epidermal growth factor) (Mendelsohn and Baselga, 2000; Jost et al., 2000; Kirschbaum and Yarden, 2000), das Transmembran-Protein CD20 (Riley and Sliwkowski, 2000; Grillo-Lopez et al., 2000) und CEA (carcino-embryonic antigen) (Virji, 2001; Mulcahy and Benson, 1999; Abe et al., 2001; Canizares et al., 2001) exemplarisch erwähnt.

Darüber hinaus zählen zu den TAA embryonale (onkofetale) Strukturen, die im gesunden Gewebe nicht vorkommen, in Tumorzellen aber neu exprimiert sind, wie z.B. das alpha-Fetoprotein (AFP) (Mizejewski, 2001; Gillespie and Uversky, 2000). Als letzte Gruppe sind gewebespezifische Differenzierungsantigene zu nennen, die nur in bestimmten Zelltypen vorkommen und in den resultierenden Tumoren überexprimiert sind. Hierzu zählen beispielsweise Melan-A/MART-1 (Castelli et al., 2000; Busam and Jungbluth, 1999) und gp75 (Maeurer et al., 1996; Van den Eynde and Boon, 1997), welche in Melanozyten, nicht aber in anderen normalen Geweben exprimiert werden und in Melanomen überexprimiert sind. Ein weiteres Beispiel sind Ganglioside (z.B. GM2, GM3), die in neuroektodermalen Tumoren wie in Sarkomen, Neuroblastomen, Astrozytomen und in kleinzelligen Lungenkarzinomen überexprimiert sind (Kong et al., 1998; Livingston, 1998; Kirkwood et al., 2000).

Die meisten der TSA und TAA sind membrangebunden, kommen aber auch im Zytoplasma oder in Zellkernen vor und werden im Krankheitsverlauf auch sezerniert.

Während TSA relativ selten vorkommen, bilden die Hauptgruppe der TAAs in der Anwendung (Diagnostik und Therapie) die überexprimierten ubiquitären Differenzierungsantigene. Sie finden Verwendung in der Gewebeuntersuchung (Immunhistochemie) sowie in der Differenzialdiagnostik von Seren. Zu den wichtigsten Standardmarkern in der

histologischen und serologischen Tumordiagnostik gehören z. B. CEA bei Karzinomen der Lunge, des Dickdarms, der Leber und Brustdrüse und AFP bei Tumoren des Hodens.

Erhöhte Konzentrationen in Körperflüssigkeiten können im Zusammenhang mit dem Vorhandensein und/oder dem Verlauf von malignen Tumoren stehen. Diese Marker weisen zwar bei Krebserkrankungen gehäuft erhöhte Serumspiegel auf, doch werden sie auch durch nicht neoplastische Prozesse beeinflusst und selten werden sie sogar bei völlig Gesunden in ungewöhnlich hohen Konzentrationen gefunden. Die Wahrscheinlichkeit, dass ein Tumor vorliegt, nimmt jedoch mit der Höhe des Markerspiegels zu, was im Einzelfall aber keine sichere differenzialdiagnostische Unterscheidung zwischen neoplastischen und nicht-neoplastischen, z.B. entzündlichen Erkrankungen ermöglicht. Aus diesem Grund können erhöhte Tumormarkerwerte in der Primärdiagnostik allenfalls als Hinweis, keinesfalls aber als Beweis für eine Neoplasie gelten. Temporär erhöhte Tumormarkerwerte können bei entzündlichen Erkrankungen des Verdauungstraktes, Leberzirrhose, Cholestase und Niereninsuffizienz auftreten. Sie sind jedoch nicht konstant und zeigen keinen progredienten Verlauf.

1.3 Therapeutische Antikörper

Jedes Jahr erkranken weltweit mehr als zehn Millionen Menschen an Krebs, über sechs Millionen sterben daran. Allein in der Bundesrepublik Deutschland erkranken jährlich etwa 347 000 Männer und Frauen neu an Krebs. Nach Angaben des Statistischen Bundesamtes (Wiesbaden) sterben in der Bundesrepublik jedes Jahr mehr als 210 000 Menschen an ihrer Erkrankung. Prostatakrebs steht bei Männern an der Spitze der Todesursachen, bei Frauen Brustkrebs. Weitere in Deutschland häufig auftretende und teilweise schwer behandelbare Krebsarten sind Lungenkrebs, Dick- und Mastdarmkrebs, Magen- und Pankreaskrebs sowie Leukämien und Lymphome.

Durch den meist bösartigen Verlauf stellen Krebserkrankungen, nach den Herz- und Kreislauferkrankungen, die zweithäufigste Todesursache in den hochzivilisierten Industrieländern dar. Die meisten soliden Tumoren befinden sich durchschnittlich 5 bis 10 Jahre im „präklinischen Tumorwachstum“ und entziehen sich der Diagnostik. Dadurch ist eine Vorsorge schwer realisierbar und die Hauptbemühungen liegen in der Therapie maligner Tumoren. Aber nur ca. 40% der Tumorpatienten können durch die derzeitigen therapeutischen Maßnahmen für länger als 10 Jahre geheilt werden. Die derzeit wichtigsten

Behandlungsformen stellen die chirurgische Tumorthherapie, die Strahlentherapie und die Chemotherapie dar. Das genaue, oft multimodale Therapieschema hängt von der Art des Tumors (Strahlensensibilität), Lokalisation des Tumors, Tumorgröße, Ausbreitung sowie Alter und Allgemeinzustand des Patienten ab. Trotz verbesserter Aufklärung, Vorsorge und Änderung der Ernährungsgewohnheiten steigt die Zahl der Krebsneuerkrankungen kontinuierlich und trotz verbesserter chirurgischer und internistischer Methoden in der Behandlung und Nachsorge steigt auch die Zahl der Todesfälle. Es besteht demnach ein großer Bedarf an innovativen effektiveren Behandlungsmethoden, welche sich durch eine geringere Toxizität bei möglichst hoher Wirksamkeit auszeichnen.

Da der Kampf gegen maligne Erkrankungen mit chemo- oder radiotherapeutischen Ansätzen oft nur um den Preis toxischer Schädigung des Patienten erkaufte werden kann (Maloney et al., 1997), werden heute große Hoffnungen in nebenwirkungsärmere immuntherapeutische Strategien gesetzt. Während die Entwicklung gentherapeutischer Methoden im Kampf gegen Krebs recht langsam voranschreitet (Roth and Cristiano, 1997; Vile, 2000; Fahraeus et al., 1999; Kay et al., 1997), rücken zwei Ansätze immer mehr in den Vordergrund: die Vakzination zur Immunstimulierung mit Peptiden, Tumorzellen, Dendriten, Makrophagen oder Tumor/Dendrit Hybriden (Pardoll, 2000; Fong and Engleman, 2000; Hennemann et al., 1998; Kugler et al., 2000; Trefzer et al., 2000) und die therapeutische Behandlung mit monoklonalen Antikörpern (von Mehren and Weiner, 1996; Breedveld, 2000; Glennie and Johnson, 2000). Neben der aktiven Immuntherapie, deren Ziel es ist, die Immunantwort des Patienten spezifisch mit Vakzinen (Velders et al., 1998) oder unspezifisch – z.B. mit Zytokinen (Lode and Reisfeld, 2000) – zu stimulieren, konnten passive immuntherapeutische Verfahren, insbesondere der Einsatz monoklonaler Antikörper, wichtige Erfolge in der Krebstherapie erzielen.

Letztere haben sich nach einer langen Zeit der Skepsis inzwischen sowohl in wissenschaftlichen, therapeutischen als auch in wirtschaftlichen Überlegungen zu einer festen Größe etabliert (Dickman, 1998; McNeil, 1995; Hall, 1995; Maloney, 1999; Houghton and Scheinberg, 2000). Im Unterschied zum polyklonalen Antiserum ist der hauptsächliche Vorteil monoklonaler Antikörper darin zu sehen, dass die Antikörper in gleicher Qualität und Spezifität gegen ein definiertes Epitop in unbegrenzter Menge erzeugt werden können (Dunbar and Skinner, 1990).

Die Geschichte der Erzeugung monoklonaler Antikörper begann bereits in den 60er Jahren, nachdem eine Selektionsmethode für fusionierte Fibroblasten von Littlefield beschrieben

wurde (Littlefield, 1964; Littlefield, 1966). Ungefähr zehn Jahre später benutzten George Köhler und César Milstein diese somatische Hybridisierungs- und Selektionstechnik um Lymphozyten von immunisierten Mäusen mit Myelomzellen zu fusionieren. Die so entstandenen Hybridzellen besitzen sowohl die Fähigkeit der Lymphozyten, Antikörper gegen ein beliebiges Antigen zu synthetisieren, als auch die Eigenart der Myelomzellen, unsterblich zu sein. Durch Vereinzelung der Hybridomzellen wachsen Zellklone heran, welche monoklonale Antikörper sezernieren. Hierdurch wurde der erste murine Antikörper mit einer definierten Spezifität erschaffen: die Hybridoma Technologie war erfunden. Für die Entdeckung des Entstehungsprinzips der monoklonalen Antikörper erhielten Köhler und Milstein 1984 den Nobelpreis. Durch die Entwicklung der Hybridtechnik ermöglichten sie somit der bereits 1900 formulierten Idee von Paul Ehrlich, das Immunsystem des Menschen zur spezifischen antineoplastischen Therapie einzusetzen, den Weg der Realisierung.

Wie groß die Hoffnungen sind, die in die Therapie mit monoklonalen Antikörpern gesetzt werden, zeigt sich in der Fülle aktueller Untersuchungen. Momentan befinden sich über 100 monoklonale Antikörper in klinischen Erprobungsphasen unterschiedlichster Ausrichtung oder sind teilweise schon zugelassen (Breedveld, 2000; Glennie and Johnson, 2000; Houghton and Scheinberg, 2000; Drewe and Powell, 2002). Es handelt sich hierbei um Präparate gegen Transplantatabstoßungen, gegen die rheumatoide Arthritis und Morbus Crohn (Infliximab, Remicade®), zur koronaren Revaskularisation (Aciximab, ReoPro®) und zur antiviralen Prophylaxe (Pavilizumab, Synagis®). Weitere Antikörper wurden für die Krebstherapie zugelassen. Als Beispiel wäre hier exemplarisch, neben dem in der Therapie des Non-Hodgkin-Lymphoms eingesetzten Antikörpers Rituximab (Mabthera®) gegen das B-Zell-spezifische Antigen CD20 (Maloney et al., 1997), der Antikörper Trastuzumab (Herceptin®) gegen das Onkogenprodukt HER2/neu, der bei der Behandlung von Mammakarzinomen eine Rolle spielt (McKeage and Perry, 2002), zu nennen.

Die therapeutischen monoklonalen Antikörper wirken über verschiedene Mechanismen auf ihre Zielzellen ein. So unterbricht beispielsweise der chimäre Antikörper Infliximab den entzündlichen Prozess bei der rheumatoiden Arthritis, indem er sein Zielantigen, den Botenstoff TNF α , blockiert (Markham and Lamb, 2000).

Daneben können monoklonale Antikörper sowohl über die Fc-Teil-vermittelte Aktivierung des Komplementsystems (CDC, complement-dependent cytotoxicity) als auch durch Auslösung einer sekundären zellulären Immunreaktion (ADCC, antibody-dependent cell-

mediated cytotoxicity) indirekt zytotoxisch auf die antigenträgende Zelle einwirken (z.B. Alemtuzumab, Rituximab, Trastuzumab)(Goodman et al., 1990; Valerius et al., 1997).

Bei genauerer Betrachtung der zur Zeit in präklinischen oder klinischen Phasen eingesetzten Antikörper sind jedoch einige Tatsachen bemerkenswert. Zum einen ist nur ein kleiner Teil der Antikörper gegen maligne Erkrankungen gerichtet. Nur vier Antikörper gegen maligne Erkrankungen wurden bis jetzt von der FDA (US Food and Drug Administration) für die humane Therapie zugelassen (Campath[®], Herceptin[®], Rituximab[®], Gemtuzumab[®]). Im Vergleich hierzu kommen bereits acht Antikörper gegen andere Erkrankungen als Therapeutika zum Einsatz (Carter, 2001; Weiner, 1999; Breedveld, 2000; Glennie and Johnson, 2000). Eine zweite Auffälligkeit ergibt sich aus der Betrachtung der Antigene der therapeutisch zugelassenen Antikörper. Die Großzahl der Antikörper sind gegen Differenzierungsantigene wie beispielsweise CD20, CD52 und den EGF-Rezeptor gerichtet, welche nicht als tumorspezifisch im eigentlichen Sinne angesehen werden können (Matzku, 1996; Weiner, 1999; Glennie and Johnson, 2000; Ditzel, 2000; Carter, 2001). Bemerkenswert ist zudem die Tatsache, dass von allen bisher in klinischen Studien eingesetzten Anti-Krebs-Antikörpern keiner humanen Ursprungs ist.

1.3.1 Murine Antikörper

Die erste Generation in der Therapie solider und nicht solider Tumoren eingesetzter monoklonaler Antikörper wurde durch Immunisierung von Mäusen mit menschlichen Tumorzellen gewonnen. Dieser Technik liegt zugrunde, dass das Immunsystem der Maus die tumorspezifischen Strukturen auf der menschlichen Tumorzelle erkennt und dagegen Antikörper bildet.

Was dabei allerdings nicht berücksichtigt wurde, ist die Tatsache, dass das Immunsystem der Maus bei dieser Xenimmunisierung hauptsächlich gegen die Hauptdifferenzierungsantigene gerichtet ist und somit geringe Veränderungen wie z.B. veränderte Carbohydratstrukturen nicht erkannt werden. Alle murinen monoklonalen Antikörper, die in den letzten 2 Jahren generiert wurden, sind gegen diese Differenzierungsantigene wie beispielsweise CEA, EGF, FGF gerichtet und nicht gegen tumorspezifische Antigene. Die meisten dieser Moleküle sind auf Tumorzellen überexprimiert, was allerdings höchstens diagnostische Vorteile bringt, nicht jedoch

therapeutische, da für eine wirksame Bekämpfung durch Antikörper nicht die Quantität der Rezeptoren entscheidend ist, sondern ausschließlich die Qualität.

Einer dieser murinen monoklonalen Antikörper ist 17-1A (Edrecolomab, Panorex[®]), der gegen kolorektale Karzinome zum Einsatz kam. Während frühe Tumorstadien dieser Erkrankung durch eine operative Therapie in der Regel mit einer hohen Heilungswahrscheinlichkeit verbunden sind, bereiten weiterhin die fortgeschrittenen Tumorstadien sowie Tumorrezidive therapeutische Probleme. Trotz Resektion und anschließender Chemotherapie verstirbt jeder zweite Patient innerhalb von fünf Jahren. Schuld sind verhältnismäßig wenige Tumorzellen, die auch nach der radikalen Therapie im Körper verbleiben und die Krankheit nach einer Ruhephase erneut zu entfesseln vermögen. Panorex[®], so schien es zunächst, kann das Rückfallrisiko vermindern und die mittlere Überlebenszeit von Patienten mit fortgeschrittenem Darmkrebs verlängern (Riethmüller et al., 1998).

Allerdings konnte das Präparat in einer großen europäischen Folgestudie mit 2700 Patienten die ursprünglichen guten Ergebnisse nicht bestätigen. Panorex[®] war hier nach dreijähriger Beobachtung weniger wirksam als die alleinige Gabe der Chemotherapie und erbrachte auch in der Kombination keinen Vorteil (Pressemitteilung Glaxo Wellcome/Centocor, 2000). Die Gründe hierfür liegen zum einen am korrespondierenden Antigen und zum anderen am murinen Ursprung des Antikörpers. Das Antigen 17-1A ist ein Membranglykoprotein mit einem Molekulargewicht von ca. 40 kDa. Es konnte gezeigt werden, dass es als Zell-Zell-Adhäsionsmolekül wirkt, und es wurde deshalb auch als Ep-CAM (Epithelial Cell Adhesion Molecule) bezeichnet (Litvinov et al., 1994; Balzar et al., 1999). Zwar ist dieses Antigen auf kolorektalen Tumoren und einigen anderen Neoplasien überexprimiert, es findet sich jedoch auch auf einer Vielzahl normaler Epithelien und ist deshalb nicht im eigentlichen Sinne tumorspezifisch.

Auch birgt die Anwendung eines Maus-Immunglobulinmoleküls zur Therapie bei Patienten eine Reihe von Problemen. Entscheidend ist hierbei die Induktion humaner Anti-Maus-Antikörper (human anti mouse antibodies, HAMA) gegen die als fremd erkannte murinen Proteine, wodurch erwünschte therapeutische Effekte blockiert werden können (Tjandra et al., 1990). Des Weiteren kann die Bildung von HAMA durch den immunkompetente Organismus bei wiederholter Applikation nicht nur zur Neutralisation und Elimination der therapeutischen Antikörper führen, sondern schwere anaphylaktische Reaktionen bei den Patienten zur Folge haben.

Die Immunreaktion der Patienten auf speziessfremde Proteine führt also im Fall muriner Antikörper zur Bildung von neutralisierenden HAMA. Somit wird nach wiederholter Verabreichung auch die mittlere Halbwertszeit der infundierten murinen Therapie-Antikörper verkürzt (Lamers et al., 1995; Reynolds et al., 1989). Die aus Therapie-Antikörpern und HAMA entstehenden Antikörperkomplexe können bei den behandelten Patienten im Extremfall im Sinne einer Immun-Komplex-Erkrankung zu Nierenversagen führen. Therapieregime mit sich häufig wiederholenden Antikörperinfusionen werden damit praktisch unmöglich. In der Chimärisierung und Humanisierung solcher durch Xenoisimmunisierung erhaltener muriner Therapie-Antikörper ist der Versuch zu sehen diesem Phänomen zum Teil entgegenzutreten.

1.3.2 Humanisierte Antikörper

Bei den chimären oder humanisierten monoklonalen Molekülen handelt es sich um monoklonale Antikörper der zweiten Generation. Unter der Chimärisierung eines Antikörpers wird der gentechnische Austausch konstanter Domänen der schweren und leichten Immunglobulinketten gegen humane konstante Regionen verstanden. Die Humanisierung geht noch einen Schritt weiter. Hier werden zusätzlich diejenigen Bereiche der murinen variablen Regionen gegen humane ausgetauscht, die nicht zur Antigen-erkennung beitragen, sondern diesen Bereich lediglich stabilisieren (FR, framework regions). Nur die Antigenbindungsstellen (CDR, complementarity-determining regions) bleiben murinen Ursprungs (Dickman, 1998; Glennie and Johnson, 2000). Der klinisch-therapeutische Vorteil dieser Mensch-Maus-Hybride besteht in ihrer, im Vergleich zu den reinen Mausantikörpern geringeren, aber dennoch vorhandenen Immunogenität (von Mehren and Weiner, 1996; Winter and Harris, 1993) sowie ihrer hierdurch bedingten längeren Halbwertszeit (LoBuglio et al., 1989).

Jedoch können sich diese chimären und humanisierten Antikörper von der ursprünglichen Struktur des murinen Antikörpers durch die gentechnischen Veränderungen so sehr unterscheiden, dass dies zu einem Verlust der Affinität und zu einer Abnahme der Spezifität führt (Winter and Harris, 1993; Clark, 2000).

Das wohl bekannteste Beispiel eines humanisierten murinen monoklonalen Antikörpers ist Trastuzumab (Herceptin®), der das Proto-Onkogen HER2/neu (ErbB2) bindet. Dieses Proto-Onkogen ist Mitglied der HER (erbB) Familie, die zur Gruppe transmembraner

EGF-Glykoprotein-Rezeptoren mit Tyrosin-Kinase-Aktivität gehören (Olayioye et al., 2000). Nach Ligandenbindung vermitteln diese Rezeptoren ihre wachstumsstimulierenden Effekte durch Formation von Homo- und Heterodimeren.

Eine deregulierte Signaltransduktion des HER-Rezeptornetzwerkes geht mit der Entstehung früher Transformationen von epithelialen Brustzellen einher (Pierce et al., 1991; Muthuswamy et al., 2001). Bei 25-30% der Mammakarzinome kommt es zu einer Überexpression des Stimulationsfaktors HER2, welcher mit aggressivem Wachstum und einer ungünstigeren Prognose assoziiert ist (Kallioniemi et al., 1991; Tiwari et al., 1992).

Der therapeutisch eingesetzte monoklonale Antikörper Trastuzumab wurde humanisiert, indem die determinierenden Regionen des Mausantikörpers auf humanes IgG1 übertragen wurden. Das resultierende Molekül besteht zu 95% aus menschlichen Anteilen und zu 5% aus Mausanteilen (Carter et al., 1992). Die Bindung von Trastuzumab an HER2/neu greift durch Bindung an die Ektodomäne von HER2 komplex in die Regulationsmechanismen des Zellzyklus ein, was unter anderem zu einer Proliferationshemmung und zu einer erhöhten Sensitivität der Zellen für andere zytotoxische Einflüsse mit entsprechendem klinischen Benefit führt (Burris, 2000; Goldenberg, 1999; Shak, 1999). Die genauen Mechanismen der Wirkungsweise von Trastuzumab sind komplex und noch nicht endgültig geklärt. Sie umfassen die Induktion von Immunantworten (ADCC und CDC) und die Herunterregulierung von HER2 an der Zelloberfläche, da durch Bindung von Herceptin die normalen Rezeptor-Liganden-Interaktionen blockiert werden (Sarup et al., 1991; Mendelsohn, 1997).

Die therapeutische Wirkung von Trastuzumab wurde und wird derzeit in mehreren klinischen Studien untersucht. Die Kombination von Trastuzumab mit Chemotherapie bei Patientinnen mit metastasiertem HER2/neu-überexprimierendem Brustkrebs bringt Vorteile gegenüber der alleinigen Chemotherapie in Bezug auf das Therapie-Ansprechen, auf die Länge der Remission und auch auf die Überlebenszeit (Slamon et al., 2001). Allerdings kann nur ein Bruchteil der an Brustkrebs erkrankten Frauen von einer Therapie mit Trastuzumab profitieren, da, wie schon erwähnt, nur bei 25-30% aller Patientinnen HER2 überexprimiert wird. Zudem ist Vorsicht geboten bei Patientinnen mit einer Überempfindlichkeit gegen murines Eiweiß sowie bei Patientinnen mit kardiovaskulären Erkrankungen beziehungsweise Herzinsuffizienz. Beispielsweise wurden kardiale Nebenwirkungen in Abhängigkeit von der Vorbehandlung bei bis zu 12 Prozent der Patientinnen gesehen. Die kardialen Nebenwirkungen können zwar grundsätzlich behandelt werden (z. B. ACE-Hemmer, Diuretika), jedoch sind auch Todesfälle

aufgetreten. 40 Prozent aller Patientinnen entwickelten vorübergehend Fieber und Schüttelfrost unter der ersten Anwendung. Darüber hinaus sind grippeähnliche Symptome wie Kopfschmerzen, Übelkeit, Erbrechen, Rückenschmerzen und Asthenie häufig. Weitere Nebenwirkungen sind Schlafstörungen, Durchfälle, Bauchschmerzen, Husten, Dyspnoe, Rhinitis, Schmerzen im Bereich des Tumors und andere. Zusammenfassend lässt sich bemerken, dass bei Patientinnen mit nur geringer HER2/neu-Expression die unerwünschten Arzneimittelwirkungen den geringen Nutzen überwiegen; bei starker Expression kann der Tumor eine Zeitlang zurückgedrängt und das Überleben verlängert werden, ohne dass die Lebensqualität wesentlich beeinträchtigt wird.

In den letzten Jahren sind eine Vielzahl von Therapien entwickelt worden, welche die Blockierung des EGF-R zum Ziel haben. Als Beispiele hierfür sind der chimäre monoklonale Antikörper IMC-C225 und der EGFR-Tyrosin-Kinase Inhibitor ZD1839 (IressaTM) zu nennen. IMC-C225 (Cetuximab[®], ImClone, Merck) wird zur Zeit auf mehrere Anwendungsbereiche im Kampf gegen Krebs untersucht. In Phase III befindet sich beispielsweise eine Testreihe, welche die Wirksamkeit von IMC-C225 in Verbindung mit Chemotherapie bei Patienten mit Kopf- bzw. Halskarzinomen testen soll. Im Bereich von Bauchspeicheldrüsen- und Lungenkrebs befinden sich die Tests in Phase II. Auch ZD1839 (Iressa) befindet sich momentan in einer klinischen Phase-III Studie zur Therapie von nichtkleinzelligen Lungenkarzinomen. Neuesten Berichten zufolge sollen jedoch mehr als 120 Todesfälle in einer japanischen Studie mit Iressa in Verbindung gebracht werden. Wie erfolgreich allerdings eine Therapie gegen den EGF-R mit einem humanen Antikörper sein kann, wird die Zukunft zeigen. In der Therapie gegen Differenzierungs- oder Wachstumsfaktorantigene wie dem EGF-R bleibt jedoch immer ihre ubiquitäre Expression sowohl auf neoplastischen Zellen als auch auf normalen Zellen ein Problem. Da ein Großteil der Antikörper von normalen Zellen absorbiert wird, müssen die humanen monoklonalen Antikörper den Patienten in einer großen Mengen appliziert werden, wodurch es wiederum zu unerwünschten Nebenwirkungen kommen kann.

Ein weiterer humanisierter Antikörper mit klinischer Relevanz ist Alemtuzumab (Campath[®]), der bei Patienten mit chronisch-lymphatischer Leukämie, prolymphozytärer Leukämie, Non-Hodgkin-Lymphomen, rheumatoider Arthritis und bei Organ- und Knochenmarktransplantationen zum Einsatz kommt (Dyer, 1999; Dumont, 2002). Alemtuzumab bindet spezifisch an das CD52 Antigen. Das 21-28 kDa große Glykoprotein CD52 ist auf der Oberfläche von mehr als 95% aller peripheren B- und T-Lymphozyten, Monozyten und Makrophagen stark exprimiert, nicht jedoch auf Granulozyten,

Erythrozyten, Thrombozyten und hämatopoetischen Stammzellen des Knochenmarks. Daraus ergibt sich die Konsequenz, dass ein therapeutischer Einsatz von Antikörpern gegen CD52 die normale Hämatopoiesis nicht beeinträchtigt (Hale et al., 1988; Hale et al., 1990; Xia et al., 1993). Der Antikörper Alemtuzumab dezimiert die Anzahl an gesunden und transformierten lymphoiden Zellen durch Komplement (CDC) und zellulär-induzierte Zelllyse (ADCC). Zudem werden weitere Effektormechanismen diskutiert. In vitro Experimente zeigten beispielsweise, dass cross-linking von CD52 zu einer profunden Hemmung des Wachstums von B-Zellen führt und in einer Induktion eines Fas/FasL-unabhängigen Apoptose-Pathways endet (Rowan et al., 1998). Der genaue Mechanismus ist jedoch noch nicht aufgeklärt.

Neben Alemtuzumab wird auch der humanisierte monoklonale Antikörper Rituximab in der Therapie von Erkrankungen des blutbildenden Systems eingesetzt. Seine Wirksamkeit zeigte sich Mitte der 90er Jahre in der Monotherapie bei rezidivierten niedrigmalignen, insbesondere folliculären B-Zell-Lymphomen (McLaughlin et al., 1998). Heute wird Rituximab auch in Kombination mit Chemotherapie eingesetzt, und zwar bei folliculären (Czuczman, 1999) wie auch bei hochmalignen B-Zell-Lymphomen (Vose et al., 2001). Rituximab ist ein humanisierter monoklonaler Antikörper, der an das CD20 Antigen (33-37 kDa) bindet. Das CD20 Epitop ist ein phosphoryliertes Transmembran-Protein, das auf reifen und späten Vorstufen der B-Zellen exprimiert wird. Ferner findet man CD20 auf 95% aller B-Zell-Lymphome vom niedrig malignen Non-Hodgkin-Typ. Zwar exprimieren gesunde wie maligne B-Zellen das CD20 Epitop, es befindet sich jedoch nicht auf hämatopoetischen Stammzellen, normalen Plasmazellen und anderen Gewebezellen. Diese werden deshalb durch die Therapie nicht angegriffen. Rituximab entwickelt seine antitumorale Aktivität über verschiedene Wirkmechanismen. Einerseits werden Effekte durch den humanen Fc-Teil des Antikörpers vermittelt. Hierdurch wird eine Komplement-vermittelte Lyse (CDC) maligner Tumorzellen eingeleitet sowie die zellvermittelte Immunabwehr aktiviert, die durch Heranführung von Killer-Zellen und Makrophagen an die Tumorzelle erreicht wird (ADCC). Darüber hinaus induziert Rituximab Veränderungen auf verschiedenen Ebenen der Zellregulation, was schließlich zur Apoptose führt.

Die humanisierten murinen Antikörper führen trotz des Austausches großer Teile des murinen Proteins immer noch zur Induktion von HAMA und damit verbunden auch zu unerwünschten Nebenwirkungen, die letztlich sogar bis zum Tod des Patienten führen können (z.B. bei Herceptin). Auch wird die Halbwertszeit der Antikörper durch die Bildung der HAMA verkürzt, sodass große Mengen der Antikörper verabreicht werden

müssen. Die größten Erfolge humanisierter Antikörper gibt es bisher gegen verschiedene Arten von Blut- und Lymphdrüsenkrebs zu vermelden (siehe Alemtuzumab, Rituximab) – vermutlich, weil hier die entarteten Zellen leichter zugänglich sind als bei den soliden Tumoren anderer Krebsarten. Auch die Absorption der Antikörper durch die ebenfalls auf normalen Zellen exprimierten Antigene spielt hier keine derart große Rolle wie bei soliden Tumoren, welche erst nach Verlassen der Blutbahn erreicht werden können.

Ideal scheint somit die Verwendung vollständig humaner Antikörper zu sein, die aufgrund ihrer hohen Antigenspezifität, ihrer geringen Immunogenität und guten Verträglichkeit die potentesten Immuntherapeutika neoplastischer Erkrankungen darstellen.

1.3.3 Humane Antikörper

Rein humane monoklonale Antikörper werden auch als monoklonale Antikörper der 3. Generation bezeichnet. Die ersten menschlichen Antikörper wurden 1977, zwei Jahre nach Köhler und Milstein, durch Infektion eines humanen Lymphozyten mit EBV (Eppstein-Barr-Viren) hergestellt (Steinitz et al., 1977). Drei Jahre später wurde die erste human-humane Hybridomzelle beschrieben, die einen menschlichen Antikörper sezernierte (Olsson and Kaplan, 1980).

Im Vergleich zu der murinen Hybridomatechnik entwickelte sich die humane Hybridoma Technologie langsam. Nachdem jedoch die anfänglichen technischen Schwierigkeiten (geeignete Myelomzellen als Fusionspartner, Lymphozyten etc.) gelöst waren, wurden in den 80er Jahren eine ganze Reihe interessanter menschlicher Antikörper gegen Tumoren und andere Erkrankungen isoliert und beschrieben (Vollmers et al., 1989; Pfaff et al., 1990; Schlom et al., 1980; Sikora, 1984; Kan-Mitchell et al., 1986; Glassy, 1987; Furukawa et al., 1989; Carson and Freimark, 1986; Larrick and Bourla, 1986; Glassy and Dillman, 1988; James and Bell, 1987). Weitere technische Schwierigkeiten in der experimentellen Handhabung der humanen Antikörper wie Kreuzreaktionen, geringe Affinität, Massenkultur und Reinigung der Antikörper etc. führten allerdings dazu, dass die Technologie Anfang der 90er Jahre einen jähen Einbruch erlebte. Nur wenigen Arbeitsgruppen gelang es die experimentellen Probleme dieser Technik zu verstehen und zu beseitigen (Vollmers et al., 1989; Vollmers et al., 1994; Vollmers et al., 1998a; Hensel et al., 1999a und b; Hensel et al., 2001a und b; Vollmers und Brändlein 2002; Brändlein et al., 2002; Brändlein et al., 2003).

In der Zwischenzeit haben sich, neben der Immortalisierung menschlicher Lymphozyten, zwei weitere Methoden zur Herstellung menschlicher Antikörper etabliert. So besteht zum Einen die Möglichkeit, humane monoklonale Antikörper durch Immunisierung transgener bzw. trans-chromosomaler Mäuse (sog. HumAb-mouse) zu produzieren. Weiterhin können Antikörperfragmente in Bakterien durch sog. phage display exprimiert werden (Marks et al., 1991; McCafferty et al., 1990). Große Phagenbanken ermöglichen hierbei die Selektion von humanen Antikörpern gegen eine Vielzahl verschiedener Zielantigene (Griffiths and Duncan, 1998).

Die erste Methode zur Herstellung humaner Antikörper erfolgt wie bereits erwähnt mit Hilfe transgener Mäuse. Die Immunglobulin-codierenden DNA-Abschnitte der sog. humAbmouse (XenoMouse) (Yang et al., 2001) sind inaktiviert und durch entsprechende humane Sequenzen ersetzt worden (Tomizuka et al., 2000; Vaughan et al., 1998). Die Mäuse werden mit Tumorzellen oder Tumorzellextrakten immunisiert und die B-Zellen anschließend, ähnlich wie bei der Herstellung von murinen Antikörpern, nach der klassischen Methode hybridisiert. Durch diese Methode ist es zwar möglich humane Antikörper zu generieren, die Ausbeute ist aber bis zum heutigen Zeitpunkt sehr gering. Sinnvoll ist diese Methode auch nur, wenn mit definierten, also bereits bekannten Antigenen immunisiert wird (Neuberger and Bruggemann, 1997; Vaughan et al., 1998; Davis et al., 1999; Green, 1999). Indikationsgebiete sind deshalb hauptsächlich Abstoßungen nach Transplantationen, inflammatorische Erkrankungen, Autoimmun-, Herz-Kreislauf- und Infektionskrankheiten. Auf dem Gebiet der Tumorthapeutika gibt es bis jetzt nur einen Antikörper, der durch diese Methode als potentiell Reagenz gefunden wurde: ABX-EGF (Abgenix) (Yang et al., 2001). Es handelt sich hierbei um einen Antikörper gegen den bereits erwähnten epidermalen Wachstumsfaktor-Rezeptor EGF-R (Epidermal Growth Factor Receptor), welcher auf Karzinomen überexprimiert wird, jedoch auch auf nichtmalignen Zellen vorhanden ist. Unter physiologischen Bedingungen spielt der EGF-Rezeptor eine wichtige Rolle bei der embryonalen Entwicklung, bei der Zell-Proliferation und Differenzierung.

Der durch die XenoMouse Technologie generierte humane Antikörper ABX-EGF wird derzeit in Phase-II Studien gegen Nieren-, Prostatakrebs sowie bei nichtkleinzelligen Lungenkarzinomen und kolorektalen Karzinomen eingesetzt. Ob und in welchem Umfang eine Therapie gegen den EGF-R mit einem humanen Antikörper erfolgreich sein kann, muss die Zukunft zeigen. Das Hauptproblem hierbei bleibt jedoch das Gleiche wie bei der Anwendung der bereits erwähnten humanisierten Antikörper gegen den EGF-R (z.B.

Iressa™). Der Nachteil der XenoMouse Methode ist also, wie man bereits an den Antigenstrukturen der oben beschriebenen Antikörper erkennt, dass die XenoMouse offensichtlich nur Antikörper gegen Differenzierungsantigene herstellt. Der Grund hierfür ist das beschränkte Repertoire an humanen Genen, welches nicht das ganze Spektrum der genetischen Variabilität abdeckt.

Die zweite Methode der Herstellung humaner monoklonaler Antikörper, die gentechnische Produktion (phage display), wurde erstmalig 1985 von George P. Smith (Smith, 1985) beschrieben. Die phage display Technik basiert auf der Verwendung filamentöser Phagen als Vektoren, welche Antikörperstrukturen auf ihrer Oberfläche exprimieren. Die DNA-Sequenz für ein scFv (single chain variable Fragment) oder auch ein Fab-Fragment wird in das Genom eines filamentösen Phagen kloniert und die Antikörperstruktur wird als Fusionsprotein mit einem Phagenoberflächenprotein exprimiert. Es entsteht also ein Partikel, der kloniertes Protein (scFv, Fab-Fragment) auf seiner Oberfläche exprimiert und gleichzeitig die dafür kodierende DNA enthält. Aus B-Lymphozyten des peripheren Blutes, der Milz oder der Lymphknoten können mittels PCR die variablen Regionen der schweren und leichten Immunglobulinketten amplifiziert werden. In einer sogenannten „assembly-PCR“ werden die schweren und leichten variablen Regionen durch „splicing by overlap extension“ (Horton et al., 1989) nach dem Zufallsprinzip zusammengelagert. Die so entstandene scFv-DNA wird in den Phagmidvektor ligiert und dieser in Bakterien elektroporiert. Diese produzieren nach Infektion mit Helferphagen filamentöse Phagen, die Antikörperfragmente an ihrer Oberfläche tragen. Die so entstandene scFv- Bibliothek enthält ca. 10^7 - 10^{10} unterschiedliche Klone. Eine solche Antikörperbibliothek kann an einem bestimmten Antigen selektioniert werden. Hierbei werden die Phagen mit dem Antigen inkubiert und nicht bindende Partikel gewaschen. Bindende Phagen werden vom Antigen eluiert, in Bakterien vermehrt und für eine erneute Selektion verwendet. Durch mehrere Selektionsrunden können die Phagen angereichert werden, die spezifisch an das Antigen binden. Da diese Phagen das Gen für den bindenden Antikörper tragen, steht die DNA-Sequenz zur Verfügung, so dass der Antikörper nach Umklonierung auch in einem bakteriellen oder eukaryotischen Expressionssystem rekombinant hergestellt werden kann.

Mit der phage display Technik konnten aus verschiedenen Bibliotheken scFvs gegen mehrere Tumorantigene isoliert werden, wie z.B. gegen Mesothelin (Chowdhury et al., 1998), Lewis- Antigen (Mao et al., 1999), erbB-2 (Schier et al., 1995), MUC1 (Henderikx et al., 1998) und HMW-MAA (High Molecular Weight-Melanoma Associated Antigen) (Desai et al., 1998).

Die vorgestellte Technologie hat zwar den Vorteil einer hohen Frequenz an generierten Antikörpern sowie einer relativ einfachen Massenproduktion der rekombinanten Antikörper, gleichzeitig aber den entscheidenden Nachteil, dass die Nähe zum Tumorantigen fehlt. Die Methode ist sicher geeignet, um humane Antikörper gegen bekannte Antigene herzustellen, die in reiner, löslicher Form und ausreichender Menge vorliegen. Es ist jedoch unwahrscheinlich, dass mit dieser Methode Antikörper gegen Oberflächenantigene gewonnen werden können, schon gar nicht gegen unbekannte Antigene auf Tumorzellen oder in Tumorzellextrakten (Wittrup, 1999; Little et al., 1999; Adams and Schier, 1999; Boel et al., 2000).

Die bisher vorgestellten Methoden sind demnach nur bei der Herstellung von monoklonalen Antikörpern gegen bekannte, gereinigte und lösliche Antigene, wie beispielsweise Transplantationsantigene, Autoantigene, sowie bakterielle und virale Antigene, sinnvoll.

Hinzu kommt, dass bei der gentechnischen Methode nur einzelsträngige oder monomere Immunglobuline entstehen, die zwar über Bindungsstelle und Fc-Teile ausgesprochen starke *in vivo* Aktivität zeigen können (Clynes et al., 2000), allerdings als Monomere kaum Prozesse wie beispielsweise „crosslinking“ induzieren können. Ein „crosslinking“ und „signaling“ über dimere oder pentamere Antikörper ist allerdings für bestimmte therapeutische Ansätze von großer Bedeutung (Vollmers et al., 1989; Vollmers et al., 1994; Vollmers et al., 1998; Cragg et al., 1999; Yang and Korsmeyer, 1996; Shan et al., 1998; Casaccia-Bonnel et al., 1999).

Die dritte Methode der Herstellung von humanen monoklonalen Antikörpern ist, wie bereits erwähnt, die somatische Hybridisierung von humanen B-Lymphozyten mit einer immortalisierten Heteromyelomzelle.

1.4 Humane Hybridoma Technologie

Die beste Methode rein humane Antikörper herzustellen ist die klassische Hybridisierung von B-Zellen, die direkt aus lymphatischem Material von Krebspatienten isoliert werden.

Am Pathologischen Institut der Universität Würzburg wurde in den letzten Jahren ein Verfahrensansatz zur Generierung derartiger humaner monoklonaler Antikörper entwickelt. Durch somatische Hybridisierung der B-Lymphozyten von Krebspatienten mit einer immortalisierten Heteromyelomzelle wurden Zellklone geschaffen, welche humane monoklonale Antikörper produzieren (Faller et al., 1990; Vollmers et al., 1989, siehe

Abbildung 1). Hierzu wird sowohl Tumor- als auch lymphatisches Gewebe (Lymphknoten, Milz) von Karzinompatienten verwendet, welches routinemäßig während der Operation entnommen wurde. Das Tumormaterial wird mit Formalin fixiert und in Paraffin eingebettet. Zusätzlich wird Tumorgewebe kryotechnisch asserviert. Ein Teil des Tumormaterials wird außerdem zu einer Primärkultur verarbeitet, wenn das erhaltene Material steril vorliegt. Aus dem lymphatischen Gewebe werden durch mechanische Zerkleinerung Einzelzell-Suspensionen gewonnen. Diese Einzelzellen werden im weiteren Verlauf durch somatische Hybridisierung mit einem Heteromyelom verschmolzen. Ein Teil der entstandenen Triome produziert humane monoklonale Antikörper, die sie in das Zellkulturmedium sezernieren. Zuerst werden die Immunglobulin-Isotypen dieser Antikörper mit Hilfe eines ELISA bestimmt. Im Folgenden werden diese Antikörper zur ersten Orientierung auf dem autologen Tumorgewebe durch immunhistochemische Methoden auf ihre Tumorreaktivität hin untersucht. Im weiteren Verlauf werden die monoklonalen Antikörper auch auf weiteren Karzinomen des gleichen Tumortyps, anderen Tumortypen sowie auf einer Reihe Normalgewebe einer Spezifitätsanalyse unterzogen. Durch diese selektive und autologe Testung werden nur die Antikörper weiter charakterisiert, die mit dem Tumor, nicht aber mit Normalgeweben reagieren.

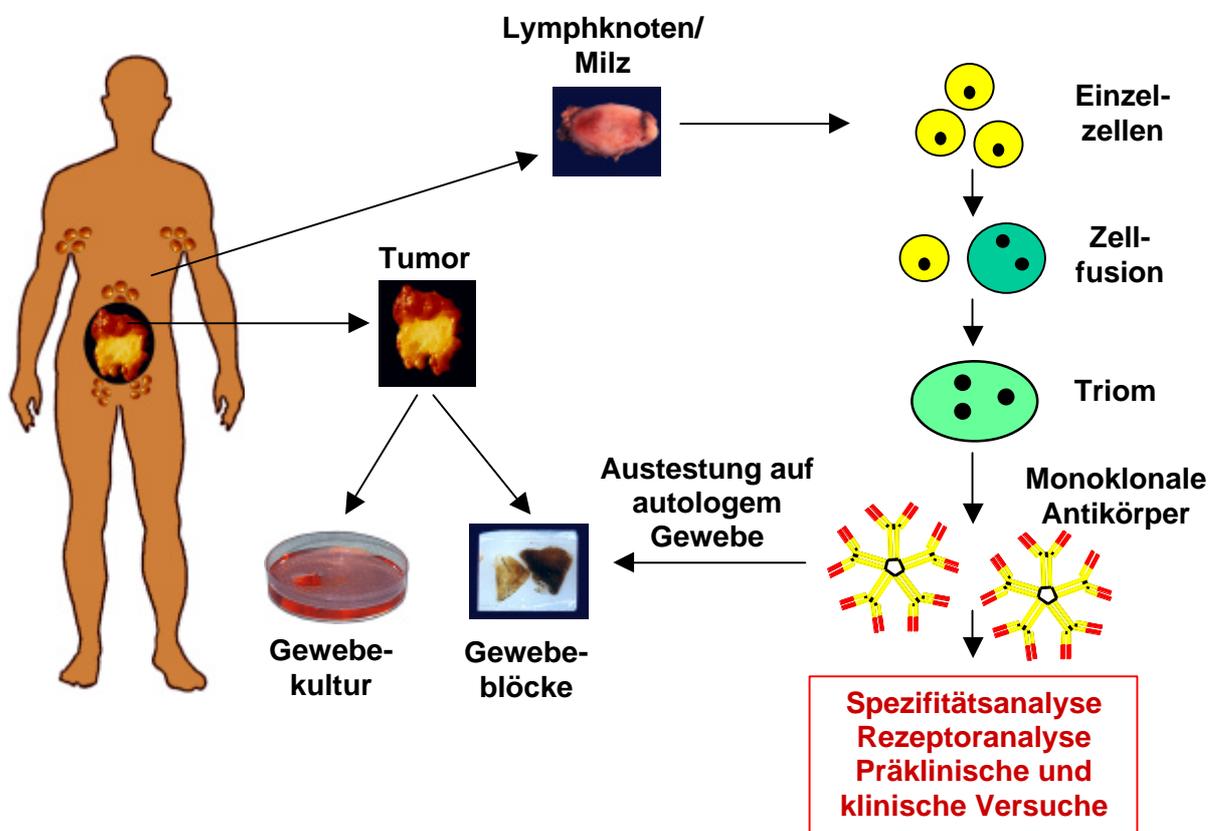


Abb.1: Humane Hybridoma Technologie

Für solche tumorspezifischen Antikörper werden im Folgenden Rezeptoranalysen durchgeführt. Diese Analysen bieten die Möglichkeit völlig neue unbekannte Antigene auf Tumorzellen zu charakterisieren. Eine solche Möglichkeit ist bei den Verfahren der XenoMouse Technologie und der phage display Technologie nicht gegeben. Ein weiterer Vorteil der humanen Hybridoma Technologie ist, dass die gewonnenen Antikörper komplette, intakte Immunglobuline darstellen und deshalb ohne weitere Modifikationen direkt in präklinischen und klinischen Versuchen zum Einsatz kommen können.

Der entscheidende Vorteil der klassischen Hybridisierungsmethode von B-Zellen aus Tumorpatienten liegt also darin, dass erstens humane und zweitens tumorspezifische Antikörper gefunden werden, welche drittens auch gegen vorher unbekannte Antigene gerichtet sein können. Durch diese Technologie erhält man folglich eine neue Selektion tumorspezifischer Antikörper und Oberflächenantigene, die sowohl für therapeutische und diagnostische Ansätze als auch für Fragen, welche die Tumorgenese und Tumorummunität betreffen, bedeutsam sind.

Durch das beschriebene Verfahren der humanen Hybridoma Technologie konnten mittlerweile mehrere humane monoklonale Antikörper und deren entsprechende Rezeptoren isoliert und charakterisiert werden (Vollmers et al., 1997; Vollmers et al., 1998; Hensel et al., 1999a und b; Hensel et al., 2001a und b; Brändlein et al., 2002; Vollmers and Brändlein, 2002). Zudem ist es durch diese Methode auch möglich neue Einblicke in die humorale Immunität von Krebspatienten zu gewinnen (Hensel et al., 1999b; Brändlein et al., 2002; Brändlein et al., in prep.).

1.5 Antikörper SC-1

Der voll humane monoklonale Antikörper SC-1 wurde aus einem Patienten mit einem Siegelringzellkarzinom des Magens durch Fusion von Milzzellen mit dem Heteromyelom SPM4-0 etabliert (Vollmers et al., 1989). Der Antikörper SC-1 reagiert mit 70% aller Adenokarzinome des Magens vom diffusen Typ und mit 20% der Tumoren vom intestinalen Typ, jedoch nicht mit getesteten Karzinomen anderer Organe, mit malignen Melanomen, verschiedenen malignen Lymphomen und Normalgeweben (Vollmers et al., 1989; Vollmers et al., 1995; Vollmers et al., 1997). *In vitro* Untersuchungen zeigten, dass der Antikörper in Zellkultur und in Weichagar das Wachstum von Magenkarzinomzellen inhibiert. *In vivo* führt der Antikörper in der Nacktmaus zur Tumorrepression (Vollmers et

al., 1998a und b). Ultrastrukturelle molekularbiologische und zellbiologische Untersuchungen ergaben, dass der Antikörper spezifisch die Apoptose von Tumorzellen induziert (Vollmers et al., 1995). Es handelt sich um einen IgM (lambda) -Antikörper, der von einem leicht mutierten DP-49 Gen der VH3-Familie (IgHV3-30/3.30.5*01) codiert wird (Vollmers et al., 1998a). Hierbei finden sich in der „Framework“-Region (FR) der schweren Immunglobulin-Kette vier Aminosäureaustausch-Mutationen und eine stille Mutation, sowie in der „complementarity-determining region“ (CDR) zwei Aminosäureaustausch-Mutationen. Die Homologie zum Keimbahn-Gen DP-49 beträgt 97%. Die leichte lamda Immunglobulin-Kette ist zu 96,8% homolog zur Sequenz ihres Keimbahn-Gens (DPL-23, V λ III) und weist in der FR drei Aminosäureaustausch- und zwei stille Mutationen sowie in der CDR drei Aminosäureaustausch-Mutationen auf.

Der Antikörper bindet an eine neue Isoform des DAF/CD55 Rezeptors, die spezifisch auf Magenkarzinomzellen exprimiert wird (Hensel et al., 1999a). Bei dem SC-1 bindenden Protein handelt es sich um eine 80-82 kDa Isoform von DAF (Decay Acceleration Factor), auch CD55 genannt. Dieses GPI (Glycosylphosphatidylinositol)-Membranmolekül schützt die Zellen vor autologem Komplement (Davis et al., 1988; Kuraya and Fujita, 1998). Zur Komplement-Inaktivierung bindet der DAF Rezeptor den C3b und Faktor B Komplex (Untereinheit Bb) über gemeinsame Bindungsstellen auf C3bBb und den SRC1-3 Domänen auf DAF. Diese führt zum Zerfall des Komplexes und zur Inaktivierung von Komplement (Kuttner-Kondo et al., 1996). Besagtes Molekül, das die Zellen vor autologem Komplement schützt, indem es die Bildung von C3-Convertase im klassischen Komplementweg verhindert, liegt im Menschen in verschiedenen Isoformen vor (u.a. als DAF B) und ist auf sehr vielen Tumoren überexprimiert (Niehans et al., 1996; Shinoura et al., 1994; Gorter et al., 1996). Bei dem Rezeptor handelt es sich demnach nicht um ein Molekül der klassischen CD95 Familie mit einem „death domain“ Komplex, sondern um eine modifizierte Form eines Schutzmoleküls. Verdauexperimente mit Endoglykosidasen zeigten, dass der SC-1 Antikörper an einen Carbohydratrest des CD55 Rezeptors bindet (Hensel et al., 2001b).

Der immunologische Ursprung des gering mutierten, nicht affinitätsgereiften Antikörpers SC-1 wurde durch die Generierung eines murinen monoklonalen Anti-Idiotyp-Antikörpers charakterisiert. Durch eine immunhistochemische Doppelfärbung konnte gezeigt werden, dass es sich bei den Zellen, welche durch den Anti-Idiotyp-Antikörper erkannt werden, um CD5+ B-Lymphozyten handelt. Bei dem Antikörper SC-1 handelt es sich demnach um

einen Antikörper, der im Rahmen der „first line of defense“ von Zellen des innate Immunsystems exprimiert wird.

Wenige Minuten nach Induktion der SC-1 vermittelten Apoptose findet eine Tyrosin-Phosphorylierung von Proteinen mit einer Größe von 55 kDa und 110 kDa statt, nach 15 min kommt es zu einer Tyrosin-Phosphorylierung eines 75 kDa Proteins. Weiterhin wird der Serinrest eines Proteins von ca. 35 kDa dephosphoryliert (Hensel et al., 1999a). Möglicherweise handelt es sich um eine Kinase aus der Familie der src-Kinasen, ein ähnlicher Mechanismus, der auch bei DAF beobachtet wurde (Parolini et al., 1996). Weitere Eigenschaften der SC-1 Apoptose sind ein starker Anstieg von Calcium in der Zelle, verbunden mit einer Neusynthese des Rezeptors nach Endozytose, einer Aktivierung von Caspase 6 (verantwortlich für den Abbau des Zytoskeletts), sowie einem Anstieg von c-myc. Es findet kein Flip-Flop von Annexin und auch keine Spaltung von PARP (poly(ADP-ribose)polymerase) statt, wie sie bei anderen Apoptose-Wegen beschrieben werden (Hermann et al., 2001; Hensel et al., 2001b). Zusammenfassend lässt sich bemerken, dass der SC-1 Apoptose-Weg in vielerlei Hinsicht neu und einzigartig ist.

In einer klinischen Studie an der Chirurgischen Klinik der Universität Würzburg und der Missionsärztlichen Klinik Würzburg sollte überprüft werden, ob SC-1 bei klinischer Anwendung an Magenkarzinompatienten verträglich ist und ob die *in vitro* beobachteten Effekte, Apoptose-Induktion und Tumorregression, auch bei Anwendung von SC-1 am Menschen demonstrierbar sind. Ziel der klinischen Studie mit SC-1 an ausgewählten Patienten war, Kreuzreaktionen, Verteilung, Targetisierung und Effekte auf Primärtumoren und Metastasen zu untersuchen. Nach umfangreichen präklinischen Untersuchungen wurde an 50 Magenkarzinompatienten überprüft, ob dieser SC-1 Antikörper auch im Patienten seinen spezifischen apoptotischen Effekt ausübt und ob dieser Effekt kurzfristig und langfristig nachweisbar ist. Dazu wurden alle Patienten, in deren präoperativer Biopsie des Magenkarzinoms eine Bindung mit SC-1 nachgewiesen werden konnte, nach entsprechender Aufklärung und Einverständniserklärung mit SC-1 behandelt. Die Applikation des Antikörpers erfolgte 24 oder 48 Stunden präoperativ in einer Dosis von 20 oder 30 mg über mehrere Stunden intravenös. Der Antikörper wurde von den Patienten ausnahmslos sehr gut vertragen und zeigte keinerlei Nebenwirkungen. Bei den Patienten erfolgte anschließend eine Gastrektomie mit systematischer Lymphadenektomie in der Umgebung des Magens. Die Resektate wurden anschließend histopathologisch und immunhistochemisch untersucht und ein Vergleich zwischen der präoperativen Biopsie und dem postoperativen Befund vorgenommen. Hierzu wurden Apoptose und Tumorregression

semiquantitativ bestimmt und nach einem Score bewertet. Die histomorphologische Evaluation von 50 behandelten Patienten zeigte bei 84% der Patienten eine Zunahme der Apoptose im Vergleich zum Zustand vor Antikörper-Gabe sowie eine Tumorregression in 60% der mit SC-1 behandelten Patienten. 35 Patienten zeigten nach 3 Jahren eine deutlich erhöhte Überlebensrate im Vergleich mit der 3-Jahresüberlebensrate der Dtsch. Magenkarzinomstudie (Illert et al., in prep.). Dieser Überlebensvorteil ist im Bereich der Magenkarzinomtherapie beeindruckend. Mit einer entsprechenden Chemotherapie konnte dagegen ein wesentlich geringerer Überlebensvorteil im Vergleich zu nicht behandelten Patienten erzielt werden.

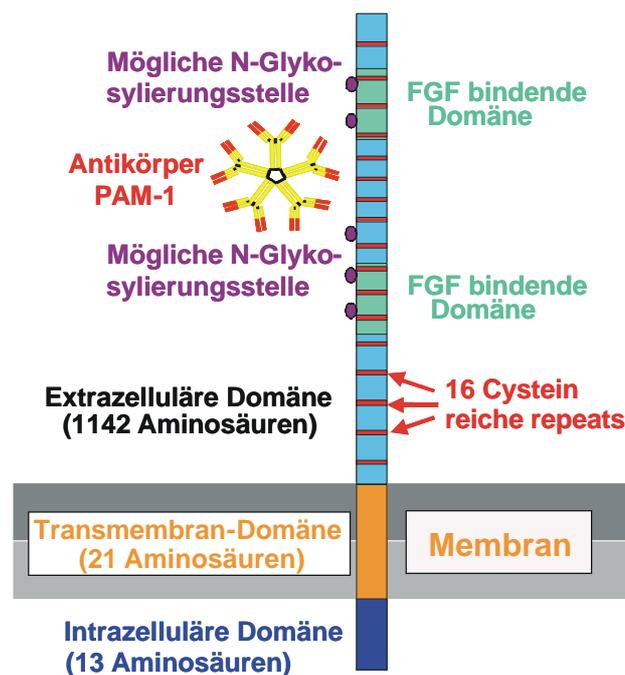
Die Tatsache, dass es möglich ist mit Hilfe von Antikörpern gegen membrangebundene Rezeptoren eine tumorspezifische Apoptose auszulösen, lässt hoffen, weitere Rezeptoren und Mechanismen zu identifizieren und damit innovative und alternative Therapieformen zu entwickeln.

1.6 Antikörper PAM-1

Der humane IgM-Antikörper PAM-1 (Klon 103/51) wurde ebenfalls mittels Hybridoma Technologie aus einem Patienten mit einem Magenkarzinom isoliert. Hierzu wurden Milzzellen des Karzinompatienten mit dem Heteromyelom HAB-1 fusioniert (Vollmers et al., 1994). Es handelt sich bei PAM-1 um einen IgM (lambda) -Antikörper, der von einem nicht mutierten DP-49 Gen der VH3-Familie (IGHV3-30/3.30.5*01) codiert wird und somit zur Gruppe der natürlichen Antikörper gezählt werden kann (Hensel et al., 1999b; Hensel et al., 2001a). Die Homologie zur Keimbahn-Sequenz beträgt im Fall der schweren Immunglobulin-Kette 100%. Die leichte lamda Immunglobulin-Kette weist drei Aminosäureaustausch-Mutationen in der FR auf sowie eine stille Mutation in der CDR. Die Homologie zum Keimbahn-Gen (IGLV3-1*01) beträgt damit 98,7%.

Auch im Falle dieses Antikörpers PAM-1 konnte das korrespondierende Antigen identifiziert werden. Der Antikörper bindet an einen Carbohydratrest eines 130 kDa Membranmoleküls. Hierbei handelt es sich um eine modifizierte Form des CFR-1 Rezeptors (Cystein rich fibroblast growth factor receptor 1), welcher ausschließlich auf erkrankten Geweben, insbesondere auf prämaligen und malignen epithelialen Tumoren, exprimiert wird. Eine Expression auf gesunden Zellen zeigte sich bei keinem der untersuchten Normalgewebe (Hensel et al., 2001a, Brändlein et al., 2003). CFR-1 wurde

ursprünglich in Hühnerfibroblasten als ein FGF-bindendes Molekül identifiziert (Burrus et al., 1992). Lokalisiert werden konnte es auch im Golgi-Apparat von CHO-Zellen. CFR-1, ein multifunktionales Protein, ist homolog zu MG 160 und E-selectin ligand 1 (ESL-1). MG 160 ist ein Protein in Ratten, welches als Golgi-spezifisches Protein identifiziert wurde und an der Verarbeitung und Sekretion von Wachstumsfaktoren beteiligt ist (Gonatas et al., 1989; Stieber et al., 1995; Zuber et al., 1997; Gonatas et al., 1998). Kürzlich wurde MG 160 auch in Pankreaskarzinomen entdeckt (Crnogorac-Jurcevic et al., 2001). Bei ESL-1 handelt es sich um ein humanes Zytokin, welches auf Myeloid- und einigen Lymphomzellen exprimiert wird. Es wird durch Zelladhäsionsmoleküle moduliert, welche die Bindung von neutrophilen Granulozyten an das Endothel vermitteln (Steegmaier et al., 1995; Steegmaier et al., 1997). Bei dem Rezeptor von PAM-1 (Klon 103/51) handelt es sich um eine neue, bisher nicht beschriebene Isoform von CFR-1 (Hensel et al., 2001a).



- Integrales Membran-Glykoprotein
- Molekulargewicht 130 kDa
- Neue Variante von CFR-1 (cysteine rich fibroblast growth factor receptor 1)
- Strukturell homolog zu MG160 (im Golgi-Apparat von Ratten) und ESL-1 (humanes myeloides Adhäsionsmolekül)

Abb. 2: CFR-1/PAM-1 Rezeptor

Wie eine Reihe von Voruntersuchungen zeigt, wird der CFR-1/PAM-1 Rezeptor auf einer Vielzahl epithelialer Tumoren exprimiert, nicht jedoch auf gesunden Zellen. Zu den Tumoren, die durch den Antikörper PAM-1 spezifisch erkannt werden, gehören die weltweit häufigsten Karzinome wie das Adenokarzinom des Kolons, der Brust, der Lunge, des Magens und der Prostata. Aber auch Karzinome der Bauchspeicheldrüse, der Speiseröhre, des Gebärmutterhalses, der Eierstöcke sowie der Leber werden erkannt. Zudem exprimieren Plattenepithelkarzinome der Lunge, des Ösophagus und des Gebärmutterhalses den CFR-1/PAM-1 Rezeptor (Vollmers et al., 1994; Hensel et al., 1999b; Hensel et al., 2001a; Brändlein et al., 2003).

Die Tumorspezifität des Antikörpers PAM-1 gibt Grund zur Hoffnung, dass auch dieser Antikörper Einzug in die Diagnose oder Therapie maligner Erkrankungen halten wird.

1.7 Ziel der Arbeit

Fasst man die bisherigen Ergebnisse der letzten 25 Jahre Antikörper-Technologie zusammen, so kann bemerkt werden, dass weder die XenoMouse Methode noch die phage display Technik einen Durchbruch in der Isolierung therapeutischer und diagnostischer Antikörper sowie Rezeptoren gebracht hat. Nur die Methode der humanen Hybridoma Technologie ermöglicht die Isolierung tumorspezifischer Antikörper, mit deren Hilfe es möglich ist, zudem neue tumorspezifische Rezeptoren zu entdecken. Darüber hinaus ist es möglich mit Hilfe einer genaueren Charakterisierung dieser Antikörper Einblicke in das humorale menschliche Immunsystem zu erhalten und Hinweise darauf zu finden, wie transformierte Zellen erkannt und abgestoßen werden. Über die immunkompetenten Strukturen und ihre entsprechenden Zielstrukturen lässt sich herausfinden, ob ähnliche Erkennungsmechanismen vorliegen wie bei der Abstoßung infektiöser Partikel oder ob hier andere Wege beschritten werden.

Das Ziel dieser Arbeit ist es mit Hilfe der humanen Hybridoma Technologie immunkompetente Antikörper zu isolieren und diese zu charakterisieren, um Erkenntnisse über ihren Ursprung, ihre genetische Basis sowie ihre Spezifität und Funktion zu erhalten. Dazu sollen menschliche Lymphozyten aus Patienten mit unterschiedlichen Tumorerkrankungen und von gesunden Donoren immortalisiert und die erhaltenen Antikörper analysiert werden. Mit Hilfe immunhistochemischer Methoden sollen die Spezifitätsanalysen durchgeführt werden, um die Verteilung der Rezeptoren zu bestimmen. Die

geplanten Sequenzanalysen der variablen Regionen der Immunglobulin-Ketten sollen Rückschlüsse auf die Entstehung und den genetischen Ursprung der Antikörper ermöglichen. Zudem soll durch funktionelle Analysen die spezifische Aktivität der Antikörper auf das Wachstum von Tumorzellen *in vitro* näher untersucht werden.

Die im Rahmen dieser Arbeit erhaltenen Ergebnisse sollen mit anderen Daten über humane Antikörper aus unserer Arbeitsgruppe verglichen werden, um über eventuelle Gemeinsamkeiten oder Unterschiede ein Muster für die Mechanismen der humoralen Immunität bei der Abwehr entarteter Zellen zu entwerfen.

2 Material und Methoden

2.1 Materialien

2.1.1 Bezugsquellen der verwendeten Verbrauchsmittel

Die Verbrauchsmittel wurden von den folgenden Firmen bezogen:

Agarose	Roth, Karlsruhe
Ampicillin	Sigma, München
BenchMark™ Protein-Leiter	Invitrogen, Karlsruhe
Cell Death Detection ELISA ^{PLUS}	Roche, Mannheim
Columbia Agar Base	Oxoid-Unipath, Wesel
Complete Protease Inhibitor	Boehringer, Mannheim
DAB	Sigma, München
Demaskierungslösung G	Biologo, Kronshagen
DyeDeoxy Termination Cycle Sequencing Kit	Applied BioSystems, Weiterstadt
Fico Liht H	Roche, Mannheim
FragEL-Klenow DNA Fragmentation Kit	Calbiochem-Novabiochem, Bad Soden
Gene Ruler™ 100bp DANN Leiter	MBI Fermentas, St.Leon-Rot
HiTrap™ IgM affinity column, 1ml,	Amersham Bioscience
JetsorbGel-Extraktions-Kit	Genomed, Bad Oeynhausen
Luria Broth-Medium	Gibco BRL, Eggenstein
MTT Reagenz	Sigma, München
Nitrocellulose (Porenweite 0,2 µm)	Schleicher und Schuell, Dassel
Oligonukleotide	MWG, Ebersberg
OPD	Dako, Hamburg
pCR-Skript AMP SK(+) Cloning Kit	Stratagene, Heidelberg
PEG 1500	Roche, Mannheim
Rotiphenol, Rotiphorese, Rotiquant	Roth, Karlsruhe
Tissue Tek® O.C.T.™	Sakura, Zoeterwoude, Niederlande
Trizol Reagent	Invitrogen, Karlsruhe

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

Für die Zellkultur wurden RPMI-1640 Medium, L-Glutamin und HAT supplement der Firma PAA (Wien) verwendet. FCS, Penicillin/Streptomycin, sowie AIMV-Medium wurden von der Firma GIBCO, Karlsruhe bezogen.

Alle Plastikwaren wurden von der Firma Greiner Labortechnik (Frickenhausen) geliefert.

Verwendete Antikörper

Anti human Ki67 nuclear antigen	Loxo, Dossenheim
Anti-Zytokeratin (CAM 5.2)-Reagenz	BD Bioscience, Heidelberg
ChromPure human IgA	Dianova, Hamburg
Chrompure human IgG	Dianova, Hamburg
Chrompure human IgM	Dianova, Hamburg
Goat anti human IgG	Dako, Hamburg
Goat anti human IgG, HRP	Dako, Hamburg
Mouse anti human Cytokeratin 5/6	Dako, Hamburg
Mouse anti human Cytokeratin 7	Dako, Hamburg
Mouse anti human Cytokeratin 8	Chemicon Int. Inc., USA
Mouse anti human Cytokeratin 18	Boehringer, Mannheim
Mouse anti human Cytokeratin AE1/AE3	Dako, Hamburg
Mouse anti human PSA	Dako, Hamburg
Mouse anti human Vimentin	Dako, Hamburg
Rabbit anti human IgA	Dianova, Hamburg
Rabbit anti human IgA, HRP	Dianova, Hamburg
Rabbit anti human IgA, IgG, IgM, kappa, lambda	Dako, Hamburg
Rabbit anti human IgM	Dako, Hamburg
Rabbit anti human IgM, FITC	Dako, Hamburg
Rabbit anti human IgM, HRP	Dako, Hamburg
Rabbit anti human kappa leichte Kette	Dako, Hamburg
Rabbit anti human lambda leichte Ketten	Dako, Hamburg
Rabbit anti Mouse Ig, HRP	Dako, Hamburg

Verwendete Enzyme

Ligase	Stratagene, Heidelberg
N-Glykosidase	Roche, Mannheim
O-Glykosidase	Roche, Mannheim
Restriktionsendonukleasen	MBI Fermentas, St.Leon-Rot
Reverse Transkriptase	Invitrogen, Karlsruhe
RNAse A	Sigma, München
Taq Polymerase	MBI Fermentas, St.Leon-Rot
Trypsin/EDTA	PAA, Wien

2.1.2 Geräte

Für die Arbeit wurden Geräte der folgenden Firmen verwendet:

Aquabidest-Anlage Milli-Q Plus PF	Millipore, Eschborn
Blotkammer	Bio-Rad, München
Brutschränke	Heraeus Thermotech, Hanau
DNA-Sequencer 373	Applied Biosystems, Weiterstadt
ELISA-Reader	Bio-Rad, München
FACScan	BD Bioscience, San Jose, USA
FPLC	Pharmacia, Freiburg
Gelelektrophoresekammer, Minigel Twin	Biometra, Göttingen
Kryostat 2800 Frigocut N	Reichert-Jung, Nussloch
Kühlzentrifuge J2-HS	Beckmann, München
Minifuge T	Heraeus, Hanau
Mikroskop Leica DMLB	Leica Mikrosystems, Wetzlar
Mikroskop Olympus BX50 + Videokamera	Olympus,
3CCD Sony	Sony Deutschland GmbH, Köln
Mikrotom Hn 40	Reichert-Jung, Heidelberg
PCR-Maschine Mastercycler <i>personal</i>	Eppendorf, Hamburg
PCR-Maschine Mastercycler <i>gradient</i>	Eppendorf, Hamburg
pH-Meter pH 525	WTW, Weilheim i. OB
Photometer Uvikon 810	Kontron Instrument, Schweiz
Pipetten	Gilson, Middleton, USA
Sonifikator Labsonic V	B. Braun, Melsungen
Spannungsgerät Gene Power Supply GPS	Pharmacia, Freiburg
Sterilbank Lamin Air HLB 2448	Heraeus, Hanau
Thermoblock	Neolab, Heidelberg
Ultrazentrifuge	Beckmann, München
Wasserbad, WB10	Memmert, Schwabach
Waage	Sartorius, Göttingen
Zentrifuge Biofuge 15R	Heraeus Sepatech, Osterode
Zytospin Zentrifuge Cytospin 2	Shandon, Großbritannien

2.1.3 Soft und Hardware

Zur Analyse von DNA- und Aminosäuresequenzen wurde das Programm DNAMAN 4.1 eingesetzt, Homologievergleiche wurden mit der V-Base-Datenbank (http://www.dnplot.de/input/human_v.html, bzw. <http://imgt.cines.fr/textes/vquest/>) durchgeführt.

Statistische Auswertungen und graphische Darstellungen erfolgten mit dem Programm EXCEL (Microsoft, USA).

Photos von Immunoblots wurden mit einem Flachbettscanner im Durchlicht mit einer Auflösung von 400 dpi digitalisiert.

Immunhistochemische Färbungen wurden mittels eines Olympus Mikroskops und einer Sony Videokamera über das Programm Image Access 3.02 erstellt.

FACS-Analysen wurden unter Verwendung von Lysis II Software (Becton Dickinson) im FACS-Gerät durchgeführt. Die Auswertung der Daten erfolgte mit Hilfe des WIN.MDI 2.8 Programms.

2.1.4 Medien, Lösungen, Puffer

Medien für die Zellkultur:

Kulturmedium

RPMI 1640

- 1% Glutamin
- 1% Penicillin/Streptomycin
- 10% FCS
- vor Gebrauch auf 37°C erwärmen

Selektionsmedium für die somatische Hybridisierung

RPMI 1640

- 1% Glutamin
- 1% Penicillin/Streptomycin
- 10% FCS
- 2% HAT supplement (50x) (5 mM Hypoxanthin; 20 μ M Aminopterin; 0,8 mM Thymidin)
- vor Gebrauch auf 37°C erwärmen

Einfrier-Medium

RPMI 1640

- 1% Glutamin
- 1% Penicillin/Streptomycin
- 20% FCS
- 10% DMSO

Lösungen für Präparation von Zellextrakten:

Hypotoner Puffer

20 mM HEPES, pH 7,5

3 mM KCl

3 mM MgCl₂

Complete mini (Proteasen- Inhibitoren-Cocktail)

Membran-Lysispuffer

0,5 mM HEPES, pH 7,5

0,1 mM EDTA

10% Glycerol

1% Triton X-100

Complete mini (Proteasen- Inhibitoren-Cocktail)

Extraktionslösung

5 x SDS-Extraktionspuffer

250 mM Tris/HCl, pH 6,8

10% SDS

wurde je nach Gebrauch auf 1x oder 2x- Puffer mit ddH₂O eingestellt

Lösungen für SDS-Gelelektrophorese:

Sammelgelpuffer

0,5 M Tris/HCl, pH 6,8

4% SDS

Trenngelpuffer

1,5 M Tris/HCl, pH 8,8

0,4% SDS

Acrylamid-Mix 30%

TEMED 100%

APS 10%

10 x SDS-Laufpuffer pH 8,4

250 mM Tris, pH 8,4

1,92 M Glycin

1% SDS

Lösungen für Western-Blot:

Blotpuffer

50 mM Tris, pH 8,3

0,1% SDS

20% Methanol

Blocklösung für Immunodetektion

1 x PBS, pH 7,4

2-5% Magermilchpulver (je nach Primär-Antikörper)

Lösungen zur Proteinquantifizierung:

BCA (Biciconinsäure)- Assay

Reagenz A

1% BCA

2% $\text{Na}_2\text{HCO}_3 \times \text{H}_2\text{O}$

0,16% $\text{Na}_2\text{C}_4\text{H}_4\text{O}_6 \times 2 \text{H}_2\text{O}$

0,4% NaOH

0,95% NaHCO_3

Reagenz B

4% $\text{CuSO}_4 \times 5 \text{H}_2\text{O}$

→Arbeitslösung: 50 Volumen Lösung A, 1 Volumen Lösung B

Lösungen für die Immunchemie:

Tris-NaCl

3 g Tris

40,5 g NaCl

ad 5 l A.dest.

→ pH 7,4 mit rauchender HCl einstellen

Zitronensäure

10 mM Zitronensäure-Monohydrat

ad 2 l A.dest

→ pH 5,5 mit NaOH-Plätzchen einstellen

Zitratpuffer

7,15 g Zitronensäure-Monohydrat

11,85 g NaHPO₄ x 2H₂O

ad 1 l A.dest.

FACS-Puffer

1 x PBS

0,01% NaN₃ (w/v)

Lösung durch 0,1 µm Nitrozellulosemembran filtriert

PBS

120 mM NaCl

2 mM KCl

3 mM KH₂PO₄

7 mM Na₂HPO₄

Lösungen für die Bakterien-Kultur:

LB-Medium

10 g/l Bacto-Trypton

5 g/l Bacto-Hefeextrakt,

10 g/l NaCl, für Platten 15 g/l Agar

→ pH 7,5 mit NaOH einstellen

→ autoklavieren

LB_{Amp}-Medium:

LB-Medium mit 100 µg/ml sterilfiltriertem Ampicillin

SOB-Medium

20 g/l Trypton

5 g/l Hefeextrakt

0,5 g/l NaCl

ad 1 l A. dest.

→ autoklavieren

10 ml 1M MgCl₂

10 ml 1M MgSO₄

SOC-Medium

2 ml sterilfiltrierte 20% Glucose

ad 100 ml SOB-Medium

2.1.5 Bakterienstamm

Für die Transformationsexperimente wurde der Bakterienstamm Epicurian Coli[®] XL-10-Gold[®] Kan (Stratagene, Heidelberg) verwendet.

2.1.6 Zelllinien

Die verwendeten Zelllinien stammen entweder ursprünglich aus dem Pathologischen Institut, Würzburg (Arbeitsgruppe Vollmers) oder wurden bei der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ, Braunschweig) bezogen. In Tabelle 1 sind die Angaben zu den einzelnen verwendeten Zelllinien sowie deren Verdopplungszeit und die Subkultivierungsdaten zusammengefasst.

Tab. 1: Zelllinien

Zelllinie	Organ	Karzinom-Typ	Wachstum	Verdopplungszeit [h]	Subkultivierung
23123/87	Magen	Adeno-karzinom	adhärent	30	1:8 alle 5-6 Tage
EPLC-272H	Lunge	Plattenepithel-karzinom	adhärent	60	1:3 alle 3-5 Tage
LOU-NH91	Lunge	Plattenepithel-karzinom	adhärent	80	1:4 alle 8 Tage
Colo 699	Lunge	Adeno-karzinom	adhärent	38	1:10 alle 3 Tage
DV-90	Lunge	Adeno-karzinom	adhärent	95	1:3 alle 3-4 Tage
ASPC-1	Pankreas	Adeno-karzinom	adhärent	40	1:10 alle 3 Tage
BXPC-3	Pankreas	Adeno-karzinom	adhärent	40	1:10 alle 3 Tage
CACO-2	Kolon	Adeno-karzinom	adhärent	80	1:10 alle 5-7 Tage
HT29	Kolon	Adeno-karzinom	adhärent	40-60	1:6 alle 6 Tage
Colo320	Kolon	Adeno-karzinom	semi-adhärent	38	1:3 alle 2-3 Tage
Colo206F	Kolon	Adeno-karzinom	adhärent	55-70	1:6 alle 7 Tage
HAB-1	B-Zelle/ Myelom	Hetero-myelom	semi-adhärent	25-30	1:10 alle 2 Tage
HL-60	B-Zelle	Leukämie	Suspension	25	1:5 alle 2 Tage
MOLT-4	T-Zelle	Leukämie	Suspension	40	1:3 alle 2-3 Tage

2.1.7 Mäuse

Für die Reklonierung von Antikörper-produzierenden Hybridomen wurden Milzzellen von Mäusen verwendet. Hierzu wurden Mäuse des Stammes NMRI nu/+ von der Firma Harlan Winkelmann, Borcheln, bezogen und im laboreigenen Tierstall gehalten.

2.1.8 Patientenmaterial

Die Lymphozyten zur Herstellung monoklonaler Antikörper wurden aus Milzen oder Lymphknoten von Karzinompatienten gewonnen und anschließend durch Fusion mit dem Heteromyelom HAB-1 immortalisiert (Vollmers *et al.*, 1989). Die klinischen Daten der Patienten sind in der Tabelle 2 aufgeführt.

Tab. 2: Klinische Daten der Lymphozyten-Spender zur Herstellung der mAK

Anti-körper	Organ	Tumor-Typ	TNM	Tumor Grad	Alter	Geschlecht	Lymphozyten-Quelle
PAM-1	Magen	Adenokarzinom	T3N2 M1	G4	58	M	Milz
LM-1	Lunge	Adenokarzinom	T2N1 Mx	G3	45	M	Lymphknoten
PM-1	Pankreas	Adenokarzinom	T1N1a Mx	G2-3	47	M	Milz
PM-2							
CM-1	Kolon	Adenokarzinom	T2N0 Mx	G2	78	M	Milz
CM-2							

2.2 Zellkultur und bakteriologische Methoden

2.2.1 Kultivierung der Bakterien

Die Bakterien wurden soweit nicht anders beschrieben nach Standardmethoden (Sambrook *et al.*, 1989) gehandhabt. Zur kurzzeitigen Konservierung wurden 50-200 µl Bakterien-Flüssigkulturen auf Agarplatten ausgestrichen, über Nacht bei 37°C bebrütet und

anschließend bei 4°C für 4 – 6 Wochen gelagert. Für eine dauerhafte Konservierung wurden Glycerin-Stammkulturen angelegt. Hierzu wurden 5 ml LB-Medium mit einer Einzelkolonie angeimpft, bis zu einer OD₆₀₀ von 1,5-2,0 gezogen und bei 3000 rpm für 10 min abzentrifugiert. Das Zellsediment wurde in 1 ml LB-Medium resuspendiert, mit sterilem Glycerin (87%) versetzt und bei -20°C gelagert.

Zur Kultivierung wurden 5-10 ml LB-Medium (mit 100 µg/ml) mit 5-10 µl einer Glycerin-Stammkultur bzw. eine Einzelkolonie von einer Agarplatte angeimpft und über Nacht bei 220 rpm und 37°C geschüttelt (Schüttler HT, Infors AG). Diese Über-Nacht-Kulturen fanden Verwendung bei der Isolierung von DNA oder zum Animpfen größerer Kulturvolumina. Das Flüssigmedium und die Platten wurden entsprechend des Resistenzgens auf dem Plasmid mit Ampicillin (50 µg/ml) versehen.

2.2.2 Kultivierung von Karzinomzelllinien und Hybridomen

Die Anzucht von Tumorzelllinien und Hybridomen erfolgte in Kulturmedium (RPMI-1640 Medium mit 10% (v/v) FCS und den Supplementen L-Glutamin (20 mM) und Penicillin/Streptomycin (je 1% v/v). Die Zellen wurden in Zellkulturflaschen bzw. Gewebekulturschalen bei 37°C und 5% CO₂ im Brutschrank inkubiert. Die Lungenkarzinom-Zelllinien Lou-NH91 und EPLC-272H, sowie die Leukämie-Zelllinie MOLT-4 wurden mit 20% FCS unter gleichen Bedingungen kultiviert. Die adhärennten Zelllinien wurden zur Subkultivierung mit 5 ml Trypsin/EDTA-Lösung von den Zellkulturflaschen abgelöst, die Reaktion mit 10 ml RPMI-1640 Medium (+ Supplemente) abgestoppt und die Zellen mit 1000 x g für 5 min pelletiert. Das Zellpellet wurde in RPMI-1640 Medium (+ Supplemente) aufgenommen und entsprechend den in Tabelle 3 angegebenen Daten subkultiviert. Die semi-adhärennten Zelllinien Colo320 und HAB-1 wurden durch leichtes Schütteln vom Flaschenboden abgelöst, 5 min bei 1000 x g zentrifugiert und das Zellpellet anschließend ebenfalls in RPMI-1640 Medium aufgenommen und subkultiviert. Suspensionszellen wurden bei 1000 x g für 5 min pelletiert. Bevor die verschiedenen Zelllinien der Durchführung bestimmter Assays zugeführt wurden, wurden sie zweimal mit PBS bzw. mit RPMI-1640 gewaschen.

Hybridomzellen wurden bis zu einer Zelldichte von 1×10^8 Zellen/ml angezogen, dann in sterile Zentrifugenröhrchen überführt und durch Zentrifugation pelletiert. Die Überstände der Hybridome wurden gesammelt und die Ig-Antikörperkonzentrationen der gesammelten

Hybridom-Kulturüberstände durch nephelometrische Messung bestimmt. Die Messungen wurden in einem Speziallabor der Neurologischen Klinik der Universität Würzburg durchgeführt. Die Kulturüberstände wurden bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert. 1/5 der Hybridomzellen wurde für die weitere Kultivierung verwendet. Die Hybridomzellen blieben im Durchschnitt 8 bis 10 Wochen in Kultur, bis die Antikörperproduktion geringer wurde.

2.2.3 Kryokonservierung eukaryotischer Zellen

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

2.2.4 Auftauen eukaryotischer Zellen

Die Zellen wurden aus dem Stickstofftank entnommen und in einem Wasserbad bei 37°C aufgetaut. Sofort nach dem Auftauen wurde die Zellsuspension mit 10 ml Kulturmedium versetzt und 5 min bei 1500 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt und das Zellpellet mittels frischen Kulturmediums in eine Kulturflasche überführt. Bevor frisch aufgetaute Zellen in einem Test verwendet wurden, wurden sie mindestens 1 Woche kultiviert und mehrmals subkultiviert.

2.2.5 Zellzahlbestimmung

Die Bestimmung der Zelldichte erfolgte mikroskopisch mittels einer Neubauer-Zählkammer. Dazu wurden 20 μl der Zellsuspension mit 180 μl einer 0,5%igen Lösung des Vitalfarbstoffes Trypanblau gemischt und in die Zählkammer pipettiert. Unter dem

Mikroskop wurden 2 bis 4 große Quadrate ausgezählt und die Lebendzellzahl pro einem großen Quadrat bestimmt. Die Zahl wurde mit 10^4 (Umrechnungsfaktor vom Volumen der Zählkammer pro Großquadrat (0,1 μ l) auf 1 ml Suspensionsvolumen) sowie mit dem Verdünnungsfaktor 10^1 multipliziert. Der erhaltene Wert stellt die Anzahl an lebenden Zellen /ml dar.

2.2.6 Herstellung humaner monoklonaler Antikörper durch somatische Hybridisierung

2.2.6.1 Gewinnung von Lymphozyten aus Patientenmaterial

Milzen und Lymphknoten wurden während der Operation entfernt und nativ und steril ins Pathologische Institut gebracht. Die Milz bzw. die Lymphknoten wurden in kleine Stückchen geschnitten und anschließend durch ein Gewebesieb (Maschengröße 60 mesh) gedrückt. Die erhaltene Zellsuspension wurde zweimal mit RPMI-1640 gewaschen und bei 1500 rpm 5 min zentrifugiert. Das Zellpellet wurde in 10 ml RPMI-1640 aufgenommen und mit einer Neubauer-Zählkammer die Zellzahl der Lymphozyten pro ml bestimmt. Die Zellen wurden entweder sofort fusioniert oder in Einfriermedium (RPMI 1640, 20% FCS, 10% DMSO) überführt und je 5×10^6 Zellen pro Einfrierröhrchen portioniert. Die Zellen wurden stufenweise gekühlt und bei -70°C eingefroren. Zur längerfristigen Lagerung wurden die Zellen in flüssigen Stickstoff überführt und bei Bedarf aufgetaut.

Zur Gewinnung von Lymphozyten aus dem Knochenmark wurde das mit gerinnungshemmenden Substanzen versetzte Patientenmaterial zweimal mit je 20 ml Kulturmedium gewaschen und ein Ficoll-Gradient durchgeführt. Hierzu wurden 20 ml des Trennmediums Fico Lite H in einem sterilen Zentrifugenröhrchen vorgelegt und langsam 20 ml der Knochenmarksuspension derart hinzugefügt, dass zwei Phasen entstanden. Nach 20minütiger Zentrifugation bei 1500 rpm ohne Bremse konnten dann die entsprechend dem Dichtegradienten (Ficoll-Gradient) aufgetrennten Zellarten in Form verschieden breiter Banden im Trennmedium differenziert werden. Die Bande, welche die Lymphozyten enthielt, wurde vorsichtig abgenommen und die Zellen erneut zweimal mit je 20 ml Medium gewaschen. Das Lymphozytenpellet wurde je nach Größe in 2 bis 10 ml Medium aufgenommen und die Anzahl der Lymphozyten pro ml bestimmt. Die Zellen wurden entweder sofort fusioniert oder für eine spätere Verwendung eingefroren wie bereits oben beschrieben.

2.2.6.2 Somatische Hybridisierung

Zur Herstellung humaner monoklonaler Antikörper wurde die Methode der humanen Hybridoma Technologie angewandt. Zur Immortalisierung wurden die Lymphozyten mit einem Fusionspartner, dem Heteromyelom HAB-1 (Faller et al., 1990), nach Standardprotokoll fusioniert und kultiviert (Vollmers et al., 1989). Dieses Heteromyelom wurde am Pathologischen Institut in Würzburg hergestellt und wird seit über 10 Jahren für die Herstellung stabiler Klone verwendet.

Für die Fusion wurden zunächst die Lymphozyten und die HAB-1 Zellen zweimal mit 10 ml RPMI-1640 Medium gewaschen und ihre genaue Anzahl bestimmt. Pro Fusion wurden ca. 5×10^7 Lymphozyten mit 2×10^7 HAB-1 Zellen verwendet. Das Verhältnis der Gesamtzellzahl von HAB-1 Zellen zu Lymphozyten wurde so gewählt, dass es immer bei 1:2 oder 1:3 lag. Die beiden Zelltypen wurden im Weiteren vermischt und je nach Gesamtzellzahl wurde eine entsprechende Menge an vorgewärmtem PEG 1500 (Polyethylenglycol 1500, Roche) vorsichtig zu dem Zellgemisch getropft. Das Gemisch wurde anschließend für genau 90 Sekunden bei 37°C in einem Wasserbad unter leicht rotierenden Bewegungen inkubiert. Danach wurden 30 ml RPMI-1640 Medium vorsichtig hinzugegossen um das PEG zu entfernen. Die Zellen wurden für 5 min bei 1500 rpm zentrifugiert und das Pellet in HAT-Selektionsmedium (Hypoxanthin-Aminopterin-Thymidin) resuspendiert. Die Zellsuspension wurde auf 24-Loch Zellkulturplatten derart verteilt, dass pro Well eine Gesamtzellzahl von 1×10^6 in 2 ml Selektionsmedium vorlag. Die Zellkulturplatten wurden bei 37°C und 5% CO₂ im Brutschrank inkubiert. Nach ca. einer Woche starben alle Zellen, die nicht zu einem Triom verschmolzen waren, ab. Einmal pro Woche wurden 50% des Mediums durch frisches Selektionsmedium ersetzt. Aus erfolgreich fusionierten Zellen wuchsen im Laufe der Zeit Zellklone heran. Das Wachstum der Triome wurde mikroskopisch kontrolliert. Nach 3 bis 4 Wochen wurden die Kulturüberstände der Hybridome durch Antikörper-ELISA auf ihren Immunglobulin-Gehalt getestet. Im weiteren Verlauf wurden die Klone, welche Antikörper produzierten und in das Kulturmedium sezernierten, der weiteren Testung zugeführt. Nachfolgend wurden die Kulturüberstände der ELISA-positiven Hybridoma-Klone einer immunhistochemischen Färbung auf dem autologen Tumor unterzogen. Hybridom-Klone, deren Überstände eine positive Reaktion mit autologen Tumorzellen zeigten, wurden sofort rekloniert, um eine höhere Stabilität der Klone zu erreichen und eine Monoklonalität zu garantieren.

2.2.6.3 Reklonierung der Antikörper-produzierenden Hybridome

Um eine höhere Stabilität der Hybridoma-Klone zu erreichen und zudem Monoklonalität zu garantieren wurde eine Reklonierung durchgeführt. Als Grundlage hierfür wurden zunächst Feederzellen gewonnen und ausplattiert. Hierzu wurden Mäuse getötet und die Milzen entfernt. Zur mechanischen Zerkleinerung wurden die Milzen durch ein Gewebesieb (Maschengröße 60 mesh) gedrückt. Die erhaltene Feederzellsuspension wurde zweimal mit RPMI-1640 gewaschen und bei 1500 rpm 5 min zentrifugiert. Das Zellpellet wurde in 1 ml RPMI-1640 aufgenommen und die Zellen für 30 min einer Strahlendosis von 30 gray ausgesetzt um die Proliferation der Milzzellen zu verhindern. Die Bestrahlung erfolgte im Institut für Medizinische Strahlenkunde der Universität Würzburg. Nach der Bestrahlung wurden die Zellen nochmals mit Kulturmedium gewaschen und auf 96-Loch Zellkulturplatten ausplattiert (100 µl pro well). Für vier Zellkulturplatten wurden die bestrahlten Zellen einer Maus-Milz verwendet. Die Hybridom-Zellen wurden gewaschen und ihre Zellzahl bestimmt. Danach wurde die Zellzahl so eingestellt, dass eine Zelldichte von 100 oder 10 Zellen pro 10 ml vorlag und die Zellen á 100 µl auf die 96-Loch Zellkulturplatten verteilt. Die Platten wurden mikroskopisch durchmustert und alle wells, welche nur eine Zelle enthielten, markiert. Einmal pro Woche wurden 50% des Mediums durch frisches Kulturmedium ersetzt. Es wurden nur solche Klone weiter herangezogen welche aus einer Ursprungszelle heranwuchsen. Nach ungefähr 2 Wochen wurden die Kulturüberstände der herangewachsenen monoklonalen Hybridome erneut mittels Antikörper-ELISA auf ihren Immunglobulin-Gehalt getestet. Nachfolgend wurden die Kulturüberstände der ELISA-positiven Hybridoma-Klone einer immunhistochemischen Färbung auf dem autologen Tumor unterzogen. Hybridoma-Klone, deren Überstände die beste positive Reaktion mit autologen Tumorzellen zeigten, wurden ausgewählt und weiter kultiviert.

2.2.7 MTT-Proliferationstest

Der Einfluss der Antikörper auf die Proliferation verschiedener Zelllinien wurde mit Hilfe eines nichtradioaktiven, kolorimetrischen Tests untersucht. Es handelt sich um den sog. MTT-Test (Carmichael et al., 1987; Mosmann, 1983), welcher in leicht veränderter Form durchgeführt wurde. Das Prinzip dieses Assays beruht auf dem Umsatz des farblosen

Tetrazoliumsalzes 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid durch mitochondriale Dehydrogenasen, wodurch eine spektrophotometrisch auswertbare Farbreaktion entsteht. Da diese enzymatische Substratumsetzung nur in stoffwechselaktiven Mitochondrien erfolgen kann, weist der Test ausschließlich lebende, proliferierende Zellen nach.

Hierzu wurden 96-Loch Zellkulturplatten mit Kulturmedium für 2h im Brutschrank (37°C, 5% CO₂) vorinkubiert um unspezifische Bindungsstellen abzublocken. Die Blocklösung wurde entfernt und die Löcher dreimal mit PBS gewaschen. Danach wurden 50 µl einer auf 1 x 10⁶ Zellen pro ml eingestellten Zellsuspension in die einzelnen Löcher pipettiert, so dass pro Loch eine Zellzahl von 5 x 10⁴ Zellen vorlag. Die zu testenden Antikörper und die entsprechenden Kontrollen wurden in verschiedenen Konzentrationen in einem Volumen von 50 µl zu den Zellen gegeben, so dass in jedem Loch ein Gesamtvolumen von 100 µl vorlag. Als Kontrollen dienten normales Kulturmedium um das Wachstum der Zelllinien unter normalen Bedingungen zu beobachten und verbrauchtes Kulturmedium um sicherzustellen, dass ein eventuell beobachteter Hemm-Effekt nicht aufgrund von zu wenig Nährstoffen auftrat. Die Zellkulturüberstände der verschiedenen Antikörperproduzierenden Hybridome wurden in verschiedenen Konzentrationen zu den Zellen gegeben. Von jeder Kontrolle sowie von jedem Antikörperüberstand wurden pro MTT-Test 8-fach Bestimmungen durchgeführt.

Nach 24- bzw. 48stündiger Inkubation der Platten bei 37°C und 7% CO₂ wurden 50 µl MTT-Lösung (4,5 dimethylthiazol)-2,5 diphenyltetrazoliumbromid in PBS) pro Loch zugegeben und die Zellen erneut für 30 min im Brutschrank inkubiert. Danach wurden die Zellkulturplatten 10 min bei 800 x g zentrifugiert und der Überstand aus den einzelnen Löchern abgesaugt. Das Zellpellet wurde im Folgenden in 150 µl DMSO, in welchem sich der kristallin ausgefallene Farbstoff löste, aufgenommen und resuspendiert. Die Farbintensität wurde im ELISA-Reader bei einer Wellenlänge von λ₅₄₀ nm und λ₆₉₀ nm bestimmt und aus der Differenz der Absorption bei 690 und 540 nm eine Aussage über die Antikörper-induzierte Stimulation oder Hemmung des Zellwachstums getroffen.

2.2.8 Apoptose-Test (Cell Death Detection ELISA^{PLUS}, Roche, Mannheim)

Das Ausmaß der Apoptoseinduktion durch die einzelnen Antikörper auf Tumorzelllinien wurde mit Hilfe des Cell Death Detection ELISA^{PLUS} analysiert. Dieser Test basiert auf

dem Prinzip eines quantitativen Sandwich-Enzym-Immunoassays, bei dem Peroxidase-konjugierte murine monoklonale Antikörper eingesetzt werden. Diese Antikörper sind gegen Histon- bzw. DNA-Komponenten von Mono- und Oligonukleosomen gerichtet, die beim Vorgang der Apoptose entstehen. Nach enzymatischer Umsetzung eines farblosen Substrates kann anhand der Farbintensität des Reaktionsproduktes die Menge der vorhandenen Nukleosomen und damit die relative Anzahl apoptotischer Zellen photometrisch bestimmt werden.

Hierzu wurden 100 µl der verschiedenen Zelllinien mit 100 µl der auf verschiedene Konzentrationen verdünnten Antikörperüberstände in einer 96-Loch Zellkulturplatte 24 bzw. 48 Stunden lang bei 37°C und 7% CO₂ inkubiert. Als Negativkontrolle wurden Zellen einerseits mit der gleichen Menge an frischem Kulturmedium und andererseits mit verbrauchtem Kulturmedium versetzt. Jeder Ansatz lag in doppelter Ausführung vor um Pipettierfehler zu minimieren. Die weitere Durchführung des Versuchs erfolgte mit geringfügigen Änderungen nach den Angaben des Herstellers (Handbuch: Cell Death Detection ELISA^{PLUS}, Roche, Mannheim) unter Verwendung der mitgelieferten Reagenzien und Pufferlösungen.

Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden die Zellen 10 min bei 200 x g zentrifugiert, der Überstand abgesaugt und 200 µl des Lysispuffers hinzugegeben, wodurch in den folgenden 30 min bei Raumtemperatur die Lyse der Zellen erfolgte. Nach erneutem Zentrifugieren wurden jeweils 20 µl des Überstandes in Streptavidin-beschichtete Mikrotiterplatten übertragen, bevor 80 µl des Immunoreagenz (1/20 Anti-DNA-POD, 1/20 Anti-histonbiotin, 18/20 Inkubationspuffer) hinzupipettiert wurden. Zusätzlich wurden eine im Test-Kit enthaltene Positivkontrolle und ein Blank-Ansatz mitgeführt. Nachdem die Platten 2 Stunden bei ca. 250 rpm durchmischt worden waren, wurden nach dreimaligem Waschen mit Inkubationspuffer (250 µl/well) 100 µl der ABTS-Lösung (1 ABTS-Tablette in 5 ml Substratpuffer) in jedes well pipettiert. Nach erneutem Durchmischen spiegelte sich die Intensität der Antikörper-induzierten Apoptose in einem intensiven grünen Farbniederschlag wider, der mit Hilfe eines ELISA-Readers bei λ_{405} nm gegen die Referenzwellenlänge von λ_{490} nm vermessen wurde.

2.3 Immunhistochemische Methoden

2.3.1 Antikörper-ELISA

Um zu erfahren welchen Isotyp von humanen Antikörpern die Hybridome sezernieren wurden zur ersten Testung die Zellkulturüberstände von wachsenden Klonen in einem ELISA-Assay untersucht. Dieser ELISA-Assay ist ein sog. „two antibody“- oder „sandwich assay“. Hierfür werden zwei Antikörper verwendet, die dasselbe Protein erkennen, nicht aber dasselbe Epitop. Zu Beginn des Versuches wird der erste nicht-konjugierte Antikörper an die Mikrotiterplatte gebunden und danach die Probe zugegeben. Alle Proteine mit dem passenden Epitop binden an den ersten Antikörper, die restlichen werden ausgewaschen. An dieser Stelle kommt der zweite, Peroxidase-konjugierte Antikörper zum Einsatz, welcher an einem anderen Epitop des bereits gebundenen Proteins bindet. Nun kann mittels Enzymreaktion das Zielprotein nachgewiesen und quantifiziert werden.

Hierzu wurden 96-Loch ELISA-Mikrotiterplatten über Nacht mit 50 µl/well unkonjugiertem anti-humanem IgM, IgA bzw. IgG vorinkubiert. Am nächsten Morgen wurden die Platten zweimal mit PBS gewaschen und anschließend die nicht besetzten Bindungsstellen des Plastiks durch Inkubation mit RPMI-1640 mit 10% FCS für 1 h bei RT blockiert. Die vorbeschichteten Platten wurden dreimal mit PBS gewaschen und anschließend für 1 h bei 37°C mit den unverdünnten Hybridom-Überständen bzw. den in PBS verdünnten Positivkontrollen für humanes IgM, IgA und IgG (ChromPure, siehe Tabelle 3) inkubiert. Danach wurde zweimal mit PBS, zweimal mit PBS/0,05% Tween und abschließend nochmals zweimal mit PBS gewaschen. Hiernach erfolgte eine einstündige Inkubation mit den jeweiligen Sekundär-Antikörpern bei 37°C. Die Sekundär-Antikörper (siehe Tabelle 3) wurden in PBS mit 0,05% Tween verdünnt. Ungebundene Antikörper wurden durch Waschen mit PBS (2x), PBS/Tween (1x), PBS (2x) und mit 0,3 M Zitratpuffer (2x) entfernt. Anschließend wurde die Färbelösung (0,03% Orthophenyl-Diamin und 0,02% Hydrogenperoxid in Zitratpuffer) hinzugegeben und für 15 min bei RT inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 3 M Schwefelsäure abgestoppt und die Absorption bei 492 nm in einem ELISA-Reader bestimmt.

Tab. 3: Übersicht über die verwendeten Antikörper bei ELISA

Antikörper	Ursprung	Spezifität	Funktion	Verdünnung	Konjugation
Anti human IgM	Rabbit	Mu Ketten	Vorbeschichtung	1:1000	-
Anti human IgA	Goat	a Ketten	Vorbeschichtung	1:1000	-
Anti human IgG	Rabbit	gamma Ketten	Vorbeschichtung	1:1000	-
Anti human kappa	Rabbit	kappa Ketten	Vorbeschichtung	1:800	-
Anti human lambda	Rabbit	lambda Ketten	Vorbeschichtung	1:400	-
Anti human lambda	Rabbit	lambda Ketten	Vorbeschichtung	1:400	-
Anti human IgM	Rabbit	Mu Ketten	Nachweis von humanem IgA	1:1000	Peroxidase
Anti human IgA	Goat	a Ketten	Nachweis von humanem IgG	1:5000	Peroxidase
Anti human IgG	Rabbit	gamma Ketten	Nachweis von humanem IgM	1:5000	Peroxidase
Anti human Ig, lambda, kappa	Rabbit	Ig, kappa, lambda Ketten	Nachweis von leichten Ig Ketten	1:1000	Peroxidase
ChromPure Human IgM	Human	-	Positivkontrolle IgM	1:100	-
ChromPure Human IgA	Human	-	Positivkontrolle IgA	1:100	-
ChromPure Human IgG	Human	-	Positivkontrolle IgG	1:100	-

2.3.2 Herstellung von Kryo-Schnitten

Nach der Entnahme wurde das native Gewebe portioniert, in Probenröhrchen eingebracht und mit Tissue-Tek-Gel eingedeckt. Im Anschluss wurden die Probenröhrchen in flüssigem Stickstoff für 15 min schockgefrostet und bei -70°C gelagert. Mit dem Kryostat wurden aus dem tiefgefrorenen Gewebe bei ca. -20°C 4 μm dicke Schnitte angefertigt und auf Objektträger aufgebracht. Die Objektträger wurden nach Möglichkeit über Nacht, mindestens jedoch für 2 Stunden an der Luft getrocknet, bevor sie weiterverarbeitet oder bei -20°C im Gefrierschrank aufbewahrt wurden.

2.3.3 Herstellung von Zytospin-Präparaten

Die jeweilig verwendete Zelllinie wurde mit Trypsin/EDTA vom Boden der Zellkulturflasche abgelöst und zweimal mit RPMI-1640 Medium gewaschen. Anschließend wurden die Zellen je nach Versuchsansatz entweder mit den jeweiligen Antikörpern bzw. Enzymen inkubiert (siehe 2.3.9) oder ohne weitere Behandlung zu Zytospin-Präparaten weiterverarbeitet. Hierzu wurden Objektträger und Zytofilterkarten in den Rotor der Zytospinzentrifuge eingespannt und die jeweilige Zellsuspension 2 min bei 50 rpm aufzentrifugiert. Unter dem Mikroskop wurde die Zelldichte überprüft. Die Zytospin-Präparate wurden über Nacht bei Raumtemperatur getrocknet und dann weiterverarbeitet oder bei -20°C aufbewahrt.

2.3.4. Herstellung von Paraffinschnitten

Native Gewebeproben wurden mit 4% Formalin fixiert und anschließend maschinell entwässert (Tissue Tek VIP, Firma Sakura). Danach wurde das Gewebe in flüssiges Paraffin überführt und mit Hilfe eines Histocenter-Gerätes (Firma SHANDON), eingebettet. Nach Erhärten des Paraffins können die fixierten Gewebelöcke geschnitten werden.

Hierzu wurden die Paraffinblöcke für ca. 30 min. in einen Gefrierschrank (-20°C) gelegt. Danach wurden mit Hilfe eines Mikrotoms $2\ \mu\text{m}$ dicke Gewebeschnitte hergestellt, die zuerst auf ein Wasserbad bei RT zur Entspannung des Schnittes aufgetragen wurden und dann zum Strecken auf ein Wasserbad bei ca. 30°C . Die gestreckten Gewebeschnitte wurden dann auf Super Frost Plus Objektträger aufgezogen und zum Trocknen über Nacht in den Brutschrank (37°C) gestellt und dann weiterverarbeitet oder an einem trockenen Ort bei Raumtemperatur bis zu ihrer weiteren Verwendung gelagert.

2.3.5 Immunperoxidase-Färbung von Kryoschnitten und Zytospin-Präparaten

Immunperoxidase-Färbungen ermöglichen die farbliche Kennzeichnung zellulärer Strukturen, deren antigene Epitope spezifisch von Primär-Antikörpern erkannt werden. Mit Hilfe Peroxidase-konjugierter Sekundär-Antikörper, welche gegen den Fc-Teil von

Immunglobulinen gerichtet sind, stellen sich nach enzymatischer Substratumsetzung die von den Primär-Antikörpern gebundenen Gewebeareale braun dar.

Die immunhistochemische Färbung von Kryoschnitten und Zytospin-Präparaten erfolgte nach demselben Färbeprotokoll:

Nachdem die berührtrockenen Objektträger 10 min in Aceton fixiert und anschließend 30 min an der Luft getrocknet worden waren, folgte dreimaliges Waschen mit Tris/NaCl (pH 7,4). Nach 5minütiger Inkubation in diesem Puffer wurden die Schnitte mit 100 µl einer 3% Milchpulverlösung (in PBS) zur Absättigung unspezifischer Proteinbindungen für 30 min in der feuchten Kammer inkubiert. Vor jedem der nun folgenden Inkubationsschritte wiederholte sich der dreimalige Waschvorgang mit Tris/NaCl. Zuerst wurden 100 µl des Primär-Antikörpers aufpipettiert. Hierfür wurden die gekauften Antikörperstammlösungen für die Positivkontrollen entsprechend mit 0,5% BSA/PBS-Lösung verdünnt (siehe Tabelle 5). Die Antikörper zur Kontrolle unspezifischer humaner IgM-Bindungen (Chrompure IgM, M6/47-88) sowie die Hybridomüberstände wurden mit BSA/PBS derart verdünnt, dass sie in einer Konzentration von 20 µg/ml vorlagen. Als Negativkontrolle wurde ein Schnitt mit 100 µl RPMI-1640 mitgeführt. Nach 30 min Inkubation wurden 100 µl der gegen humane bzw. murine Antikörper gerichteten Peroxidase-konjugierten Sekundär-Antikörper (Rabbit anti-Human, Rabbit anti-Mouse) auf die Schnitte aufgebracht. Hierfür waren die Antikörperstammlösungen zuvor im Verhältnis 1:50 verdünnt worden. Für die Verdünnung von anti-human Sekundär-Antikörpern wurde PBS mit 30% Kaninchenserum verwendet, für die Verdünnung von anti-Maus Sekundär-Antikörpern PBS mit 30% Humanserum. Nach weiteren 30 min wurden die Schnitte für 10 min in PBS gestellt, woraufhin sie 10 min lang abgedunkelt mit 100 µl der chromogenen Substratlösung DAB (1 Tablette 3,3' Diaminobenzidin-tetrahydrochloridsäure und eine Tablette H₂O₂ in 5 ml Leitungswasser) inkubiert wurden. Nach Spülen mit Aqua dest. und Gegenfärbung mit Hämalaun (5 min) wurden die Objektträger 10 min lang fließend gewässert und schließlich zur Konservierung mit auf 60°C erwärmter Glyceringelatine eingedeckt.

2.3.6 Immunperoxidase-Färbung von Paraffinschnitten mit den Antikörpern PAM-1 und LM-1

Da nicht in allen Fällen Kryomaterial von Karzinomen bzw. Normalgeweben zur Verfügung stand, wurde auch Formalin-fixiertes, paraffiniertes Gewebe für immunhistochemische Färbungen verwendet.

Die Immunperoxidase-Färbungen auf Paraffinschnitten wurden auf zwei verschiedene Arten durchgeführt. Während die Antikörper PM-1, PM-2, CM-1 und CM-2 vor der immunhistochemischen Färbung mit einer Demaskierungslösung vorbehandelt wurden (siehe 2.3.7), wurden die Antikörper PAM-1 und LM-1 nicht vorbehandelt.

Vor dem immunhistochemischen Färben wurde das Paraffin durch Inkubation in folgender Alkoholreihe entfernt: 2 x 5 min 100% Xylol

2 x 5 min 100% Ethanol

1 x 5 min Methanol (70 ml + 500 µl H₂O₂)

2 x 3 min 90% Ethanol

2 x 3 min 80% Ethanol

2 x 3 min 70% Ethanol

Danach wurden die Schnitte einmal mit Tris/NaCl gewaschen und im Anschluss in einem Schnellkochtopf für 5 min in Zitronensäure gekocht.

Danach wurden die unspezifischen Bindungsstellen für 30 min mit 0,5% BSA in PBS geblockt und die Schnitte dreimal mit Tris/NaCl gewaschen. Anschließend wurden die Schnitte für die Dauer von 2,5 h in einer feuchten Kammer bei 37°C mit dem jeweiligen Primär-Antikörper und diversen Kontrollen inkubiert. Die Antikörper wurden mit 0,5% BSA in PBS auf die jeweilige Konzentration eingestellt. Nach der Inkubation mit dem Primär-Antikörper wurden die Schnitte dreimal mit Tris/NaCl gewaschen und danach mit den entsprechenden Sekundär-Antikörpern für 1 h in der feuchten Kammer bei RT inkubiert. Hierauf wurde erneut dreimal mit Tris/NaCl gewaschen und die Schnitte im Anschluss für 10 min in PBS gestellt. Dann wurden die Schnitte für 10 min mit DAB (diaminobenzidine (0,05%) -hydrogen peroxide (0,02%)) in der abgedunkelten feuchten Kammer für 10 min bei RT inkubiert. Nach Abstoppen der Reaktion mit Aqua dest. und Gegenfärbung mit Hämalaun (5 min) wurden die Objektträger 10 min lang fließend gewässert und schließlich zur Konservierung mit auf 60°C erwärmter Glyceringelatine eingedeckt.

2.3.7 Immunperoxidase-Färbung von Paraffinschnitten mit den Antikörpern PM-1, PM-2, CM-1 und CM-2

Die Antikörper PM-1, PM-2, CM-1 und CM-2 wurden vor der immunhistochemischen Färbung in einer Demaskierungslösung (Demaskierungslösung G, Biologo, Kronshagen) gekocht, da nach Formalinfixierung der Gewebe viele Antigene durch Quervernetzung der Proteine für Antikörper nicht mehr zugänglich sind. Die Demaskierungslösung auf Glykolbasis wirkt dem entgegen und ermöglicht eine verbesserte Detektierbarkeit der Antigene. Vor der Behandlung mit der Demaskierungslösung wurden auch diese Schnitte mit einer Alkoholreihe entparaffiniert. Dazu wurden die Schnitte nacheinander in folgenden Lösungen inkubiert: 2 x 5 min 100 % Xylol

2 x 5 min 100% Ethanol

2 x 5 min 90% Ethanol

2 x 5 min 70% Ethanol

Danach wurden die Schnitte dreimal mit Aqua dest. gewaschen und im Anschluss im Wasserbad für 20 min in der Demaskierungslösung G (1:4 in Aqua dest.) gekocht. Danach wurden die Schnitte für 5 min in Tris/NaCl gestellt und anschließend 30 min mit 0,5% BSA in PBS inkubiert um die unspezifischen Bindungsstellen zu blockieren. Die immunhistochemische Färbung erfolgte nun nach dem gleichen Protokoll wie bei den Antikörpern PAM-1 und LM-1 (siehe 2.3.6).

2.3.8 Verwendete Antikörper für Immunperoxidase-Färbungen

Für die Immunperoxidase-Färbung von Kryoschnitten, Zytospins und Paraffinschnitten verschiedener Gewebe oder Zelllinien wurden neben den humanen monoklonalen Antikörpern sowohl Positiv- als auch Negativkontrollen verwendet. Als Negativkontrollen wurde zum einen jeweils eine Probe mitgeführt, die ausschließlich mit dem verwendeten Sekundär-Antikörper inkubiert wurde. Dazu wurde eine Kontrolle mit einem kommerziellen humanen IgM-Antikörper (Chrompure IgM, Dianova, Hamburg) durchgeführt um eine eventuell auftretende unspezifische Bindung humaner IgM-Antikörper kontrollieren zu können. Zusätzlich wurde aus gleichem Grund auch der Kulturüberstand eines IgM-Antikörperproduzierenden Hybridoms (M6/47-88) als Kontrolle verwendet, welcher jedoch nicht tumorspezifisch reagierte. Dabei wurden aus

Gründen der besseren Vergleichbarkeit die zu untersuchenden humanen monoklonalen Antikörper und die humanen IgM-Kontroll-Antikörper in den gleichen Konzentrationen eingesetzt. Als Positivkontrolle kamen je nach Gewebe- bzw. Tumortyp verschiedene kommerzielle Antikörper zum Einsatz. In Tabelle 5 sind die einzelnen verwendeten Kontrollen sowie ihre eingesetzten Konzentrationen als Übersicht dargestellt.

Kulturüberstände, welche die humanen monoklonalen Antikörper enthalten, wurden für die verschiedenen Färbungen immer in der gleichen festgelegten Konzentration an humanem IgM eingesetzt. Die genauen Angaben sind in Tabelle 4 zusammengefasst.

Alle Sekundär-Antikörper, die im Rahmen der Immunperoxidase-Färbungen zum Einsatz kamen, sind in Tabelle 6 dargestellt.

Tabelle 4: Übersicht über die Konzentration der verwendeten humanen monoklonalen Antikörper und der Negativkontrollen bei Immunperoxidase-Färbungen

Monoklonaler Antikörper	Ig-Isotyp/ Ursprung	Konzentration Kryofärbung	Konzentration Paraffinfärbung	Konzentration Zytospins
PAM-1	IgM/ human	-	9 µg/ml	-
LM-1	IgM/ human	20 µg/ml	25 µg/ml	20 µg/ml
PM-1	IgM/ human	20 µg/ml	25 µg/ml	20 µg/ml
PM-2	IgM/ human	20 µg/ml	25 µg/ml	20 µg/ml
CM-1	IgM/ human	20 µg/ml	25 µg/ml	20 µg/ml
CM-2	IgM/ human	20 µg/ml	25 µg/ml	20 µg/ml
Chrompure IgM	IgM/ human	20 µg/ml	9 µg/ml bzw. 25 µg/ml	20 µg/ml
M6/47-88	IgM/ human	20 µg/ml	25 µg/ml	20 µg/ml

Tabelle 5: Übersicht über die verwendeten Positivkontrollen bei Immunperoxidase-Färbungen

Kontroll-Antikörper	Gewebe	Karzinomtyp	Konzentration	Isotyp/Ursprung
Anti-human Cytokeratin 5/6 (CK5/6)	Lunge Ösophagus Zervix	Plattenepithel Plattenepithel Plattenepithel	1:50	IgG1/Maus
Anti-human Cytokeratin 7 (CK7)	Pankreas	Adeno	1:20	IgG1/ Maus

Kontroll-Antikörper	Gewebe	Karzinomtyp	Konzentration	Isotyp/Ursprung
Anti-human Cytokeratin 8 (CK8)	Lunge Magen Brust Leber Uterus Ovar Dünndarm	Adeno Adeno Adeno HCC Adeno Adeno Adeno	1:20	IgG1/ Maus
Anti-human Cytokeratin 18 (CK18)	Niere Nebenniere Blase Schilddrüse Hoden	Adeno Endokrin Urothel Endokrin Keimzellen	1:10	IgG1/ Maus
Anti-human Cytokeratin AE1/AE3	Colon	Adeno	1:50	IgG1/ Maus
Anti-human PSA	Prostata	Adeno	1:20	IgG1/Maus
Anti-human Ki67 Antigen	alle	alle	1:100	IgG1/Maus

Tabelle 6: Übersicht über die verwendeten Sekundär-Antikörper bei Immunperoxidase-Färbungen

Sekundär-Antikörper	Ursprung	Verdünnung	Gelöst in	konjugiert
Anti-human IgM	Rabbit	1:50	70% PBS +30% Kaninchenserum	Peroxidase
Anti-Maus Ig	Rabbit	1:50	70% PBS +30% AB-Plasma	Peroxidase

2.3.9 Enzymatischer Verdau von Proteinen auf Zytospins

2.3.9.1 Verdau mit N-Glykosidase

Die verwendeten Zellen wurden mittels Trypsin/EDTA vom Untergrund ihrer Kulturflaschen abgelöst und anschließend zur Regeneration der Membranproteine für 1 h in RPMI-1640 Medium + 10% FCS bei 4°C inkubiert. Danach wurden mit den Zellen wie unter 2.3.3 beschrieben Zytospin-Päparate angefertigt. Die Zytospins wurden über Nacht bei RT getrocknet. Nach der Trocknung wurden die Zellen für 10 min mit 100% Azeton fixiert und dreimal mit PBS gewaschen. Anschließend wurden die fixierten Zellen mit 5 mU/ml N-Glykosidase (in 100 µl Phosphatpuffer, pH 7,0) für 3 Stunden bei 37°C im

Brutschrank verdaut. Danach wurden die Zytospin-Präparate dreimal mit PBS gewaschen und sofort der immunhistochemischen Färbung mit den verschiedenen Antikörpern zugeführt. Als Negativkontrolle dienten Zytospins, die nur mit Phosphatpuffer inkubiert wurden, bzw. Zytospins, welche ohne Glykosidase-Behandlung einer normalen immunhistochemischen Färbung unterzogen wurden. Die Färbung erfolgte wie unter 2.3.5 beschrieben. Die fertige Färbung wurde abschließend mikroskopisch ausgewertet und die Ergebnisse mit einer Photoanlage und einem Olympus Mikroskop dokumentiert.

2.3.9.2 Verdau mit O-Glykosidase

Auch hier wurden die Zellen abtrypsinisiert und für 1 h in Kulturmedium auf Eis rekonstituiert. Nach Präparation der Zytospin-Präparate und anschließender Fixierung wurden die Zellen mit 20 μ U/ml O-Glykosidase (in 100 μ l Phosphatpuffer, pH 6,8) bei 37°C für 3 h inkubiert. Als Kontrolle wurden Zytospins nur mit Phosphatpuffer inkubiert oder ohne Inkubation normal gefärbt. Die immunhistochemische Färbung erfolgte wie unter 2.3.9.1 beschrieben.

2.3.10 Durchflusszytometrie (FACS-Analyse)

2.3.10.1 Vorbereitung der Zellen

Die verwendeten adhärennten Zellen wurden durch Behandlung mit Trypsin/EDTA vom Boden der Kulturflaschen abgelöst. Die Reaktion wurde mit 10 ml RPMI-1640 Medium (+ Supplemente) abgestoppt und die Zellen mit 1000 x g für 5 min pelletiert. Pellets von Suspensionszellen wurden durch Zentrifugation mit 1000 x g für 5 min erhalten. Sowohl adhärennte als auch flottierende Zellen wurden zweimal mit PBS gewaschen, in FACS-Puffer (PBS, 0,01% Na-Azid) aufgenommen und zur Rekonstitution der Zellmembranen für 30-60 min auf Eis gestellt. Anschließend wurden die Zellen auf eine Dichte von 1×10^6 Zellen/ml eingestellt und je 200 μ l der Zellsuspensionen in FACS-Reaktionsgefäße überführt, sodass pro Röhrchen eine Zellzahl von 2×10^5 Zellen vorlag. Die Zellen wurden für 5 min bei 4°C und 1400 rpm pelletiert, die Pellets resuspendiert und mit den Primär-Antikörpern für 15 min auf Eis inkubiert. Als Primär-Antikörper wurden 40 μ g/ml PAM-1 Antikörper in FACS-Puffer (Gesamtvolumen 200 μ l) verwendet. Als Isotyp-Kontrolle

fungierten 40 µg/ml Chrompure human IgM. Nach der Inkubation wurden die Zellen abzentrifugiert, der Überstand verworfen und die Pellets mit 500 µl kaltem FACS-Puffer gewaschen. Danach erfolgte eine 15minütige lichtgeschützte Inkubation mit dem FITC-gekoppelten Sekundär-Antikörper (Rabbit anti human IgM, FITC-gekoppelt, 1:50 in FACS-Puffer). Nach einem erneuten Waschgang wurden die Zellen in 200 µl kaltem FACS-Puffer aufgenommen und bis zur Messung lichtgeschützt auf Eis aufbewahrt.

2.3.10.2 FACS-Messung

Die Durchflusszytometrie ermöglicht die Erfassung von bis zu acht verschiedenen Parametern auf Einzelzellebene und das für eine fast beliebig hohe Anzahl an Zellen. Unter Verwendung von Standardgeräten wie dem hier benutzten FACScan der Firma Becton Dickinson können nicht nur morphologische Eigenschaften wie Größe und Granularität, sondern auch die Expression von Antigenen nach spezifischer Immunfärbung gemessen werden. Das Durchflusszytometer (FACS für Fluorescence Activated Cell Sorting/Scanning) besteht aus einem Flüssigkeits- und einem optischen System. Durch das unter Druck stehende Flüssigkeitssystem werden die Zellen hydrodynamisch fokussiert und mittels eines Trägerstromes mit konstanter Geschwindigkeit an einem Laser vorbeigeführt. Das auftreffende Licht wird zunächst in zwei Richtungen gestreut: das nach „vorne“ (Forwardscatter FSC) und „zur Seite“ (Sidewardscatter SSC) abgelenkte Licht ist ein Maß für Größe und Granularität der Zelle. Darüber hinaus kann der Laser die Chromogene in zwei Wellenlängen zur Emittierung von Lichtquanten anregen, die dann in elektrische Impulse umgewandelt werden und auf Sensoren treffen. Die Parameter der gemessenen Ergebnisse können entweder einzeln im Histogramm oder gegeneinander im Dot Plot aufgetragen werden.

Die Proben wurden mit Anregung durch einen 488nm-Laser unter Verwendung von Lysis II Software (Becton Dickinson) im FACS-Gerät gemessen. Die Bindung der humanen IgM-Antikörper wurde über die Intensität des gekoppelten FITC auf FL-1 (Kanal 1, grüne Fluoreszenz) gemessen. Die Darstellung des Kanals 1 erfolgte logarithmisch. Die Grundeinstellung zur Bestimmung der Eigenfluoreszenz, ohne die eine Zunahme der Fluoreszenz durch Antikörper-Bindung nicht möglich wäre, wurde für jede Zelllinie mit einem zugehörigen Leerwert vorgenommen. Pro Probe wurden bei schneller Zählrate 15.000 Zellen gemessen, die Zählung erfolgte ohne Einschränkung.

Die Auswertung der Daten erfolgte mit Hilfe des WIN.MDI 2.8 Programms auf einem Windows NT-Rechner.

2.4 Biochemische Methoden

2.4.1 Präparation von Membranproteinen aus Zelllinien

Die verschiedenen Karzinomzelllinien wurden auf 20 Gewebekulturplatten (150 mm) bis zur Konfluenz angezogen. Die Zellen wurden zweimal mit PBS gewaschen und anschließend mit einem Zellschaber von den Platten gelöst. Nach Abzentrifugieren der Zellen bei 1000 x g für 5 min wurden diese in 20 ml hypotonem Puffer (20 mM HEPES pH 7,4, 3 mM KCl, 3 mM MgCl₂, complete protease inhibitor) resuspendiert und für 15 min auf Eis inkubiert um ein Anschwellen der Zellen durch osmotischen Druck zu erreichen. Das Aufbrechen der Zellen erfolgte durch Beschallung im Sonificator (5 min, 0,7 sec Intervall, max. Intensität). Die Zellsuspension wurde anschließend bei 10000 x g für 15 min zentrifugiert um die Kerne aus dem Lysat zu entfernen. Der Überstand wurde in 5 ml Ultrazentrifugen-Röhrchen überführt und die Membranen durch Ultrazentrifugation bei 100000 x g für 30 min in einem SW55-Rotor pelletiert. Der Überstand wurde verworfen, das Membranpellet zweimal mit 5 ml hypotonem Puffer gewaschen und anschließend bei RT getrocknet. Das Pellet wurde anschließend in Membranlysispuffer zur Extraktion der Membranproteine aufgenommen. Bis zur weiteren Verwendung wurden die Membranprotein-Extrakte bei -20°C gelagert.

2.4.2 Proteinbestimmung

Die Bestimmung der Proteinkonzentration erfolgte je nach Anforderung und nach Zusammensetzung des vorliegenden Proteinextraktionspuffers nach zwei verschiedenen Methoden. Für die Quantifizierung der Proteinkonzentration in einem Triton-Puffer wurde die Methode nach Bradford herangezogen. Für Bestimmungen der Proteinkonzentration in einem SDS-Puffer wurde die BCA-Methode verwendet, da SDS im Bradford-Assay zu Störungen der Protein-spezifischen Farbreaktion führt.

2.4.2.1 Quantifizierung nach Bradford

Die Bestimmung nach Bradford (1976) erfolgte durch ein kommerziell erhältliches Färbereagens (Rotiquant, Roth, Karlsruhe), dem eine kolloidale Anfärbung der Proteine mit dem Farbstoff Coomassie zugrunde liegt. Innerhalb eines linearen Bereichs kann somit der Farbumschlag der Probe proportional zur vorhandenen Proteinmenge Aufschluss geben. Die Ermittlung der Proteinkonzentration erfolgte nach Angaben der Hersteller. Zur Erstellung einer Eichgeraden wurde ein Proteinstandard mit einer definierten Proteinmenge (1 mg/ml BSA) verwendet. Hiervon wurden 1, 2, 5, 10, 15 und 20 µg BSA mit 1 ml Bradford-Reagens (1:5 in PBS verdünnt) vermischt und die Extinktion bei λ_{595} gegen einen Leerwert, welcher nur Bradford-Reagens enthielt, im Photometer bestimmt. Jede Probe wurde in zwei Verdünnungen als Doppelbestimmung ebenfalls mit 1 ml des Reagenzes versetzt. Anhand der ermittelten Extinktion konnte aus der Standardgeraden die Proteinkonzentration ermittelt werden.

2.4.2.2 Quantifizierung mittels BCA-Assay

Zur Quantifizierung der Proteinkonzentration in SDS-haltigen Proteinextrakten wurde die BCA-Methode (Smith et al., 1985) verwendet, da bei dieser Methode im Gegensatz zur Proteinbestimmung nach Bradford eine SDS-Konzentration von 1% toleriert werden konnte. Hierzu wurde 1 Volumen des Proteinextraktes mit 20 Volumen des Standard Working Reagent (SWR) für 2 h bei RT inkubiert und der Farbumschlag bei A_{562} bestimmt. Zum Ermitteln der Absolutwerte wurde eine Eichgerade mit BSA (1 mg/ml) erstellt.

2.4.3 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die elektrophoretische Auftrennung von Proteinen erfolgte durch vertikale Flachgelelektrophorese auf 1,0 mm dicken Acrylamid-Gelen. Die SDS-PAGE wurde nach der von Laemmli (1970) veröffentlichten Methode durchgeführt. Je nach gewünschter Auftrennung wurden 8 bzw. 10%ige (v/v Acrylamid) Gele gemäß der von Sambrook *et al.* (1989) beschriebenen Zusammensetzung hergestellt. Es wurden für die Arbeiten

ausschließlich Elektrophorese-Einheiten der Fa. Biometra, Göttingen (Gelelektrophoresekammer, Minigel Twin) verwendet. Die aufzutrennenden Proteinlösungen wurden je nach Konzentration in 5x bzw. 1x Probenpuffer (100 mM Tris/Cl pH 6,8, 20 mM DTT, 4% (w/v) SDS, 0,2% (w/v) Bromphenolblau, 20% (v/v) Glycerol) aufgenommen und durch Aufkochen bei 98°C für 5 min denaturiert. Die Proben wurden anschließend auf das Gel aufgetragen und für ca. 1,5 h bei 20 mA aufgetrennt. Das Gel wurde dann für den Western Blot bzw. die Coomassie-Färbung verwendet.

2.4.4 Coomassie-Färbung

Das Gel wurde nach der Elektrophorese zur Fixierung der Proteine 15 min in Entfärbelösung (30% (v/v) Methanol, 10% (v/v) Eisessig in H₂O) inkubiert und anschließend für 30 min bis 1 h in Coomassie-Färbelösung (0,025% (w/v), Coomassie Brilliant Blue R 250, 45% (v/v) Methanol, 10% (v/v) Eisessig in H₂O) angefärbt. Nach vollständiger Anfärbung des Gels wurde dieses mit Entfärbelösung soweit entfärbt, bis sich die gefärbten Protein-Banden deutlich vom entfärbten Hintergrund abhoben.

2.4.5 Western-Blotting

Die Proteine wurden wie unter 2.4.3. beschrieben durch die SDS-PAGE aufgetrennt und anschließend auf eine Nitrozellulose-Membran übertragen (Towbin et al., 1979). Der Transfer der aufgetrennten Proteine erfolgte in einer Semi-Dry Apparatur der FA. Biorad. Hierzu wurden das Filterpapier und die Nitrozellulose in Blotpuffer (39 mM Glycin, 48 mM Tris, 0,037% (w/v) SDS, 20% (v/v) Methanol) äquilibriert und anschließend das Blotsandwich zusammengesetzt. Der Transfer erfolgte unter einem angelegten Strom von 1 mA/cm² Nitrozellulose-Membran für die Dauer von etwa 1 h 45 min. Zur Kontrolle des Transfers wurde die Nitrozellulose mit Ponceau S-Lösung (0,2% (w/v) Ponceau S, 3,0% (w/v) TCA) reversibel angefärbt, der Proteinstandard markiert, die Membran durch Spülen mit Waschpuffer (0,0 % (v/v) Tween-20 in PBS) wieder entfärbt und ihrer weiteren Verwendung zugeführt.

2.4.6 Immunodetektion

Das Blocken nicht besetzter Bindungsstellen erfolgte durch eine einstündige Inkubation der Nitrozellulose mit Blockpuffer (2-5% Magermilchpulver in PBS). Anschließend erfolgte eine Inkubation für 1,5 h mit dem jeweiligen Primär-Antikörper (Antikörperüberstand) (Verdünnung siehe Tab. 5). Als Kontrolle wurde eine zweite Nitrozellulose-Membran mit einem humanen IgM-Kontroll-Antikörper (Chrompure human IgM) in der gleichen Konzentration inkubiert. Nicht gebundene Antikörper wurden durch mehrmaliges Waschen (3 x 5 min) mit Waschpuffer entfernt. Die Detektion der gebundenen Antikörper erfolgte mit einem Peroxidase-gekoppelten Sekundär-Antikörper (rabbit anti human IgM), mit dem die Nitrozellulose in den entsprechenden Verdünnungen (in Blocklösung) für 1 h inkubiert wurde. Ungebundene Antikörper wurden dann durch dreimaliges Waschen mit Waschpuffer entfernt. Die Farbreaktion erfolgte durch eine Chemilumineszenz-Reaktion mit dem Pierce Supersignal-Kit entsprechend der Herstellerbeschreibung. Die Detektion der Chemilumineszenz-Reaktion erfolgte auf einem Kodak BioMax Film, wobei der Film zwischen 30 sec und 15 min exponiert wurde.

Tab. 7: Detektionsbedingungen für Immunodetektion von Western-Blots

Primär-Antikörper	Blocklösung	Konzentration des Primär-Antikörpers	Verdünnung des Sekundär-Antikörpers
LM-1	3% Milchpulver in PBS	13 µg/ml	1:1000
PM-1	2% Milchpulver in PBS	50 µg/ml	1:1000
PM-2	2% Milchpulver in PBS	60 µg/ml	1:1000
CM-1	5% Milchpulver in PBS	50 µg/ml	1:2000
CM-2	5% Milchpulver in PBS	30 µg/ml	1:750

2.4.7 Enzymatischer Verdau von Membranprotein-Extrakten mit N- Glykosidase und nachfolgende Western Blot-Analyse

Membranextrakte von Tumorzelllinien wurden präpariert wie unter 2.4.1 beschrieben. Die Membranproteine wurden nachfolgend für 16 h bei 37°C mit 2 U/ml N-Glykosidase in

einem Deglykosilierungs-Puffer (50 mM Phosphatpuffer, pH 7,2) im Brutschrank inkubiert. Als Kontrolle wurden Membranextrakte nur mit Deglykosylierungs-Puffer behandelt. Danach wurden die Membranextrakte auf 10%ige Acrylamid-Gele aufgetragen und über SDS-PAGE getrennt. Die aufgetrennten Membranproteine wurden im Anschluss auf Nitrozellulose geblottet. Die Nitrozellulose wurde zur Immunodetektion mit dem Antikörper PM-1 sowie dem entsprechenden Peroxidase-gekoppelten Sekundär-Antikörper inkubiert (Detektionsbedingungen siehe Tabelle 7).

2.4.8 Antikörperreinigung über FPLC

Für FACS-Analysen musste der PAM-1 Antikörper aus den Hybridom-Kulturüberständen aufgereinigt werden. Hierzu wurde eine FPLC-Apparatur von Pharmacia verwendet. Die den IgM-Antikörper PAM-1 produzierenden Hybridomzellen wurden hierzu in einem speziellen serumfreien Zellkulturmedium (AIMV-Medium, Gibco) herangezogen und der Gehalt an IgM im Kulturüberstand nephelometrisch bestimmt. Zur Aufreinigung wurden 250 ml Kulturüberstand (20 µg IgM/ml) mit 1 M $(\text{NH}_4)_2 \text{SO}_4$ versetzt, der pH-Wert auf 7,5 eingestellt und die Lösung filtriert. Zur Bindung von IgM wurde eine spezielle Säule (HiTrapTM IgM affinity column, 1 ml, Amersham Bioscience) verwendet. Die Säule wurde zu Beginn der Reinigung mit filtriertem Puffer A (Binding-Puffer, 20 mM Phosphatpuffer, 1 M $(\text{NH}_4)_2 \text{SO}_4$, pH 7,5) äquilibriert. Anschließend wurde der auf Eis gekühlte Kulturüberstand über den Superloop mit einer Flussrate von 2 ml/min auf die Säule aufgetragen. Nach dem Auftrag des Überstandes wurde die Säule für 20 min und einer Flussrate von 2 ml/min mit Puffer A bis zu einer Basislinienkonstanz gewaschen um alle nicht gebundenen Proteine zu entfernen. Anschließend wurden die an die Säule gebundenen IgM-Antikörper durch Beimischung von Puffer B (Elutions-Puffer, 20 mM Phosphatpuffer, 30% Isopropanol, pH 7,5) eluiert und in 1ml Fraktionen gesammelt. Der Gehalt an IgM in den einzelnen Fraktionen wurde im Folgenden nephelometrisch bestimmt und die Reinheit und Intaktheit des gereinigten Antikörpers über SDS-PAGE und Western-Blot Analyse überprüft. Bevor der gereinigte PAM-1 Antikörper in den Assays zum Einsatz kam, wurde er mit Hilfe von NAPTM-10 Säulen (Amersham Pharmacia Biotech) in PBS umgepuffert.

2.5 Molekularbiologische Methoden

2.5.1 RNA-Isolierung aus Geweben

Die Isolierung und Reinigung von RNA aus Geweben wurde mit TRIZOL[®] Reagent (Invitrogen, Karlsruhe) durchgeführt. Diese Methode beruht auf der Phenol/Guanidin-isothiocyanat Reinigung nach Chomczynski und Sacchi (1987). Hierzu wurden mit einem Kryostat 100 5 µm dicke Schnitte von verschiedenen kryokonservierten Geweben angefertigt, in 1 ml TRIZOL[®] Reagent aufgenommen und auf Eis gestellt. Zur Homogenisierung des Gewebes wurde mit unterschiedlich starken Kanülen und einer 1 ml Spritze geschert. Das Gewebe musste nach Beendigung so homogen sein, dass es problemlos durch eine Insulinkanüle aufgezogen werden konnte. Hieran schloss sich ein zweiter Isolierungsschritt an um Muskelgewebe und Fettgewebe aus dem Ansatz zu entfernen. Hierzu wurden die Ansätze für 10 min bei 10000 x g und 4°C zentrifugiert. Das Zellpellet enthielt nun extrazelluläre Membranen, Polysaccharide und hochmolekulare DNA, während im Überstand die RNA zu finden war. Die Überstände wurden in ein frisches Reaktionsgefäß überführt und anschließend für 5 min bei RT inkubiert um eine vollständige Dissoziation der Kernprotein-Komplexe zu ermöglichen. Danach wurden 200 µl Chloroform zu den Lösungen gegeben, für 15 sec kräftig gemischt und die Ansätze für 2 min bei RT inkubiert. Die Ansätze wurden im Folgenden für 15 min bei 12000 x g und 4°C zentrifugiert. Nach der Zentrifugation hatte sich die Mischung in eine untere, rote Phenol-Chloroform-Phase und eine obere, farblose wässrige Phase separiert. Die wässrige RNA enthaltende Phase wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und die RNA mit 500 µl Isopropanol für 15 min bei RT gefällt. Die RNA wurde bei 12000 rpm 10 min bei 4°C pelletiert. Das RNA-Pellet wurde mit 1 ml 75% Ethanol gewaschen, zentrifugiert und an der Luft getrocknet. Die RNA wurde je nach Größe des Pellets in 30-50 µl RNase-freiem DEPC-H₂O aufgenommen, 10 min bei 60°C inkubiert, vermessen und bis zur weiteren Verwendung bei -80°C gelagert.

2.5.2 RNA-Isolierung aus Tumorzelllinien

Die Isolierung und Reinigung von RNA, welche anschließend in der reversen Transkription zur Synthese von cDNA verwendet wurde, wurde nach einer modifizierten Methode von Chomczynski und Sacchi, 1987 durchgeführt. Zur Vorbereitung wurden 1 x

10^7 Zellen zweimal mit eiskaltem PBS gewaschen und mit $1000 \times g$ für 5 min pelletiert. Das Zellpellet wurde in 1 ml GTC-Puffer (4 M Guanidinium-Isothiocyanat, 25 mM Na-Citrat, 0,5% (v/v) Sacrosyl, pH 7,0) lysiert. 500 μ l dieses Lysates wurden mit 500 μ l Roti-Phenol (Roth, Karlsruhe), 100 μ l Na-Azetat (pH 5,2 in DEPC-H₂O) und 200 μ l Chloroform gemischt. Die Probe wurde für 10 min auf Eis inkubiert und anschließend für 15 min und 4°C bei 13000 rpm zentrifugiert. Die obere Phase wurde abgenommen und nochmals einem Phenol/Chloroform Reinigungsschritt zugeführt. Danach wurde die RNA mit 2 Volumen Isopropanol 20 min auf Eis ausgefällt und für 20 min bei 4°C und 13000 rpm pelletiert. Das RNA-Pellet wurde dann zweimal mit 100% Ethanol und einmal mit 70% Ethanol gewaschen, getrocknet und in 50 μ l DEPC-H₂O aufgenommen und vermessen. Bis zur weiteren Verwendung wurde die isolierte RNA bei -80°C gelagert. Alle Kunststoffwaren, welche für die RNA-Isolierung und Weiterverarbeitung benötigt wurden, sind vor Gebrauch autoklaviert worden. Glas- und Metallwaren wurden mit 2 N NaOH, DEPC-H₂O und technischem Alkohol gereinigt.

2.5.3 Konzentrationsbestimmung von RNA

1 μ l RNA wurde mit 799 μ l DEPC-H₂O gemischt und die Extinktion bei einer Wellenlänge von 260 nm in einer Quarzküvette gemessen. Die Konzentration errechnet sich nach der folgenden Formel:

$$\frac{E_{260} \times 42 \times 800}{1000} = \text{RNA } [\mu\text{g}/\mu\text{l}]$$

2.5.4 Reverse Transkription von mRNA in cDNA

5 μ g RNA (1-5 μ l Lösung) wurden mit 1 μ l Oligo-dT₁₅ (1 μ g/ μ l) und 2 μ l random primer (40 μ M) gemischt und auf ein Gesamtvolumen von 8 μ l mit H₂O aufgefüllt. Es erfolgte die Denaturierung der RNA für 10 min bei 65°C und anschließend die Abkühlung der Probe auf Eis. Zu dieser wurden dann 17 μ l Mastermix, bestehend aus 5,2 μ l DEPC-H₂O, 5 μ l 5fach Reverse-Transkriptase-Puffer (First-Strand-Puffer), 2,5 μ l dNTPs (je 10 mM), 2,5 μ l DTT (250 mM), 0,8 μ l RNasin (400 U) und 1 μ l M-MLV Reverse Transkriptase (200 U)

pipettiert. Die Synthese der cDNA erfolgte für 70 min bei 37°C und wurde anschließend durch eine Erhitzung auf 95°C für 5 min abgebrochen. Die cDNA wurde sofort in einer PCR-Reaktion eingesetzt oder bei –20°C gelagert.

2.5.5 Polymerasekettenreaktion (PCR)

1-5 µl der cDNA wurden mit dem PCR-Mastermix gemischt und auf 25 µl Gesamtvolumen mit H₂O aufgefüllt. Der PCR-Mastermix besteht aus 2,5 µl 10fach Taq-Polymerase-Puffer, 0,5 µl 10 mM NTPs, 1,5 -2 µl 25 mM MgCl₂, je 0,5 µl 20 pM 3' bzw 5' Primer und 0,2 µl Taq-Polymerase (1 U). Die Amplifikations-Bedingungen für die verschiedenen PCR-Produkte sind in der folgenden Tabelle aufgeführt.

Tab 8: Übersicht der zur Amplifikation der verschiedenen cDNAs verwendeten PCR-Programme

Produkt	Annealing [°C]	MgCl ₂ [mM]	Extensions- zeit [sec]	Zyklen	Produktgröße [bp]
GAPDH	65	2	30	20 ²	482
VH 1,2,5,6	60	1,5	45	35	300 – 350 ^{1,3}
VH 3,4	65	1,5	45	35	300 – 350 ¹
VL	55	1,5	45	40	300 – 380 ¹
CFR	55	2,0	45	40	750

¹ Die Größe der PCR-Fragmente ist abhängig von der Länge der CDR III-Region.

² Für die semiquantitative PCR wurden Proben nach unterschiedlicher Zyklenzahl abgenommen und die verglichen, bevor eine Sättigung erreicht wurde.

³ Für die VH-Familien 1, 2, 5 und 6 konnten in dieser Arbeit keine PCR-Fragmente amplifiziert werden.

2.5.6 GAPDH-PCR zur Qualitätskontrolle der cDNA-Synthese und zur Quantifizierung der cDNA-Menge

Die Qualität der cDNA wurde über eine GAPDH-spezifische PCR kontrolliert. Die PCR-Bedingungen sind unter Punkt 2.5.5 dargestellt.

Um für nachfolgende semiquantitative PCRs die cDNA-Mengen aufeinander einzustellen, wurden bei der GAPDH-PCR nach 20, 22 und 24 Zyklen jeweils 7 µl des PCR-Ansatzes entnommen und über ein Agarosegel aufgetrennt. Die Intensitäten der DNA-Banden wurden visuell miteinander verglichen und durch Titration der eingesetzten cDNA-Mengen aufeinander abgestimmt. Die erhaltenen GAPDH-Banden sollten nach erfolgtem Mengenabgleich alle die gleichen Intensitäten aufweisen.

2.5.7 Primer-Sequenzen

Die Sequenzen der PCR-Primer für die Amplifikation der variablen Region der schweren Kette wurden aus einer Veröffentlichung von Marks *et al.* (1991), die für die variable Region der leichten Kette von Küppers *et al.* (1993) entnommen. Die Primer-Sequenzen zur Amplifikation von CFR-1 wurden mit Hilfe des DNAsis-Programms selbst bestimmt.

Tab. 9: Sequenzen der für die PCR verwendeten Oligonukleotide

<> an dieser Stelle wurde bei der Synthese des Oligonukleotides nach dem Zufallsprinzip eines der angegebenen Nukleotide eingebaut

Gen	Primer-Sequenz
<u>Variable Region der schweren Kette</u>	
VH1	5´ CCT CAG TGA AGT <CT>TC CTG CAA GGC 3´
VH2	5´ GTC CTG CGC TGG TGA AA<GC> CCA CAC A 3´
VH3	5´ GGG GTC CCT GAG ACT CTC CTG TGC AG 3´
VH4	5´ GAC CCT GTC CCT CAC CTG C<AG>C TGT C 3´
VH5	5´ AAA AAG CCC GGG GAG TCT CTG A<AG>G A 3´
VH6	5´ ACC TGT GCC ATC TCC GGG GAC AGT G 3´
JH1-5	5´ GGT GAC CAG GGT <TGC>CC <TC>TG GCC CCA G 3´
JH6	5´ GGT GAC CGT GGT CCC TTG CCC CCA G 3´

Variable Region der leichten Kette

VL2-3	5´	ACC TAG GAC GGT CAG CTT GGT CCC	3´
VL4-5	5´	ACC TAA AAC GGT GAG CTG GGT CCC	3´
JL1	5´	CAG TCT GTG TTG ACG CAG CCG CC	3´
JL2	5´	CAG TCT GCC CTG ACT CAG CCT GC	3´
JL3A	5´	TCC TAT GTG CTG ACT CAG CCA CC	3´
JL3B	5´	TCT TCT GAG CTG ACT CAG GAC CC	3´
JL6	5´	AAT TTT ATG CTG ACT CAG CCC CA	3´

GAPDH (Kontroll-PCR)

GAPDH for	5´	GTG GAA GGA CTC ATG ACC ACA GTC	3´
GAPDH rev	5´	CAT GTG GGC CAT GAG GTC CAC CAC	3´

CFR-1

CFR-1 for	5´	CAA GAG CAG ACA GGT CAG GTG G	3´
CFR-1 rev	5´	CCG GAA GTT CTG TTG GTA TGA G	3´

2.5.8 Agarose-Gelelektrophorese

Für die Auftrennung von DNA wurden 1,5% (w/v) Agarosegele (Auftrennung von Restriktionsanalysen) bzw. 2% (w/v) Gele (Auftrennung von PCR-Fragmenten) verwendet. Hierzu wurden in 35 ml TAE-Puffer (40 mM Tris-Azetat, 1 mM EDTA) 0,5 bzw. 0,8 g Agarose unter Kochen gelöst und anschließend das Gel gegossen. Die DNA Proben wurden mit 1/6 Volumen DNA-Probenpuffer (0,25% (w/v) Bromphenolblau, 0,25% (w/v) Xylen-Cyanol FF, 15 % (v/v) Ficoll 400 in H₂O) versehen und in die Taschen des Agarose-Gels pipettiert. Als Marker wurde ein 100 bp Standard (100 -1000 bp) verwendet. Die Auftrennung erfolgte bei 5 V/cm Gel für ca. 45 min. Das Gel wurde auf einem UV-Transilluminator betrachtet und über eine Videoauswerteeinheit der Firma MWG (Ebersberg) dokumentiert. Im Falle eines präparativen Agarose-Gels wurden die interessierenden Banden mit einem Skalpell ausgeschnitten und die DNA anschließend aus den Gelstücken mit Hilfe des Jetsorb-Kits (Genomed) wie unter Punkt 2.5.9 beschrieben eluiert.

2.5.9 Aufreinigung der PCR-Produkte für die Klonierung

Das PCR-Reaktionsgemisch wurde in einem 2% (w/v) präparativen Agarose-Gel aufgetrennt und die gewünschte Bande auf einem UV-Transilluminator ausgeschnitten. Anschließend wurde die DNA mit Hilfe des Genomed Jetsorb Kits aus dem Gel eluiert und die Konzentration in einem Agarose-Gel bestimmt. Hierzu wurden die ausgeschnittenen Agarose-Gelstückchen gewogen und pro 100 mg mit je 300 µl Puffer A (NaClO₄, TBE, Na-Azetat) sowie 10 µl JETSORB-Suspension versetzt. Der Ansatz wurde bei 50°C für 15 min inkubiert und ab und zu gemischt. Danach wurde der Ansatz kurz bei 10000 x g zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Pellet wurde im Folgenden einmal mit Puffer A und zweimal mit Puffer B (Ethanol, NaCl, EDTA, Tris/HCl) gewaschen. Das Pellet wurde anschließend für 10 min bei 50°C in einem Thermoblock getrocknet. Das Pellet wurde in 20 µl Aqua dest. aufgenommen und für 5 min bei 50°C inkubiert um die DNA zu eluieren. Abschließend wurde der Ansatz nochmals zentrifugiert und der die DNA enthaltende Überstand in ein frischer Reaktionsgefäß überführt. Die DNA wurde entweder sofort weiterverwendet oder bei -20°C gelagert.

2.5.10 Auffüllen der 3'-Überhänge doppelsträngiger DNA aus der PCR

Nach der Aufreinigung der DNA aus dem PCR-Ansatz wurden zu 10 µl DNA (2 µg) in einem 0,5 ml Reaktionsgefäß 1 µl dNTPs (je 10 mM), 1,3 µl *Pfu*-Puffer (10fach) und 1 µl *Pfu* Polymerase (10 U) gegeben und der Ansatz vermischt. Danach wurde das Gemisch mit 20 µl Mineralöl überschichtet und für 30 min bei 72°C inkubiert.

2.5.11 Klonierung von PCR-Produkten in den pCR-Script Klonierungsvektor

Zur Klonierung der PCR-Produkte wurde der PCR-Script™ Amp Cloning Kit verwendet. 1 µl des pCR-Script Klonierungsvektors (10 ng/µl), 1 µl pCR-Script Reaktionspuffer (10fach), 0,5 µl rATP (1 mM), 5 µl gereinigtes PCR-Produkt, 1 µl *Srf* I Restriktionsenzym (5 U/µl) und 1 µl T4 DNA Ligase (4 U/µl) wurden in ein 0,5 ml Reaktionsgefäß pipettiert und mit dest. H₂O auf ein Gesamtvolumen von 10 µl aufgefüllt. Der Ansatz wurde

vermischt und anschließend bei RT für 1,5 h inkubiert. Die Reaktion wurde durch Erhitzung auf 65°C für 10 min abgestoppt.

2.5.12 Transformation kompetenter Bakterien

Die kompetenten Zellen wurden auf Eis aufgetaut, 40 µl von diesen in ein 15 ml Reaktionsgefäß überführt und mit 0,7 µl 2-Mercaptoethanol (1,44 M) versehen. Nach 10 min Inkubation auf Eis wurden 4 µl des Ligationsansatzes hinzugegeben und die Zellen weitere 30 min auf Eis inkubiert. Anschließend erfolgte der Hitze-Schock für exakt 45 sec bei 42°C, gefolgt von einer 2minütigen Abkühlung auf 4°C. Dann wurden 450 µl SOC-Medium dazugegeben und die Zellen für 60 min im Schüttler bei 37°C und 225 U/min inkubiert. 50, 100, 150 und 190 µl des Transformationsansatzes wurden auf Ampicillin (50 µg/ml)-LB-Platten ausplattiert und über Nacht bei 37°C bebrütet.

Für die Mini-Plasmid-Isolierung wurden am folgenden Tag 5 ml LB-Medium mit je einer gewachsenen Kolonie beimpft, mit 5 µl Ampicillin (50 mg/ml) versehen und über Nacht im Schüttler bei 37°C und 225 U/min inkubiert.

2.5.13 Mini-Plasmid-Isolierung

Die Isolierung von Plasmid-DNA wurde mit der alkalischen Lysemethode nach Binboim und Doly (1979) durchgeführt. Hierzu wurden 1,5 ml Übernachtskultur abzentrifugiert (5 min, 5000 x g) und das Pellet in 100 µl GET (50 mM Glukose, 10 mM EDTA, pH 8,0, 25 mM Tris/HCl, pH 8,0) resuspendiert. Die Lyse der Zellen erfolgte durch die Zugabe von 200 µl Lysispuffer (0,2 M NaOH, 10% (w/v) SDS) und anschließender Inkubation bei 4°C für 5 min. Zur Neutralisation wurden 150 µl 3 M Kaliumazetat, pH 4,8 hinzugegeben, für 5 min auf Eis inkubiert und die Suspension für 5 min bei 10000 x g zentrifugiert. Der erhaltene Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Der Überstand wurde mit einem Volumen Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25:24:1) extrahiert und anschließend die DNA mit 3 Volumen 100 % Ethanol ausgefällt und durch Zentrifugation (15 min, 10000 x g) pelletiert. Das DNA-Pellet wurde anschließend mit 300 µl 70% Ethanol gewaschen und 5 min bei 65°C in einem Thermoblock getrocknet. Die Plasmid-

DNA wurde in 50 µl TE, pH 7,5 gelöst und nach Zugabe von 20 µg/ml RNase bei -20°C gelagert.

2.5.14 Restriktionsanalyse

Der Erfolg einer Klonierung wurde zunächst durch einen Restriktionsverdau überprüft. 0,5 µg Plasmid wurden mit je 1 µl der Restriktionsenzyme *KpnI* und *SacI* (10-15 Einheiten) und 1 µl des entsprechenden 10-fach Reaktionspuffers für 1,5 h bei 37°C in einem 10 µl Ansatz verdaut und anschließend 4 µl in einem 2% Agarose-Gel aufgetrennt. Plasmide mit Insert wurden anschließend direkt sequenziert.

2.5.15 DNA-Sequenzierung

Für die Sequenzierungsreaktion wurde der ABI PRISM™ Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit von Perkin Elmer (Weiterstadt) verwendet. Die Sequenzierung erfolgte mit einem Sequenzierautomaten der Firma AppliedBiosystems. Für die Sequenzierung klonierter PCR-Produkte wurden die folgenden Oligonukleotide verwendet:

T₃ 5' ATT TAA CCC TCA CTA AAG GG 3'

T₇ 5' GTA ATA CGA CTC ACT ATA GGG C 3'

3 µl Plasmid-DNA, isoliert wie unter 2.5.13 beschrieben, wurden mit 1 µl Primer (3,2 pM), 11 µl H₂O und 5 µl Reaktionsgemisch des ABI PRISM™ Sequencing Kits gemischt und im Thermocycler für 30 Zyklen mit den folgenden Parametern inkubiert:

Denaturierung	Annealing	Extension
95°C, 30 sec	52°C, 15 sec	60°C, 4 min

Zum Entfernen von Oligonukleotiden und dNTPs wurde das Reaktionsgemisch über eine Sephadex G-50 Säule gereinigt. Hierzu wurde eine 100 µl Pipettenspitze bis zum oberen Rand mit Säulenmaterial beladen und für 3 min bei 2000 x g zentrifugiert. Anschließend wurde die Probe aufgegeben und das Säulchen nochmals zentrifugiert. Die DNA wurde dann durch 2 µl Na-Azetat (pH 5,2) und 50 µl 100% Ethanol auf Eis ausgefällt und durch eine Zentrifugation bei 13.000 x g für 15 min pelletiert. Das Pellet wurde mit 200 µl 70% Ethanol gewaschen und bei 65°C im Thermoblock getrocknet. Nach dem Trocknen wurde die DNA zum Auftragen auf das Sequenziergel in 3 µl Formamid/ 25 mM EDTA (5:1) aufgenommen und 2 min bei 90°C inkubiert. Bis zur Analyse im Sequenzierautomaten wurden die denaturierten Proben bei 4°C gelagert.

2.5.16 Auswertung der Sequenzierungen

Von allen Klonierungen wurden mindestens fünf Klone wie unter 2.5.15 beschrieben sequenziert. Um Fehler zu beseitigen, die bei der Amplifikation mit der Taq-Polymerase bzw. der Sequenzierung entstanden sind, wurden die Sequenzen der klonierten PCR-Fragmente mit Hilfe der DNAsis für Windows Software untereinander verglichen und eine Konsensus-Sequenz aller Klone aus beiden Leserichtungen erstellt. Für die Sequenzen der VH- und VL-Fragmente wurden in der V-Base-Datenbank (http://www.dnaxplot.de/input/human_v.html, bzw. <http://imgt.cines.fr/textes/vquest/>) die homologen Keimbahn-Gene identifiziert und die Anzahl der Mutationen bestimmt. Durch Umschreiben der DNA-Sequenzen in Aminosäure-Sequenzen wurde dann die Anzahl der stillen Mutationen und der Aminosäure-Austauschmutationen bestimmt.

3. Ergebnisse

3.1 Antikörper PAM-1

Einer der mittels humaner Hybridoma Technologie isolierten IgM-Antikörper ist der bereits in der Einleitung beschriebene Antikörper PAM-1. Der humane monoklonale Antikörper ist ein sehr gutes Beispiel für einen tumorspezifischen IgM-Antikörper. Wie schon beschrieben bindet der monoklonale Antikörper an eine neue Variante von CFR-1. Durch Immunperoxidase-Färbung wurde gezeigt, dass CFR-1/PAM-1 auf allen getesteten Karzinomen exprimiert ist sowie auf der *H. pylori*-assoziierten Gastritis und der Dysplasie des Magens. Nicht entzündlich veränderte Magenschleimhaut und alle anderen getesteten Normalgewebe zeigten keine Reaktion mit dem PAM-1 Antikörper. Dieses begrenzte Verteilungsmuster lässt vermuten, dass der CFR-1/PAM-1 Rezeptor hauptsächlich auf präkanzerös veränderten und Karzinom- Zellen exprimiert wird und essenziell für Proliferationsprozesse ist (Hensel et al., 2001a).

Um diese Beobachtungen näher zu untersuchen wurden weiterführende immunhistochemische Studien auf einer Vielzahl von Normalgeweben, epithelialen Tumoren und deren Präkanzerosen durchgeführt.

3.1.1 Expression von CFR-1/PAM-1 auf normalen Geweben

Um eine mögliche CFR-1/PAM-1 Expression auf Normalgeweben umfassend zu untersuchen wurden Paraffinschnitte von Normalgeweben entparaffiniert und mit 9 µg/ml PAM-1 Antikörper respektive diverser Kontrollen inkubiert. Zur histologischen Begutachtung der Gewebemorphologie wurde von jedem Gewebe zusätzlich eine HE-Färbung durchgeführt. Um Kreuzreaktionen, welche durch den Sekundär-Antikörper verursacht werden könnten, auszuschließen wurde bei jeder Färbung ein Schnitt nur mit dem Sekundär-Antikörper inkubiert. Die gefärbten Gewebeschnitte wurden lichtmikroskopisch analysiert. Die untersuchten Normalgewebe zeigten keine Reaktion mit PAM-1. Als Beispiele für die Abwesenheit des CFR-1/PAM-1 Rezeptors auf normalen Geweben sind in Abbildung 3 exemplarisch die Ergebnisse der Immunperoxidase-Färbungen einiger Gewebe dargestellt. So zeigte der Antikörper PAM-1 auf normalem Gewebe der Schilddrüse (3A), des Bronchus (3B), des Magens (3C), der Milz (3D), des

Uterus (3E) und des Kolons (3F) in den immunhistochemischen Untersuchungen keinerlei Reaktion.

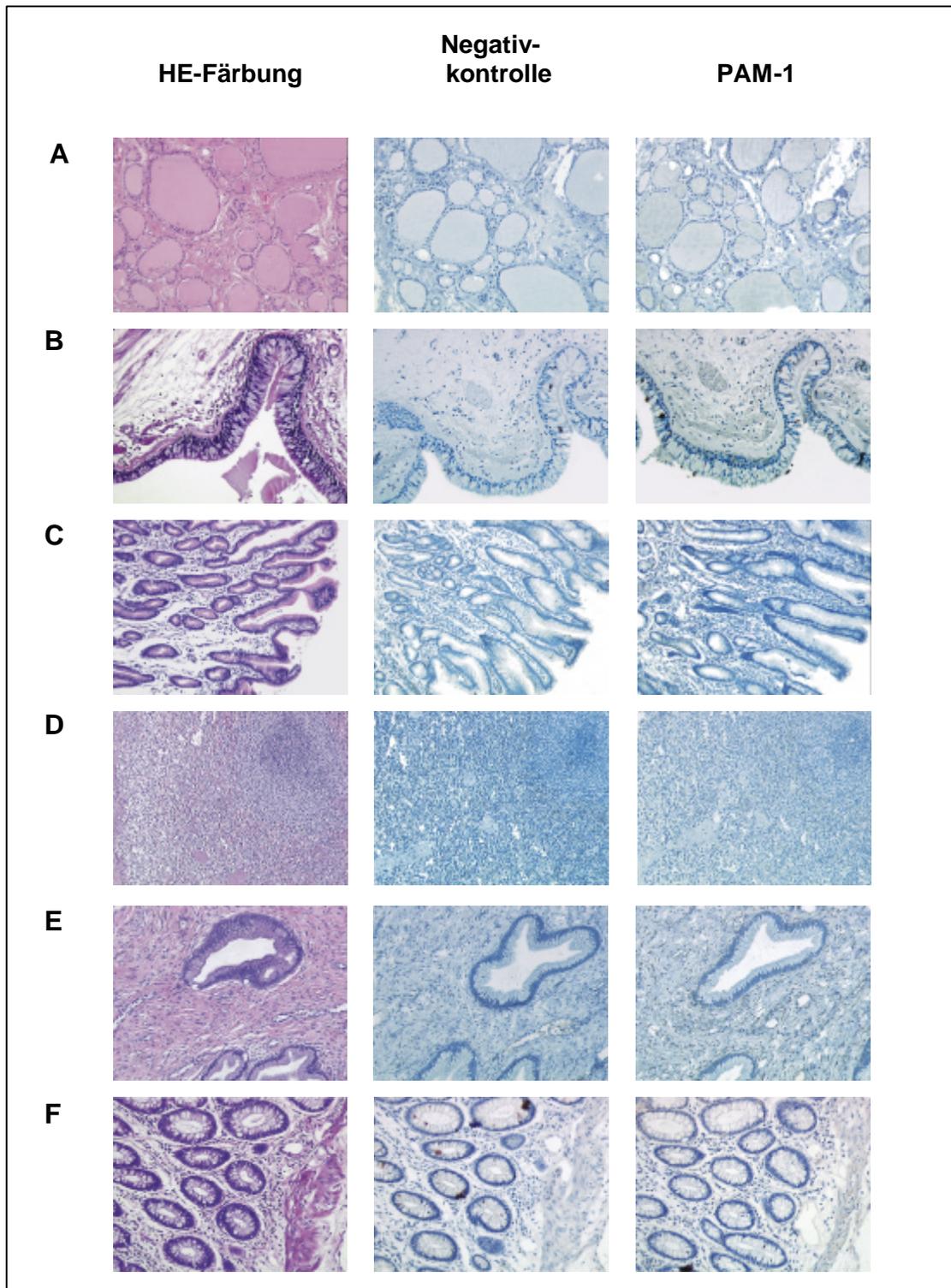


Abb. 3: Immunhistochemische Färbung mit dem Antikörper PAM-1 auf normalen Geweben. Paraffinschnitte wurden mit Hämatoxylin/Eosin (HE), nur dem Sekundär-Antikörper als Negativkontrolle und 9 µg/ml des Antikörpers PAM-1 gefärbt: A, normales Schilddrüsengewebe; B, normales Bronchialgewebe; C, normales Magengewebe; D, normale Milz; E, normales Uterusgewebe; F, normales Kolongewebe. Original Vergrößerung x100.

3.1.2. Expression von CFR-1/PAM-1 auf Tumoren

3.1.2.1 Immunperoxidase-Färbung auf Paraffinschnitten

Die Expression des CFR-1 Rezeptors, der durch den monoklonalen humanen IgM-Antikörper PAM-1 identifiziert wird, wurde wie schon erwähnt bereits für eine kleine Anzahl von verschiedenen Karzinomen beschrieben (Hensel et al., 2001a). Mit zusätzlichen Immunperoxidase-Färbungen sollten die vorhandenen Daten bestätigt werden, indem zusätzlich eine größere Anzahl der häufigsten Tumoren unterschiedlicher Herkunft und verschiedener Organe einbezogen wurde (Brändlein et al., 2003). Die Paraffinschnitte wurden mit 9 µg/ml PAM-1 Antikörper, nur dem Sekundär-Antikörper als Negativkontrolle sowie einer entsprechend des Tumor- bzw. Gewebetyps ausgewählten Positivkontrolle gefärbt.

Abbildung 4 zeigt exemplarisch die Expression des durch PAM-1 definierten CFR-1 Rezeptors auf Tumoren. Das invasiv lobuläre Karzinom der Brust zeigt eine deutlich positive Färbung der Tumorzellen mit der Positivkontrolle Cytokeratin 8 und dem Antikörper PAM-1 (Abb. 4A). Auch die Adenokarzinome des Pankreas (Abb. 4B), des Magens (Abb. 4C) sowie der Prostata (Abb. 4D) zeigen eine spezifische Reaktion mit der verwendeten Positivkontrolle und PAM-1. Für das Pankreaskarzinom wurde Cytokeratin 7 als Positivkontrolle verwendet, Cytokeratin 8 für das Magenkarzinom. Als Positivkontrolle für das Prostatakarzinom kam ein Antikörper gegen das Prostata-spezifische Antigen (PSA) zum Einsatz. Für die Plattenepithelkarzinome der Lunge und des Ösophagus wurde Cytokeratin 5/6 als entsprechende Positivkontrolle verwendet. Abbildung 4E und 4F zeigen die positiven Färbungen des Cytokeratin-Antikörpers sowie des Antikörpers PAM-1 auf einem Plattenepithelkarzinom der Lunge und des Ösophagus.

Die beispielhaft ausgewählten immunhistochemischen Färbungen zeigen deutlich, dass der Antikörper PAM-1 spezifisch an die Tumorzellen der Gewebeschnitte bindet. Es werden gleichermaßen Adenokarzinome und Plattenepithelkarzinome markiert. Das den Tumor umgebende Gewebe zeigt dagegen keine Reaktion. Auch die Negativkontrolle, bei der nur der Sekundär-Antikörper verwendet wurde, zeigt keinerlei Farbreaktionen.

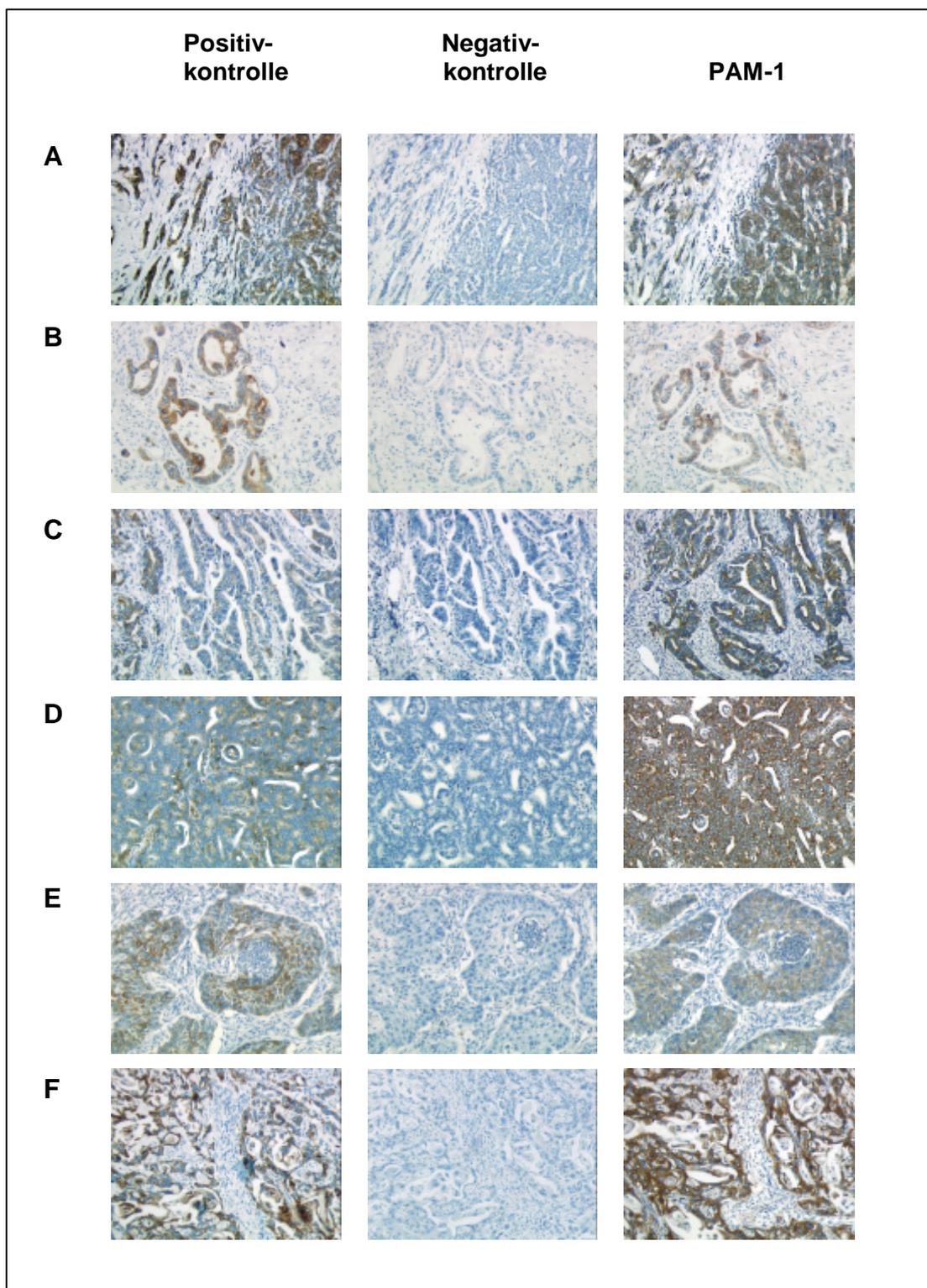


Abb. 4: Immunhistochemische Untersuchung der CFR-1/PAM-1 Rezeptor Expression auf verschiedenen Tumoren. Paraffinschnitte wurden entweder nur mit dem Sekundär-Antikörper als Negativkontrolle, einer dem Tumor entsprechenden Positivkontrolle sowie mit 9 µg/ml des Antikörpers PAM-1 gefärbt: A, invasiv lobuläres Karzinom der Brust; B, Adenokarzinom des Pankreas; C, Adenokarzinom des Magens (Cardia-Karzinom); D, Adenokarzinom der Prostata; E, Plattenepithelkarzinom der Lunge; F, Plattenepithelkarzinom des Ösophagus. Original Vergrößerung x 100.

In Tabelle 10 sind die Ergebnisse der immunhistochemischen Studien auf den verschiedenen Tumoren zusammengefasst. Es wurden zwischen 5 und 13 verschiedene Fälle pro Karzinom-Typ untersucht. Die überwiegende Mehrheit der untersuchten Fälle zeigte eine deutliche Expression des CFR-1/PAM-1 Rezeptors.

Tab. 10: Übersicht über die Ergebnisse der immunhistochemischen Untersuchungen der CFR-1/PAM-1 Rezeptor Verteilung auf Tumoren

Gewebe	Karzinomtyp	CFR-1/ PAM-1 Expression +/-
Ösophagus	Plattenepithel	5/0
	Adeno (Barrett)	11/2
Magen	Adeno (diffus)	5/0
	Adeno (intestinal)	4/1
	Adeno (Cardia)	8/0
Kolon	Adeno	13/0
Leber	Adeno (HCC)	9/0
Pankreas	Adeno (ductal)	8/0
Lunge	Adeno	8/3
	Plattenepithel	8/1
Brust	Invasive (ductal)	5/0
	Invasive (lobulär)	5/0
Ovar	Adeno	7/1
Uterus	Adeno	8/1
Zervix	Plattenepithel	9/1
	Adeno	9/0
Prostata	Adeno	9/0

Zusammenfassend lässt sich zu den immunhistochemischen Untersuchungen der CFR-1/PAM-1 Rezeptor Expression auf verschiedenen epithelialen Tumoren sagen, dass der Rezeptor ein breites Reaktionsspektrum auf den untersuchten Tumoren zeigt. Die Färbungen zeigen darüber hinaus, dass PAM-1 hochspezifisch an Tumorzellen bindet und die gefärbten Gewebeschnitte eine intensive und homogene Färbung der Tumorzellen aufweisen.

3.1.2.2 Durchflusszytometrische Messung (FACS-Analyse)

Zusätzlich zu den immunhistochemischen Untersuchungen wurden Durchflusszytometrische Analysen zur Expression des CFR-1/PAM-1 Rezeptors auf der Membran verschiedener Tumorzelllinien durchgeführt. Die Bindung des PAM-1 Antikörpers an den entsprechenden CFR-1 Membranrezeptor auf den Tumorzelllinien bewirkt eine Verschiebung im Fluoreszenzspektrum und dient als Maß für die Expression. Hierzu wurden sowohl epitheliale Tumorzelllinien als auch Zelllinien lymphatischen und myelotischen Ursprungs zur Analyse herangezogen. Ein Teil der Zellen (2×10^5) wurden mit $80 \mu\text{g/ml}$ des über FPLC gereinigten PAM-1 Antikörpers in einem Volumen von $200 \mu\text{l}$ für 15 min inkubiert. Der andere Anteil (2×10^5) wurde mit der gleichen Menge an humanem Chrompure IgM-Antikörper, welcher bei der FACS-Messung als Isotyp-Kontrolle fungiert, inkubiert. Anschließend erfolgte eine 15minütige Inkubation mit einem Fluoreszenz-markierten Sekundär-Antikörper (Rabbit anti-human IgM, FITC-gekoppelt). Die Messung wurde an einem FACS-Gerät der Marke FACScan (Beckton Dickinson, Mannheim) mit Anregung durch einen 488nm-Laser unter Verwendung der Lysis II Software (Beckton Dickinson) durchgeführt. Die Bindung von humanem monoklonalem PAM-1 Antikörper an die membranständigen CFR-1/PAM-1 Rezeptoren der Zellen wurde über die Intensität des gekoppelten FITC auf Kanal 1 (FL-1) gemessen. Die Darstellung des Kanals FL-1 erfolgte logarithmisch. Bei den epithelialen Tumorzelllinien 23132/87 (Adenokarzinom des Magens), EPLC-272H (Plattenepithelkarzinom der Lunge) und BXPC-3 (Adenokarzinom des Pankreas) zeigte sich eine deutliche Verschiebung durch Bindung des PAM-1 Antikörpers im Vergleich zur humanen IgM-Isotyp-Kontrolle (Abb. 5A, B und C). Andere Ergebnisse zeigten sich bei den beiden Zelllinien hämatologischen Ursprungs. Sowohl bei der lymphatischen Zelllinie HL-60 (B-Zell-Leukämie) als auch bei der myelotischen Zelllinie MOLT-4 (T-Zell-Leukämie) zeigte sich keine Bindung von PAM-1 (Abb. 5D und E).

Zellen epithelialen Ursprungs zeigen eine deutliche Expression des durch PAM-1 definierten CFR-1 Rezeptors an der Membranoberfläche, während dieser Rezeptor auf lymphatischen und myelotischen Zelllinien nicht exprimiert wird.

Diese Ergebnisse untermauern die bisherigen Befunde zur Spezifität des PAM-1 Antikörpers.

Der Antikörper bindet ausschließlich an die membranständigen CFR-1/PAM-1 Rezeptoren auf Tumorzellen epithelialen Ursprungs.

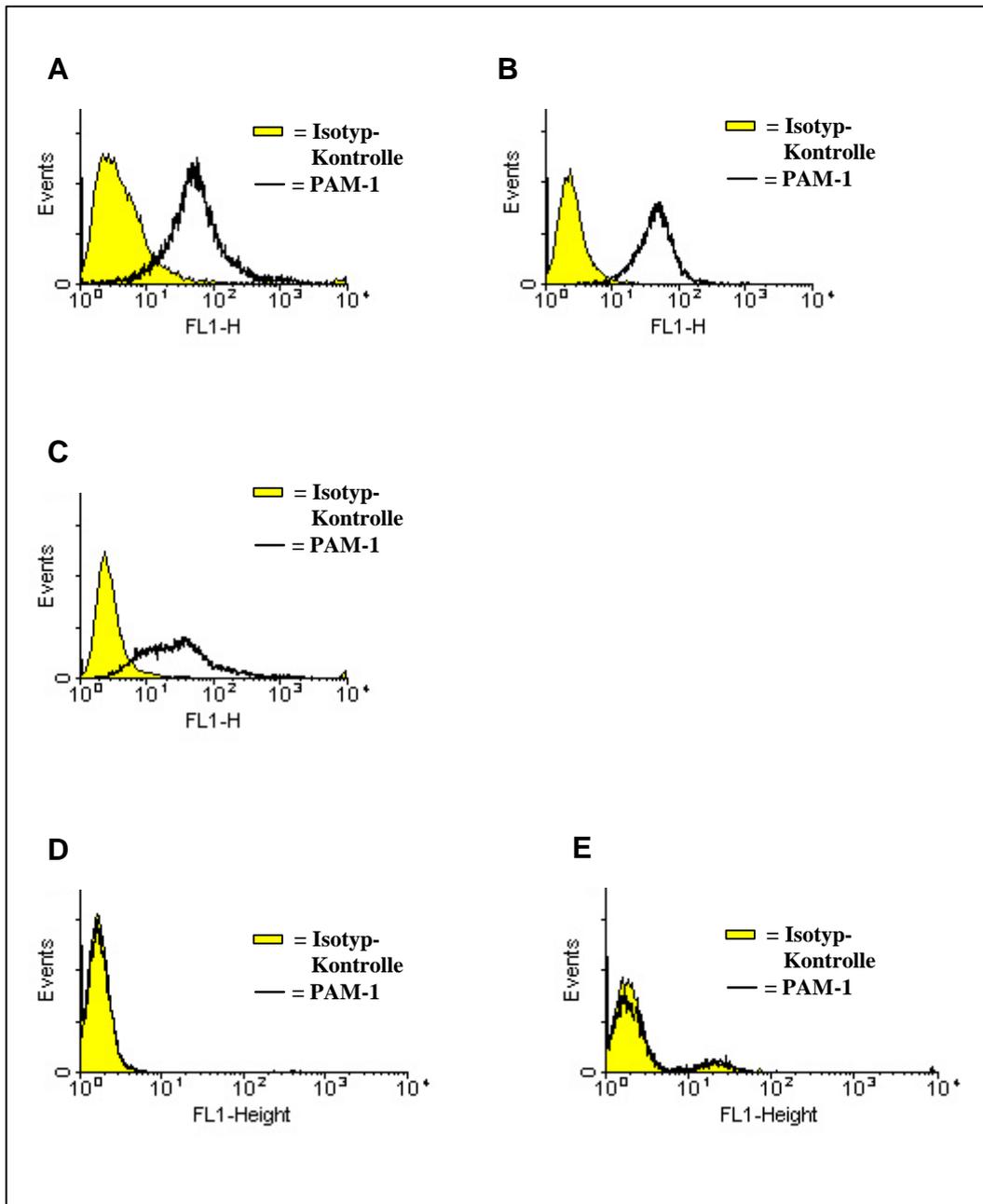
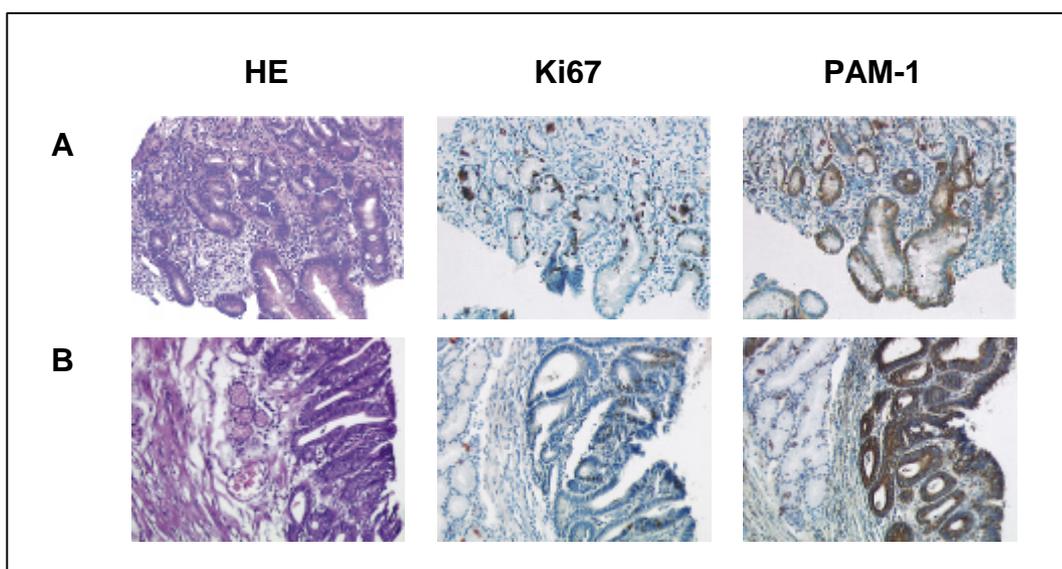


Abb. 5: Durchflusszytometrische Analyse der Expression von CFR-1 auf verschiedenen Zelllinien. Die epithelialen Zelllinien (A) 23132/87 (Adenokarzinom des Magens), (B) EPLC272H (Plattenepithelkarzinom der Lunge) und (C) BXPC-3 (Adenokarzinom des Pankreas), die lymphatische Linie (D) HL-60 (B-Zell-Leukämie) und die myelotische Zelllinie (E) Molt-4 (T-Zell-Leukämie) wurden mit $40 \mu\text{g}$ Chrompure human IgM als Isotyp-Kontrolle und $40 \mu\text{g}$ PAM-1 Antikörper inkubiert. Nach Inkubation mit dem Sekundär-Antikörper (rabbit anti human IgM FITC-gekoppelt) wurden die Zellen einer Messung im FACScan zugeführt. Die Bindung der humanen IgM-Antikörper wurde über die Intensität des gekoppelten FITC auf FL-1 (Kanal 1, grüne Fluoreszenz) gemessen. Die Darstellung des Kanals 1 erfolgte logarithmisch.

3.1.3 Expression von CFR-1/PAM-1 auf Präkanzerosen

Die Wichtigkeit der Tumorfrüherkennung für den weiteren Verlauf der Erkrankung macht den Einsatz hochspezifischer neuer Diagnosemarker unabdingbar. CFR-1/PAM-1 ist durch sein bisheriges Verteilungsmuster ein solcher potentieller Marker für entartete Zellen. Die immunhistochemische Studie verschiedener Präkanzerosen zeigte eine positive Reaktion von PAM-1 auf Präkanzerosen des Magens (*H. pylori*-assoziierte Gastritis, intestinale Metaplasie, high grade Dysplasie), des Barrett-Ösophagus (Barrett-Metaplasie und Barrett-Dysplasie), der Zervix (cervikal intraepithelial Neoplasia I-III, CIN I-III) und des Bronchus (Plattenepithel-Metaplasie und -Dysplasie). Untersucht wurden auch die als Vorstufen klassifizierten tubulären und villösen Adenome des Kolons sowie die Colitis-ulcerosa-assoziierte Dysplasie. PAM-1 bindet auch im Falle dieser Präkanzerosen spezifisch an die atypischen, entarteten Zellen. Gesunde Zellen dagegen werden nicht erkannt (Brändlein et al., 2003). Abbildung 6 zeigt die Reaktivität des Antikörpers PAM-1 auf verschiedenen Tumorstufen. Es sind je zwei Präkanzerosen des Barrettkarzinoms (A, B), des Kolonkarzinoms (C, D), des Plattenepithelkarzinoms der Lunge (E, F) sowie des Plattenepithelkarzinoms der Zervix (G, H) dargestellt. Die gezeigten Präkanzerosen sind in jeder Organ-Gruppe nach der Zunahme ihrer Malignität geordnet.



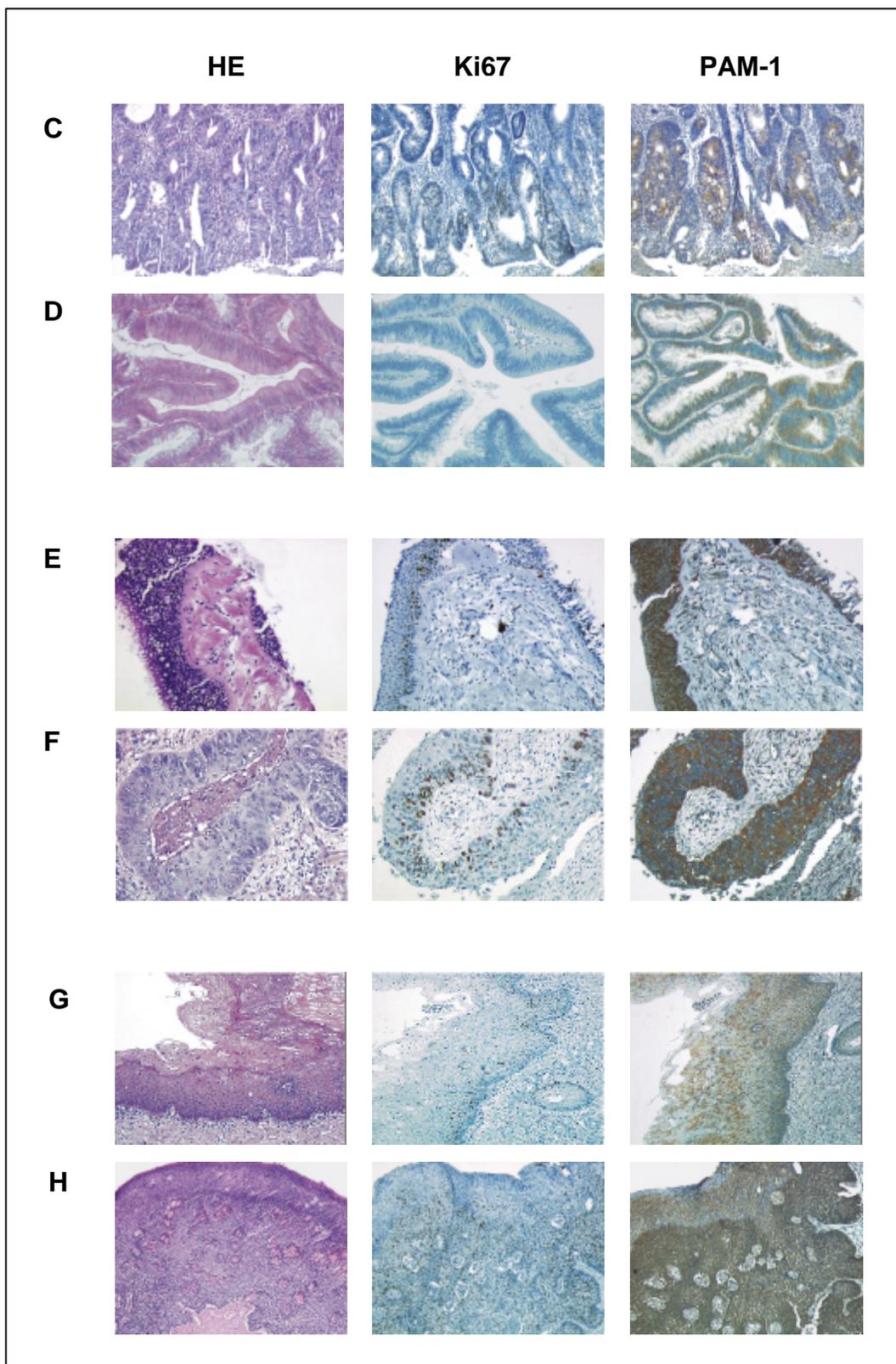


Abb. 6: Immunhistochemische Färbung mit dem Antikörper PAM-1 auf verschiedenen Präkanzerosen. Paraffinschnitte wurden mit Hämatoxylin/Eosin (HE), Ki67 und 9 µg/ml des PAM-1 Antikörpers gefärbt: A und B, Barrett-Metaplasie und -Dysplasie des Ösophagus; C und D, tubuläres und villöses Adenom des Kolons; E und F, Plattenepithel-Metaplasie und -Dysplasie der Lunge; G und H, Zervikale intraepitheliale Neoplasie I und III (CIN II und CIN III). Original Vergrößerung x 100.

Die Reaktivität des PAM-1 Antikörpers wurde mit der Expression des Ki67 Proteins verglichen, welches als meist gebrauchter Standardmarker in Proliferationsstudien zum Einsatz kommt (Scholzen and Gerdes, 2000; Brown and Gatter, 2002). Die Funktion dieses Proteins, welches im Nukleolus proliferierender Zellen lokalisiert ist, bleibt bisher unbekannt (Endl and Gerdes, 2000). In Tabelle 11 sind die Ergebnisse der immunhistochemischen Untersuchung auf Präkanzerosen zusammengefasst. Es wurden zwischen 3 und 10 verschiedene Fälle pro Präkanzerose-Stadium untersucht. Die überwiegende Mehrheit der untersuchten Fälle zeigte eine deutliche und zuverlässige Expression des CFR-1/PAM-1 Rezeptors.

Tab. 11: Übersicht über die Ergebnisse der immunhistochemischen Untersuchungen der CFR-1/PAM-1 Rezeptor Verteilung auf Präkanzerosen

Gewebe	Präkanzerose	Ki67 +/-	CFR-1/ PAM-1 Expression +/-
Ösophagus	Barrett-Metaplasie	8/1	9/0
	Barrett-Dysplasie	3/3	6/0
Magen	<i>H. pylori</i> -Gastritis	7/3	9/1
	Atrophische Gastritis	0/3	3/0
	Intestinale Metaplasie	7/0	7/0
	Tubuläres Adenom	6/3	8/1
	Tubulovillöses Adenom	3/1	3/1
	High grade Dysplasie	3/0	3/0
Kolon	Dysplasie (Colitis ulcerosa)	4/1	5/0
	Tubuläres Adenom	5/2	6/1
	Villöses Adenom	9/1	8/2
Zervix	CIN I	7/1	8/0
	CIN II	3/2	5/0
	CIN III	5/0	5/0
Bronchus	Epitheliale Metaplasie	2/3	5/0
	Epitheliale Dysplasie	3/0	3/0

Während der PAM-1 Antikörper eine intensive Färbung auf allen Präkanzerosen zeigt, färbt der Ki67 Antikörper nur mit einer schwachen Reaktion die entarteten proliferierenden Zellen an (vgl. Abb. 6). Im Allgemeinen lässt sich ein klarer Unterschied beobachten in der Qualität und Quantität der Ki67 Expression in Tumoren verglichen mit der CFR-1/PAM-1 Rezeptor Expression (Tab. 11). In fast allen Karzinomen und Präkanzerosen, die getestet wurden, zeigt CFR-1/PAM-1 eine homogene Expression auf zytologisch veränderten Zellen und zudem einen Anstieg der Intensität mit dem Grad der Malignität. Im Gegensatz zu CFR-1/PAM-1 ist Ki67 sowohl auf gesundem als auch auf malignem proliferierendem

Gewebe exprimiert. Außerdem zeigen nicht alle getesteten Tumoren eine positive Ki67 Reaktivität. Innerhalb bestimmter Tumortypen zeigt Ki67 eine nicht konstante und eine inhomogene Expression (Brändlein et al., 2003).

3.1.4 Expression von CFR-1/PAM-1 in Proliferationszonen

Um endgültig zu klären, ob die CFR-1/PAM-1 Expression spezifisch für die Proliferation in entarteten oder malignen Zellen ist und nicht in normale proliferative Prozesse (z.B. Gewebe-Regeneration) involviert ist, richtete sich nun das Interesse auf die Proliferationszonen. Aus diesem Grund wurden die Proliferationszonen von gesunden Geweben und präkanzerösem Gewebe mit dem Antikörper PAM-1 immunhistochemisch gefärbt. Abbildung 7A zeigt, dass die proliferierenden Zellen der Proliferationszone normaler Kolonschleimhaut durch den Ki67 Antikörper erkannt werden, jedoch keine Expression des CFR-1/PAM-1 Rezeptors zu beobachten ist. Das gleiche Ergebnis wurde auch bei der Untersuchung normalen Zervixgewebes beobachtet (Abb. 7B).

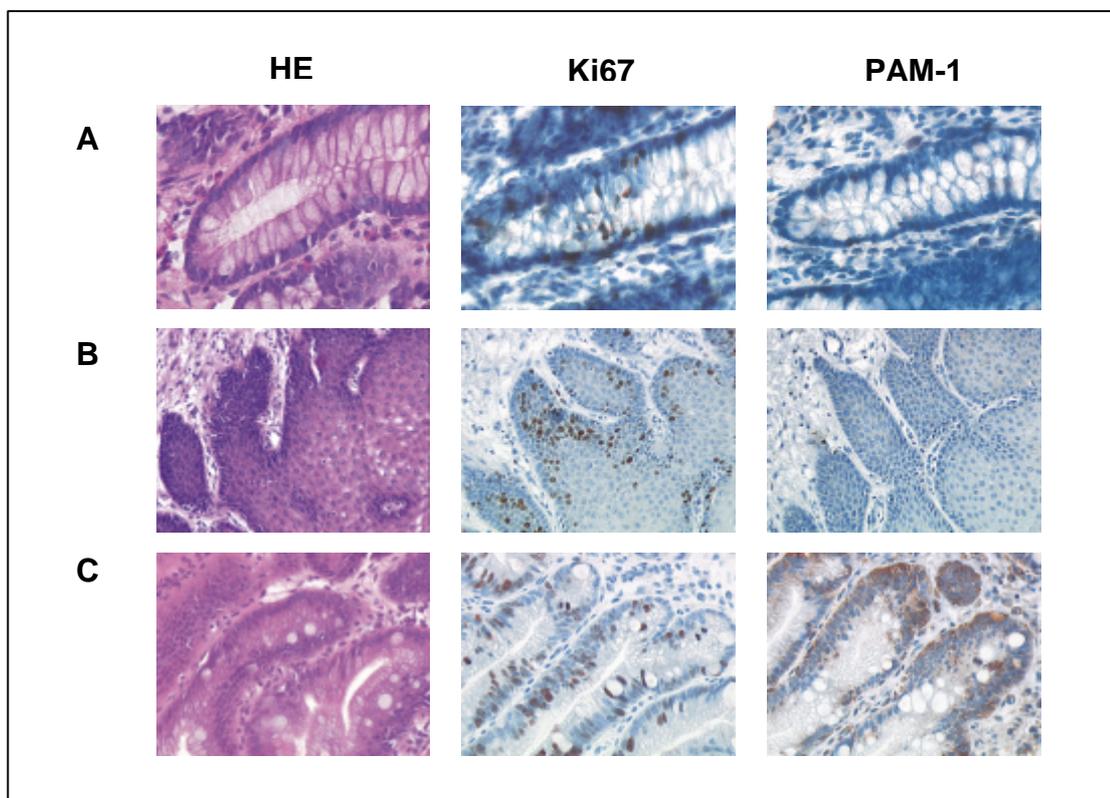


Abb. 7: Immunhistochemische Färbung mit dem Antikörper PAM-1 auf Proliferationszonen normalen und entarteten Gewebes. Paraffinschnitte wurden mit Hämatoxylin/Eosin (HE), Ki67 und 9 µg/ml des Antikörpers PAM-1 gefärbt: A, normale Kolonschleimhaut; B, normales zervikales Gewebe; C, Barrett-Metaplasie des Ösophagus. Original Vergrößerung x 100.

Auch hier konnte eine Ki67 Färbung der proliferierenden Zellen gezeigt werden, während der CFR-1/PAM-1 Rezeptor offensichtlich nicht exprimiert wird. Im Gegensatz hierzu zeigt die Barrett-Metaplasie des Ösophagus, welche als prämaligene Läsion des Ösophagus-Adenokarzinoms gilt, sowohl eine positive Reaktion mit Ki67 als auch eine deutliche Expression von CFR-1/PAM-1 (Abb. 7C). Diese Befunde zeigen, dass CFR-1/PAM-1 nicht auf gesunden proliferierenden Zellen exprimiert wird.

3.1.5 Analyse der Expression von CFR-1/PAM-1 mittels RT-PCR

Durch Glykosidase-Verdau-Experimente konnte gezeigt werden, dass PAM-1 an einen N-linked Carbohydratrest des CFR-1 Rezeptors bindet, welcher spezifisch auf der Membran maligner Zellen exprimiert wird (Hensel et al., 2001a). Da bisher so gut wie keine Reaktionen mit normalen Zellen beobachtet wurden, stellt sich die Frage nach dem molekularen Hintergrund dieses Phänomens. Zum einen wäre es möglich, dass es sich bei dem PAM-1 bindenden Epitop um eine post-transkriptionelle Modifikation von CFR-1 handelt, welche unterschiedlich zu der auf malignen Zellen exprimierten ist. Andererseits könnte der Mangel an Bindung von PAM-1 an normale Zellen auch daher rühren, dass der CFR-1/PAM-1 Rezeptor auf normalen Zellen nicht exprimiert wird. Um sich dieser Fragestellung auf molekularer Ebene zu nähern wurden die Expressionslevel von CFR-1 mRNA aus nicht-malignem und malignem Magengewebe mit Hilfe semi-quantitativer RT-PCR vergleichend untersucht. Hierzu wurde RNA sowohl aus gesundem Magengewebe als auch aus Tumorgewebe des Magens (diffuses Magenkarzinom, pT3pN3pMx, G3) isoliert. Nachfolgend wurde die erhaltene RNA mittels reverser Transkription in cDNA umgeschrieben und diese durch Hilfe CFR-1 spezifischer Primer in einer PCR-Reaktion vervielfältigt. Die RT-PCR Methode wurde durch das konstitutiv exprimierte "housekeeping gene" GAPDH als interne Kontrolle standardisiert.

In Abbildung 8 sind die Ergebnisse der semiquantitativen RT-PCR dargestellt. Hier ist eine deutlich verringerte Expression von CFR-1 mRNA in normalem Magengewebe verglichen mit der Expression in Tumorgewebe zu beobachten. Die interne GAPDH-Kontrolle zeigt als Mengenstandard, dass gleiche Mengen an DNA aufgetragen wurden.

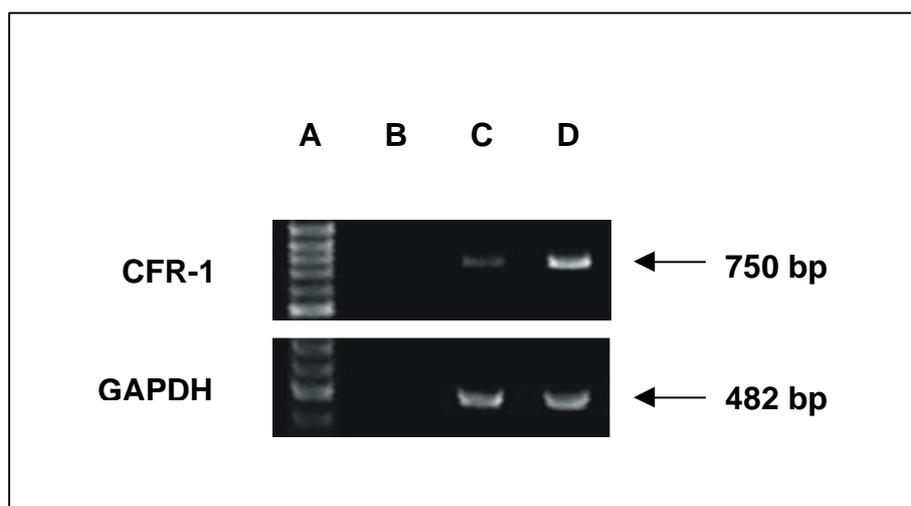


Abb. 8: Untersuchung zur Expression von CFR-1 in Tumor- und Normalgewebe mittels semiquantitativer RT-PCR. Gesamt-RNA von nicht-malignem (C) und malignem Magengewebe (D) wurde isoliert und revers transkribiert. Die Expression von GAPDH mRNA wurde als Mengenstandard für die semiquantitative RT-PCR verwendet. Als Negativkontrolle (B) wurde bei jeder PCR eine Probe mitgeführt, die anstelle von cDNA ausschließlich PCR-Puffer enthielt. Als Marker wurde ein 100 bp Standard verwendet (A). Die PCR-Amplifikationsprodukte wurden durch ein 2%iges Agarosegel separiert und durch Färbung mit Ethidiumbromid sichtbar gemacht.

Dieser Befund veranschaulicht, dass der durch den Antikörper PAM-1 definierte CFR-1 Rezeptor in maligne entartetem Magengewebe überexprimiert wird. Dennoch zeigt in der semiquantitativen RT-PCR auch normales Magengewebe eine basale Expression des CFR-1 Rezeptors. Da durch immunhistochemische Analysen zweifelsfrei gezeigt werden konnte, dass der Antikörper PAM-1 ausschließlich mit maligne veränderten Zellen reagiert und nicht mit normalen Zellen, liegt die Vermutung nahe, dass es sich bei dem CFR-1/PAM-1 Rezeptor um eine post-transkriptionelle Modifikation von CFR-1 handelt.

3.1.6 Zusammenfassung der CFR-1/PAM-1 Expression

Diese Ergebnisse zeigen, dass der CFR-1 Rezeptor, welcher durch den humanen monoklonalen Antikörper PAM-1 definiert wird, ein geeigneter und zuverlässiger diagnostischer Marker für neoplastische Epithelveränderungen ist. CFR-1/PAM-1 ist auf der Membran fast aller epithelialer Tumoren /Karzinomen jeden Typs und Ursprungs exprimiert. Dagegen ist er auf gesundem Gewebe nicht nachweisbar. Diese Beobachtungen

konnten an einer größeren Anzahl von Tumoren bestätigt werden. Es konnte zudem gezeigt werden, dass CFR-1 homogen auf Präkanzerosen des Magens, der Zervix, des Kolons, des Ösophagus und der Lunge exprimiert ist und einen Anstieg der Intensität der Färbung mit der Zunahme der Malignität aufweist. Zudem konnte durch immunhistochemische Analysen veranschaulicht werden, dass CFR-1/PAM-1 nicht auf gesunden proliferierenden Zellen exprimiert wird. Zusammen mit den Ergebnissen aus der semiquantitativen RT-PCR deutet alles darauf hin, dass es sich bei CFR-1/PAM-1 um eine auf malignen Geweben überexprimierte und zudem post-transkriptionell modifizierte Isoform von CFR-1 handelt.

Gleichzeitig war es hiermit auch möglich die Spezifität eines humanen IgM-Antikörpers für eine Vielzahl epithelialer Neoplasien zu demonstrieren. Diese Ergebnisse bildeten die Grundlage für die Isolierung weiterer vielversprechender humaner monoklonaler IgM-Antikörper.

3.2 Isolierung und Charakterisierung des Antikörpers LM-1

3.2.1 Ursprung des Antikörpers LM-1

Der humane monoklonale Antikörper LM-1 wurde aus den Lymphozyten eines Patienten isoliert, der an einem Lungenkarzinom erkrankt war. Nachfolgend wird ein kurzer Überblick über maligne Erkrankungen der Lunge und deren Therapie gegeben.

An Karzinomen der Atmungsorgane erkranken jährlich ca. 43000 Menschen in Deutschland, allein an Lungenkarzinomen 39000, davon sterben 38000 Patienten. Männer sind ungefähr 3-4 mal häufiger betroffen als Frauen. Bei den Frauen hat sich jedoch der seit Jahren beobachtete Anstieg für Lungenkrebs mit inzwischen jährlich fast 9000 Neuerkrankungen fortgesetzt. Ursachen dieser Karzinome sind in erster Linie schädliche Substanzen, die über die Atmung in die Lungen gelangen.

Morphologisch unterscheidet man vier Arten von Karzinomen, das Plattenepithelkarzinom (35-45%), das Adenokarzinom (25-35%), das kleinzellige (20-25%) und das großzellige Karzinom (10-15%). Beim Adenokarzinom scheint, im Gegensatz zu anderen Bronchialkarzinomen, das Rauchen eine geringere Rolle zu spielen. Hinsichtlich der Wirksamkeit der verschiedenen Therapieformen und Therapieplanung wird prinzipiell immer zwischen kleinzelligen und nicht-kleinzelligen Lungenkarzinomen unterschieden.

Bei der Behandlung nicht-kleinzelliger Tumoren steht die Operation an erster Stelle, im fortgeschrittenen Stadium die Bestrahlung, und bei kleinzelligen Lungenkarzinomen die Operation und die Chemotherapie, die sehr gut auf diesen Typ Tumor anspricht. Dennoch sterben trotz verbesserter Behandlungsmethoden ca. 95% der betroffenen Patienten innerhalb der nächsten 5 Jahre nach der Operation. Adjuvante Therapieformen wie Immuntherapie oder Gentherapie konnten bisher nicht erfolgreich etabliert werden.

Der Patient, aus dem der Antikörper LM-1 isoliert werden konnte, war an einem Adenokarzinom der Lunge erkrankt. Das Tumorstadium wurde im Pathologischen Institut nach der UICC-Klassifizierung mit T2N1Mx diagnostiziert, der Tumorgrad nach Lauren wurde mit G3 angegeben. Von diesem Patienten konnte sowohl lymphatisches Material in Form von Lymphknoten als auch autologes Tumormaterial erhalten werden.

In Tabelle 12 sind die Fusionsbedingungen, welche zur Isolierung des Antikörpers LM-1 führten, angegeben. Die Fusionseffizienz berechnet sich aus der theoretisch möglichen und tatsächlichen Klon-Wachstumsrate. Im Falle dieser Fusion wuchsen in 84 zur Verfügung stehenden wells in insgesamt 80 wells Klone heran. Das entspricht einer Fusionseffizienz

von 95%. Von diesen Klonen waren 75% im nachfolgenden ELISA positiv, d.h. sie produzierten Immunglobuline. Bei der Anzahl an Immunglobulin-Isotypen entfielen 70% auf IgM, 27% auf IgG und 3% auf den IgA-Isotyp. Bei der immunhistochemischen Färbung auf autologem Tumorgewebe zeigten fünf IgM-Antikörper (darunter LM-1) eine positive Reaktion mit Tumorzellen. Die Antikörper wurden nachfolgend rekloniert um zum einen sicherzustellen, dass die Klone, welche die Antikörper sezernieren, monoklonal sind. Zum anderen wurde durch die Reklonierung die Stabilität der Klone verbessert. Auch die erhaltenen Reklone wurden immunhistochemisch auf autologem Tumorgewebe analysiert. Der IgM-Antikörper LM-1 wurde für die weitere Testung herangezogen, da er die höchste Spezifität mit dem Tumorgewebe zeigte.

Tab. 12: Fusionsbedingungen und Effizienz der LM-1 Fusion

Anzahl verwendeter Lymphozyten	6×10^7
Anzahl verwendeter HAB-1 Zellen	2×10^7
Menge an verwendetem PEG 1500	0,8 ml
Fusionseffizienz	95%
ELISA-positive Hybridoma-Überstände	75%

3.2.2 Analyse der Tumorspezifität des Antikörpers LM-1

Der Antikörper LM-1 wurde auf Kreuzreaktivität mit gesunden und maligne entarteten Geweben mittels Immunperoxidase-Färbungen auf Paraffinschnitten getestet.

Abbildung 9 zeigt Beispiele der Färbungen auf verschiedenen Tumorgeweben. Neben den Immunperoxidase-Färbungen mit einer geeigneten Positivkontrolle, einer Negativkontrolle und dem LM-1 Antikörper ist zur histomorphologischen Begutachtung auch eine Hämatoxilin/Eosin-Färbung dargestellt.

Abbildung 9A zeigt zeigt eine deutlich positive Reaktivität des Antikörpers LM-1 und der Positivkontrolle Cytokeratin 5/6 auf einem Plattenepithelkarzinom der Lunge, Abbildung 9B auf einem Plattenepithelkarzinom des Ösophagus. Auch auf Adenokarzinomen zeigte der Antikörper LM-1 eine spezifische Reaktion mit Tumorzellen, wie hier am Beispiel eines Adenokarzinoms des Kolon dargestellt (Abb. 9C). Eine ebenso spezifische Reaktion zeigte der Antikörper auf invasiv duktalem Karzinomen der Brust (Abb. 9D).

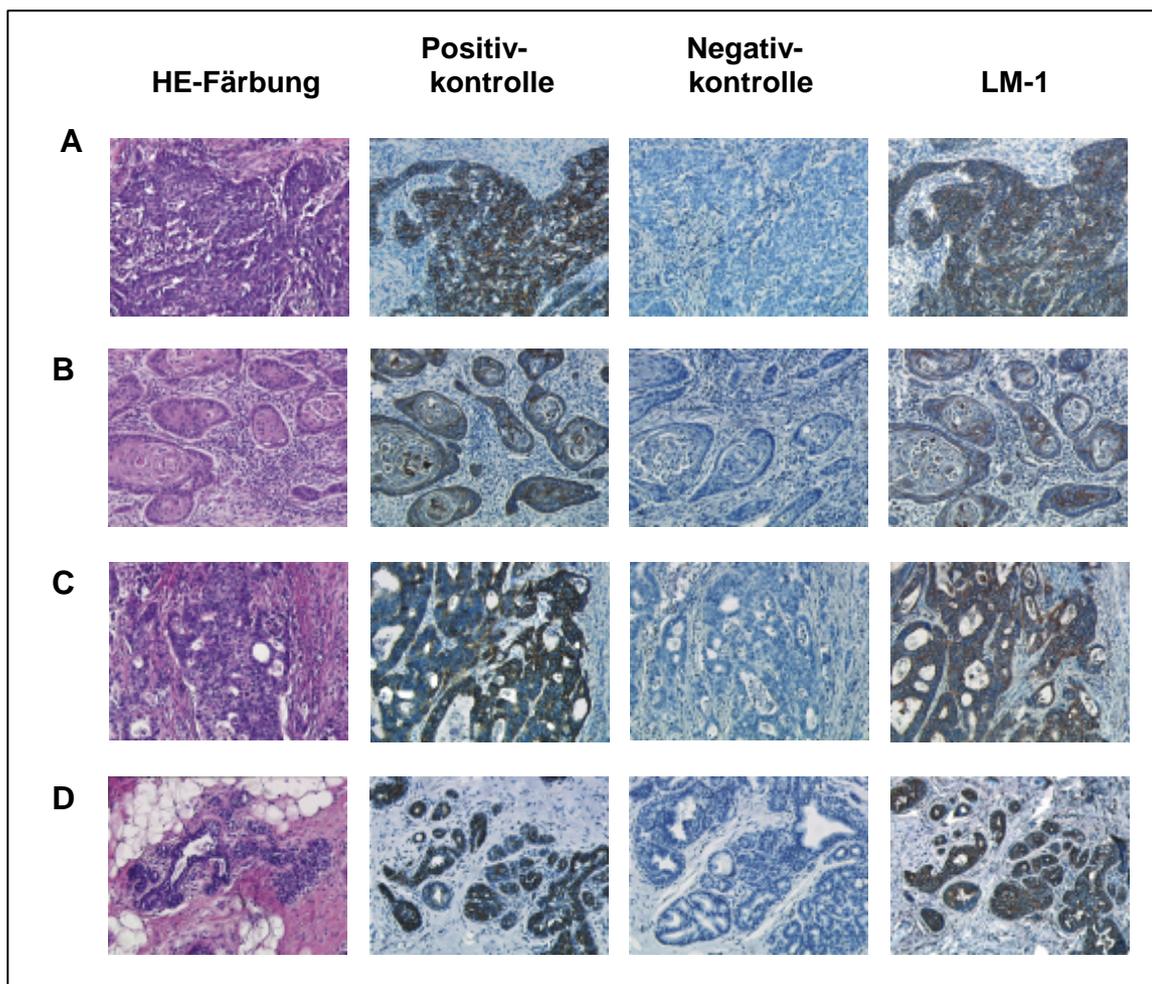


Abb. 9: Immunhistochemische Untersuchung zur Untersuchung der Tumorspezifität des Antikörpers LM-1 auf verschiedenen Tumoren. Paraffinschnitte von Tumorgewebe wurden entweder nur mit Hämatoxylin/Eosin, einer dem Tumor entsprechenden Positivkontrolle, dem Sekundär-Antikörper als Negativkontrolle, sowie mit 25 µg/ml des Antikörpers LM-1 gefärbt: A, Plattenepithelkarzinom der Lunge; B, Plattenepithelkarzinom des Ösophagus; C, Adenokarzinom des Kolon; D, invasiv lobuläres Karzinom der Brust. Original Vergrößerung x 100 bzw. x 200.

Die beispielhaft ausgewählten immunhistochemischen Färbungen zeigen deutlich, dass der Antikörper LM-1 spezifisch an die Tumorzellen der Gewebeschnitte bindet. Es werden gleichermaßen Adenokarzinome und Plattenepithelkarzinome markiert. Das den Tumor umgebende Gewebe zeigt dagegen keine Reaktion. Auch bei der Negativkontrolle, bei welcher nur der Sekundär-Antikörper verwendet wurde, war keinerlei Farbreaktion zu beobachten.

In Tabelle 13 sind die Ergebnisse der immunhistochemischen Studien auf den verschiedenen Tumoren zusammengefasst. Es wurden zwischen 1 und 5 verschiedene

Fälle pro Karzinom-Typ untersucht. Die überwiegende Mehrheit der untersuchten Fälle zeigte eine deutliche tumorspezifische Reaktion des Antikörpers LM-1. Das die Tumoren umgebende Gewebe wurde dagegen nicht durch den LM-1 Antikörper angefärbt.

Tab. 13: Tumorreaktivität des Antikörpers LM-1

Gewebe	Tumortyp	LM-1 (+ / -)
Magen	Adeno	2/1
Kolon	Adeno	3/0
Lunge	Adeno	2/1
	Plattenepithel	4/0
Ösophagus	Plattenepithel	3/0
Pankreas	Adeno	5/0
Prostata	Adeno	4/0
Brust	Invasiv ductal	2/0
	Invasiv lobulär	2/0
Ovar	Adeno	3/0
Uterus	Adeno	3/0
Blase	Urothel	1/0
Nebenniere	Adeno	1/0
Dünndarm	Adeno	1/0

Um die Tumorspezifität des Antikörpers zu untermauern wurden zusätzlich eine Reihe von immunhistochemischen Untersuchungen an Normalgeweben durchgeführt. Von jedem Gewebe wurden drei unabhängige Färbungen durchgeführt. Die Ergebnisse der Färbungen sind in Tabelle 14 zusammengefasst.

Tab. 14: Ergebnisse der immunhistochemischen Untersuchung des Antikörpers LM-1 auf normalen Geweben

Gewebe	Zell-Typ	LM-1
Magen	glandulär	-
Kolon	glandulär	-
Lunge	glandulär, alveolar	-
Ösophagus	epithelial	-
Pankreas	glandulär	-
Prostata	glandulär	-
Brust	glandulär	-
Dünndarm	glandulär	-
Blase	epithelial	-
Nebenniere	endokrin	-

Die immunhistochemischen Analysen mit normalen, gesunden Geweben wiesen keine Reaktivität mit dem Antikörper LM-1 auf.

LM-1 zeigt also eine breite Kreuzreaktion mit den unterschiedlichsten Karzinomen, jedoch nicht mit gesunden Geweben, und wird damit als tumorspezifisch eingestuft.

3.2.3 Genetische Analyse der variablen Region der schweren Immunglobulin-Kette des Antikörpers LM-1

Zur Untersuchung des genetischen Ursprungs des monoklonalen Antikörpers LM-1 wurde die VH-Region mit spezifischen Primern für die VH-Familien 1-6 in getrennten Ansätzen durch PCR amplifiziert. Nach elektrophoretischer Auftrennung der PCR-Ansätze im Agarose-Gel konnte durch das DNA-Fragment von einer Größe von 300 bis 350 bp die VH-Familie des verwendeten VH-Gens bestimmt werden. Bei dem Antikörper LM-1 handelt es sich um ein Gen aus der VH4-Familie. Zur weiteren Untersuchung wurde das PCR-Fragment aus dem Gel eluiert und in einen pCR-Script-Vektor kloniert. Das klonierte PCR-Fragment wurde von beiden Seiten mit T₃- und T₇-Primern sequenziert. Für die erhaltenen Sequenzen wurden mit Hilfe der DNAPLOT/ IMGT Datenbank die homologen Keimbahn-Gene identifiziert. Durch den Vergleich der aus den DNA-Sequenzen abgeleiteten Aminosäure-Sequenzen wurde dann die Anzahl der Mutationen bestimmt, welche zu einem Austausch von Aminosäuren führt, sowie die Anzahl der stillen Mutationen. Hierbei zeigte sich, dass die Sequenz der variablen Region der schweren Immunglobulinkette des Antikörpers LM-1 homolog zu dem Keimbahn-Gen IGHV4-30.1/4-31*01 (DP-65) ist. Das zugehörige D-Segment entspricht der Keimbahn-Sequenz IGHD3-16*01, das J-Segment der Sequenz IGHI3*02.

Die untersuchte VH-Region weist lediglich eine Mutation gegenüber der Sequenz des Keimbahn-Gens auf und ist dieser somit zu 99,6% homolog. Die Mutation, welche zu einem Aminosäure-Austausch von Threonin zu Alanin führt, liegt in der Framework-Region.

Abbildung 10 zeigt den Sequenzvergleich der VH-Region von LM-1 mit dem homologen Keimbahn-Gen IGHV4-30.1/4-31*01 (DP-65). Die Sequenzanalyse zeigt, dass es sich bei dem LM-1 Antikörper um einen natürlichen Antikörper handelt, der keiner Affinitätsreifung durch somatische Hyper-Mutation unterlag. Die verwendete leichte Immunglobulin-Kette des Antikörpers ist vom λ -Typ, was durch einen Antikörper-ELISA

herausgefunden wurde. Eine Amplifikation mit den vorhandenen Primern war für die leichte Kette nicht möglich, so dass hierfür kein Sequenzvergleich vorliegt.

	CDR1														
LM-1	CAG	ACC	CTG	TCC	CTC	ACC	TGC	GCT	GTC	TCT	GGT	GGC	TCC	ATC	AGC
IgHV4-30.1	Q	T	L	S	L	T	C	A	V	S	G	G	S	I	S
	---	---	---	---	---	---	---	A	---	---	---	---	---	---	---
								T							
LM-1	AGT	GGT	GGT	TAC	TAC		TGG	AGC	TGG	ATC	CGC	CAG	CAC	CCA	GGG
IgHV4-30.1	S	G	G	Y	Y		W	S	W	I	R	Q	H	P	G
	---	---	---	---	---		---	---	---	---	---	---	---	---	---
	CDR2														
LM-1	AAG	GGC	CTG	GAG	TGG	ATT	GGG	TAC	ATC	TAT	TAC	AGT	GGG	AGC	ACC
IgHV4-30.1	K	G	L	E	W	I	G	Y	I	Y	Y	S	G	S	T
	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
LM-1		TAC	TAC	AAC	CCG	TCC	CTC	AAG		AGT	CGA	GTT	ACC	ATA	TCA
IgHV4-30.1		Y	Y	N	P	S	L	K		S	R	V	T	I	S
		---	---	---	---	---	---	---		---	---	---	---	---	---
LM-1	GTA	GAC	ACG	TCT	AAG	AAC	CAG	TTC	TCC	CTG	AAG	CTG	AGC	TCT	GTG
IgHV4-30.1	V	D	T	S	K	N	Q	F	S	L	K	L	S	S	V
	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
LM-1	ACT	GCC	GCG	GAC	ACG	GCC	GTG	TAT	TAC	TGT	GCG	AGA		GTT	GAT
IgHV4-30.1	T	A	A	D	T	A	V	Y	Y	C	A	R		V	D
	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---		---	---
LM-1	GCG	CGA	TAT	GAT	TAC	GTT	TGG	GGG	AGT	TAT	CGT	TAT	GAT	GCT	TTT
	A	R	Y	D	Y	V	W	G	S	Y	R	Y	D	A	F
	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
LM-1	GAT	ATC	TGG	GGC	CAA	GGA	ACC	CTG	GTC	ACC					
	D	I	W	G	Q	G	T	L	V	T					
	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---					

Abb. 10: Sequenzvergleich der VH-Region des monoklonalen Antikörpers LM-1 mit dem homologen Keimbahn-Gen IGHV4-30.1.

- = Keimbahn-Gen Sequenz ist identisch mit der von LM-1. **x**: Die Sequenz unterscheidet sich durch das angegebene Nukleotid von der Keimbahn-Sequenz; **x**: Austausch eines Nukleotides, welcher zum Austausch einer Aminosäure führt. Die CDR-Regionen sind durch Balken markiert. Die Sequenz der VH-Region des Antikörpers LM-1 ist zu 99,6% homolog zum Keimbahn-Gen IGHV4-30.1

3.2.4 Funktionelle Analyse des Antikörpers LM-1

Neben der Spezifitätsanalyse gehört auch eine Untersuchung der potentiellen Funktion zur Charakterisierung der humanen monoklonalen Antikörper. Im Speziellen richtete sich das Interesse auf Antikörper, welche einen Einfluss auf die Proliferation von Tumorzellen ausüben. Aus diesem Grund wurden alle isolierten tumorspezifischen Antikörper einem Proliferationstest und einem Apoptose-Assay unterzogen um ihre Wirkung auf Tumorzellen zu analysieren. Eine solche funktionelle Wirkung auf Karzinomzellen konnte für den bereits in der Einleitung erwähnten therapeutischen humanen monoklonalen IgM-Antikörper SC-1 bestätigt werden, welcher sich als apoptotisch aktiv erwies.

Es konnte gezeigt werden, dass SC-1 *in vitro* das Wachstum von Magenkarzinomzellen inhibiert und *in vivo* bei Nacktmäusen zur Tumorrepression führt (Vollmers et al., 1998b). Ultrastrukturelle molekularbiologische und zellbiologische Untersuchungen ergaben, dass der Antikörper Apoptose von Tumorzellen induziert (Vollmers et al., 1995). In einer klinischen Untersuchung an 50 Patienten stellte sich zudem heraus, dass SC-1 signifikante Effekte auf Primärtumoren ausübt (Vollmers et al., 1998b, Illert et al., in prep.).

Die Induktion von Apoptose gilt als besonders selektive und effektive Methode zur Beseitigung von Tumorzellen. Die äußerst komplexen intrazellulären Vorgängen der Apoptose enden programmgemäß im Abbau der Zellstruktur. Bestimmte Proteasen zerlegen die Proteine der Zelle, Endonukleasen fragmentieren die Nukleinsäuren. Als Ergebnis bilden sich Membranvesikel, die sog. „apoptotic bodies“, welche vom Organismus „recycelt“ werden, ohne dass dabei begleitende inflammatorische Prozesse ausgelöst werden. Damit stellt die Beseitigung von Tumorzellen durch apoptotische Prozesse die ideale und schonendste Therapieform dar und rückt immer mehr in den Mittelpunkt des Interesses der Krebstherapie.

Die Befunde des SC-1 Antikörpers zeigen, dass aus Patienten isolierte IgM-Antikörper funktionell aktiv sein können und beispielsweise, wie im Falle von SC-1, tumorspezifisch Apoptose induzieren. Aus diesem Grund wurde auch der Antikörper LM-1 einer funktionellen Analyse unterzogen. Mit Hilfe funktioneller zellbiologischer Tests wurde der Einfluss des Antikörpers auf das Wachstum verschiedener Lungenkarzinom-Zelllinien *in vitro* charakterisiert.

3.2.4.1 Proliferationstest (MTT-Assay)

Zunächst wurden Tumorzellen verschiedener Lungenkarzinom-Zelllinien (EPLC-272H und LOU-NH91) in 96-Loch Platten ausgesät und mit Zellkultur-Überständen der LM-1-produzierenden Hybridomzellen in verschiedenen Konzentrationen inkubiert. Nach 24 bzw. 48 Stunden wurde die Proliferation der Lungenkarzinom-Zelllinien mit Hilfe des nichtradioaktiven, kolorimetrischen MTT-Assays bestimmt. Das Prinzip dieses Tests beruht auf dem Umsatz des farblosen Tetrazoliumsalzes 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid durch mitochondriale Dehydrogenasen, wodurch eine spektrophotometrisch auswertbare Farbreaktion entsteht. Da diese enzymatische Substratumsatzung nur in stoffwechselaktiven Mitochondrien erfolgen kann, weist der Test ausschließlich lebende, proliferierende Zellen nach. Mit dem MTT-Test ist es somit möglich das Maß an Antikörper-induzierter Proliferations-Stimulation bzw. Proliferations-Hemmung zu erfassen. Die Tests wurden mit jeder Zelllinie dreimal unabhängig voneinander durchgeführt, jeder Ansatz lag in achtfacher Ausführung vor. Die Farbintensität wurde im ELISA-Reader bei einer Wellenlänge von bei λ_{540} nm und λ_{690} nm bestimmt. In Abbildung 11 ist der Einfluss des Antikörpers LM-1 auf die Proliferation der Plattenepithelkarzinom-Zelllinien der Lunge zusammenfassend dargestellt. Hierbei wurde die Proliferationsrate der Kontrolle, bei der die Zellen in normalem Kulturmedium wuchsen, mit 100% angegeben. Abb. 11A zeigt den Einfluss auf die Zelllinie LOU-NH91. Bereits nach 24stündiger Inkubation mit dem Antikörper LM-1 zeigt sich eine konzentrationsabhängige Hemmung der Zell-Proliferation. Dieser Effekt tritt noch deutlicher nach 48 h zu Tage. Hier zeigen Zelle, welche mit einer Konzentration von 35 $\mu\text{g/ml}$ LM-1 inkubiert wurden, eine um 60% verringerte Proliferationsrate. Auch bei der zweiten untersuchten Zelllinie (EPLC-272H) zeigt sich nach 24 und 48 h eine deutliche konzentrationsabhängige Proliferations-Hemmung (Abb. 11B) im Vergleich zur normalen Proliferationsrate. Um auszuschließen, dass ein beobachteter Effekt alleine auf einen Serumentzug zurückzuführen ist, wurde immer ein Ansatz mit der entsprechenden Menge an verbrauchtem Kulturüberstand mitgeführt, der keinen Antikörper enthielt. Diese Kontrollen zeigten jedoch keinen Effekt auf die Zell-Proliferation der untersuchten Zelllinien und werden deshalb in den Diagramm nicht dargestellt.

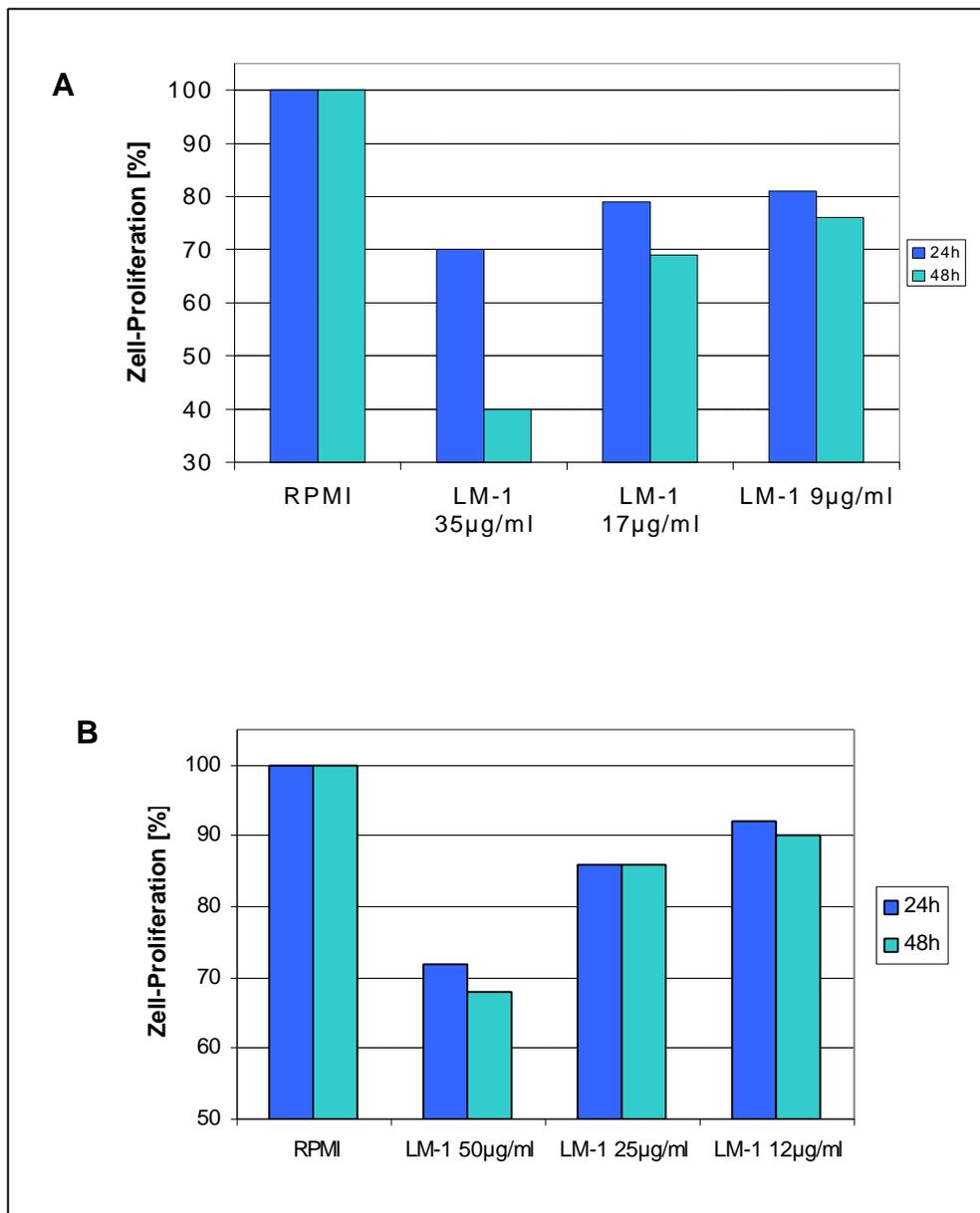


Abb. 11: Messung der Auswirkung des Antikörpers LM-1 auf die Zell-Proliferation von Lungenkarzinom-Zelllinien mittels MTT-Test. Die Abbildung zeigt den Effekt von verschiedenen Konzentrationen des Antikörpers LM-1 auf die Proliferationsrate der Zelllinie LOU-NH91 (A) und EPLC-272H (B) nach 24 und 48 h in %. Hierbei wurde die Proliferationsrate von Zellen, die in normalem Kulturmedium wuchsen, mit 100% angegeben. Bei beiden Zelllinien ist sowohl nach 24 h als auch nach 48 h eine LM-1-Antikörper-induzierte, konzentrationsabhängige Hemmung der Zell-Proliferation zu beobachten.

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

Die durch die MTT- Tests belegte Proliferations-Hemmung der Tumorzellen wurde mit Hilfe eines Apoptose-Tests näher charakterisiert. Da der größte Hemm-Effekt des LM-1 Antikörpers bei der Lungenkarzinom-Zelllinie LOU-NH91 beobachtbar war, wurden diese Zellen verwendet um eine eventuelle Apoptose-Induktion des Antikörpers zu verifizieren.

Hierzu wurden zunächst die Tumorzellen in 96-Loch Platten ausgesät und mit Zellkultur-Überständen der LM-1-produzierenden Hybridomzellen in verschiedenen Konzentrationen inkubiert. Nach 24 bzw. 48 Stunden Inkubation im Brutschrank (37°C, 5% CO₂) wurde die relative Anzahl apoptotischer Zellen mittels des Cell Death Detection ELISA^{PLUS} (Roche, Mannheim) ermittelt. Dieser Test basiert auf dem Prinzip eines quantitativen Sandwich-Enzym-Immunoassays, bei dem Peroxidase-konjugierte murine monoklonale Antikörper eingesetzt werden, welche gegen die Histon- bzw. DNA-Komponenten der beim Vorgang der Apoptose entstehenden Mono- und Oligonukleosomen gerichtet sind. Nach enzymatischer Umsetzung eines farblosen Substrats ist es möglich anhand der Farbintensität des Reaktionsproduktes die Menge der vorhandenen Nukleosomen und damit die relative Anzahl apoptotischer Zellen photometrisch zu bestimmen. Als Negativkontrolle wurden die Zellen einerseits mit der gleichen Menge Kulturmedium und andererseits mit verbrauchtem Zellkulturüberstand, der keine Antikörper enthielt, versetzt. Zusätzlich wurden eine im Test-Kit enthaltene Positivkontrolle und ein Blank-Ansatz mitgeführt. Jeder Ansatz lag in doppelter Ausführung vor. Die Intensität der Antikörper-induzierten Apoptose spiegelte sich in einem grünen Farbniederschlag wider, der mit Hilfe eines ELISA-Readers bei λ_{405} nm gegen die Referenzwellenlänge von λ_{490} nm vermessen wurde. Abbildung 12 zeigt die Ergebnisse der Inkubation mit dem Antikörper LM-1. Bereits nach 24 h zeigte der Antikörper im Vergleich zu den Negativkontrollen eine ausgeprägte konzentrationsabhängige Apoptose-Induktion (A). Dieser Effekt konnte ebenfalls nach 48 Stunden beobachtet werden (B).

Somit hemmt der Antikörper LM-1 nicht nur die Proliferation von Tumorzellen, was mit Hilfe des MTT-Assays nachgewiesen werden konnte, sondern er wirkt – wie die Ergebnisse des Apoptose-Tests zeigten – überdies Apoptose-induzierend auf die Zellen ein. Mit LM-1 steht somit analog zu SC-1 ein potentielles Immuntherapeutikum für die adjuvante Therapie von Tumoren zur Verfügung.

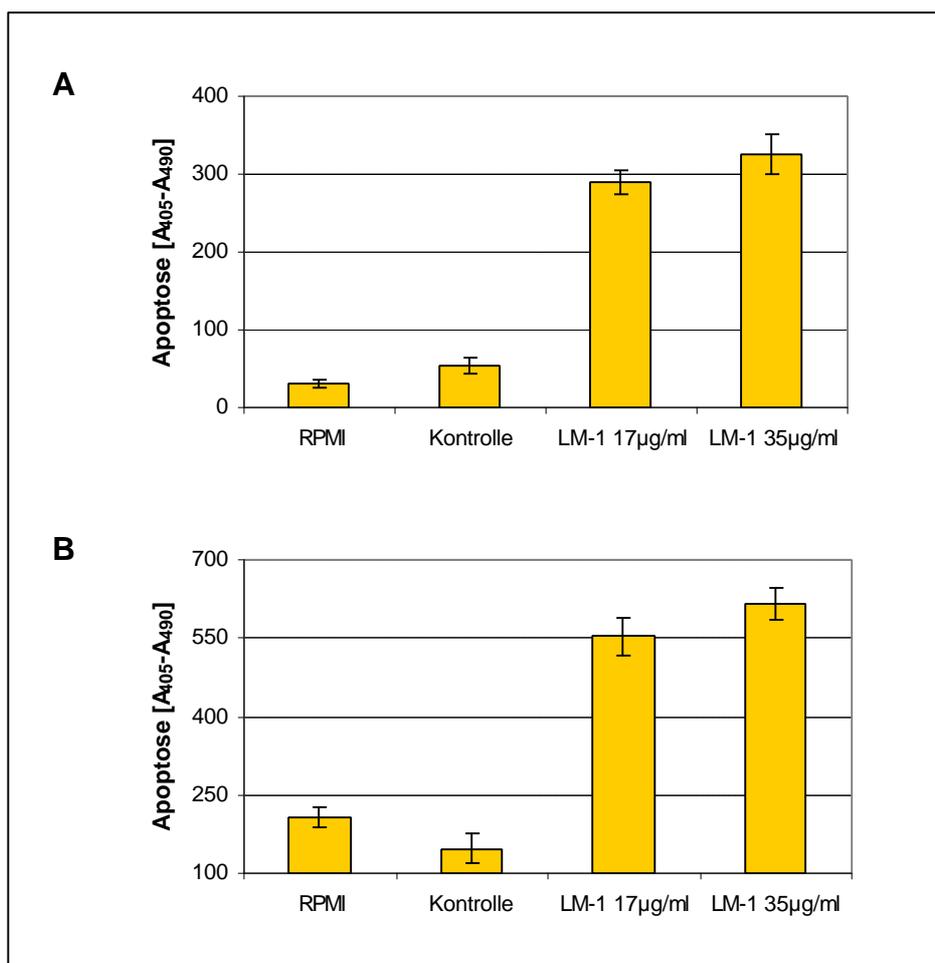


Abb. 12: Messung der Apoptose-Induktion des Antikörpers LM-1 auf die Lungenkarzinom-Zelllinie LOU-NH91 mittels Cell Death Detection ELISA^{PLUS}. Tumorzellen wurden in einer 96-Loch Platte für 24 bzw. 48 h im Brutschrank mit verschiedenen Konzentrationen LM-1 Antikörper inkubiert. Anschließend wurde die relative Anzahl apoptotischer Zellen mittels Cell Death Detection ELISA^{PLUS} bestimmt. Die Farbintensität des entstandenen Reaktionsproduktes wurde mit dem ELISA-Reader bei λ_{405} nm gegen die Referenzwellenlänge von λ_{490} nm vermessen. Die Abbildung zeigt das Maß an LM-1-induzierter Apoptose nach 24 h (A) und 48 h (B). Im Vergleich zu den Negativkontrollen (normales RPMI bzw. verbrauchter Zellkulturüberstand) ist sowohl nach 24 h als auch nach 48 h ist eine deutliche LM-1-Antikörper-induzierte, konzentrations-abhängige Apoptose der Tumorzelllinie zu beobachten.

3.2.5 Western-Blot Analyse

Um einen ersten Hinweis auf das Antigen zu erhalten, welches durch den Antikörper LM-1 erkannt wird, wurde eine Western-Blot Analyse durchgeführt. Aus den immunhistochemischen Untersuchungen war bekannt, dass es sich bei dem Antigen um ein membranständiges Molekül handeln muss, da in erster Linie Membranen und nicht Zytoplasma oder Kerne durch den Antikörper angefärbt worden waren. Aus diesem Grund

wurden die Membranproteine von der Lungenkarzinom-Zelllinie LOU-NH91 isoliert wie unter 2.4.1 beschrieben. Die Membranproteine wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt und anschließend im Western-Blot auf Nitrozellulose-Membranen überführt. Die darauffolgende Immunodetektion wurde mit einer definierten Menge an LM-1-Kulturüberstand durchgeführt (Detektionsbedingungen siehe 2.4.6). Als Kontrolle wurde eine zweite Nitrozellulose-Membran mit der gleichen Menge eines IgM-Kontroll-Antikörpers (Chrompure human IgM) inkubiert.

Abbildung 13 zeigt die Ergebnisse der Western-Blot Analysen. Der Antikörper LM-1 zeigt eine Bindung an ein Membranprotein mit einer Größe von ungefähr 70 kDa. Die durch den Antikörper detektierte Proteinbande war in den Kontrollen mit humanem IgM nicht zu erkennen.

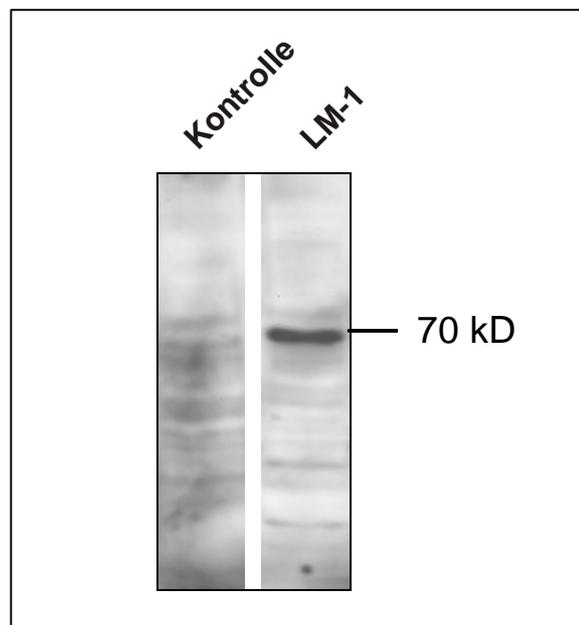


Abb. 13: Western-Blot Analyse des Antikörpers LM-1 auf Membranproteinen der Zelllinie LOU-NH91. Membranproteine von LOU-NH91 Zellen wurden extrahiert, in einer 10% SDS-PAGE aufgetrennt und auf eine Nitrozellulose-Membran geblottet. Die Detektion der Proteinbanden erfolgte nach Inkubation mit LM-1 und humanem Chrompure IgM als Primär-Antikörper und einem Peroxidase gekoppelten Maus anti-human IgM-Antikörper als Sekundär-Antikörper. Die Darstellung erfolgte nach einer Chemilumineszenz-Reaktion durch die Belichtung eines Röntgenfilms.

3.2.6 Einfluss der Proteinglykosylierung auf die Bindung des Antikörpers LM-1

Als Antigene der Antikörper SC-1 und PAM-1 wurden zwei Glykoproteine identifiziert. Sowohl der SC-1/CD55 Rezeptor als auch der PAM-1/CFR-1 Rezeptor verfügen über zahlreiche Glykosylierungsstellen. Durch enzymatische Behandlung mit Glykosidasen konnte gezeigt werden, dass die durch die Antikörper erkannten Epitope N-gebundene Zucker sind, bzw. die N-gebundenen Zucker in die Bindung der Antikörper an ihren Rezeptor entscheidend involviert sind (Hensel et al., 1999a; Hensel, 2001a).

Auch im Falle von Antikörper LM-1 sollte untersucht werden, inwieweit das Glykosylierungsmuster des Membranproteins Einfluss auf die Bindung des Antikörpers an Zellen der Lungenkarzinom-Zelllinie COLO-699 hat. Diese Zelllinie wurde verwendet, da sie eine ausgeprägte Membranfärbung mit dem Antikörper LM-1 zeigt. Hierzu wurden Zytospin-Präparate der Zellen angefertigt und für 3 h mit O- und N- Glykosidasen behandelt. Anschließend wurden die Zytospins mit dem Antikörper LM-1 und entsprechenden Kontrollen immunhistochemisch gefärbt. Abbildung 14 zeigt die Ergebnisse des Glykosidase-Verdau.

Dargestellt ist die Färbung von COLO-699-Zellen mit einer Positivkontrolle (CAM-Keratin) vor und nach Behandlung mit N-Glykosidase (A und B). In Abb. 14C und D sind die Auswirkungen der N-Glykosidase-Inkubation auf die Bindung des Antikörpers LM-1 an die Pankreaskarzinomzellen dargestellt. Es konnte hierbei beobachtet werden, dass die Zellen nach 3stündigem Verdau mit dem Enzym N-Glykosidase nicht mehr mit dem Antikörper LM-1 angefärbt wurden, der Antikörper also nicht mehr an seinen Rezeptor binden konnte.

Auch ein Verdau mit O-Glykosidase führte zu einer leichten Reduktion der Bindung des Antikörpers LM-1 an die Zellen (Daten nicht gezeigt). Die durch die enzymatischen Deglykosylierungen erzielten Ergebnisse deuten darauf hin, dass N- bzw. O-gebundene Zuckerverbindungen an der Bindung des Antikörpers beteiligt sind.

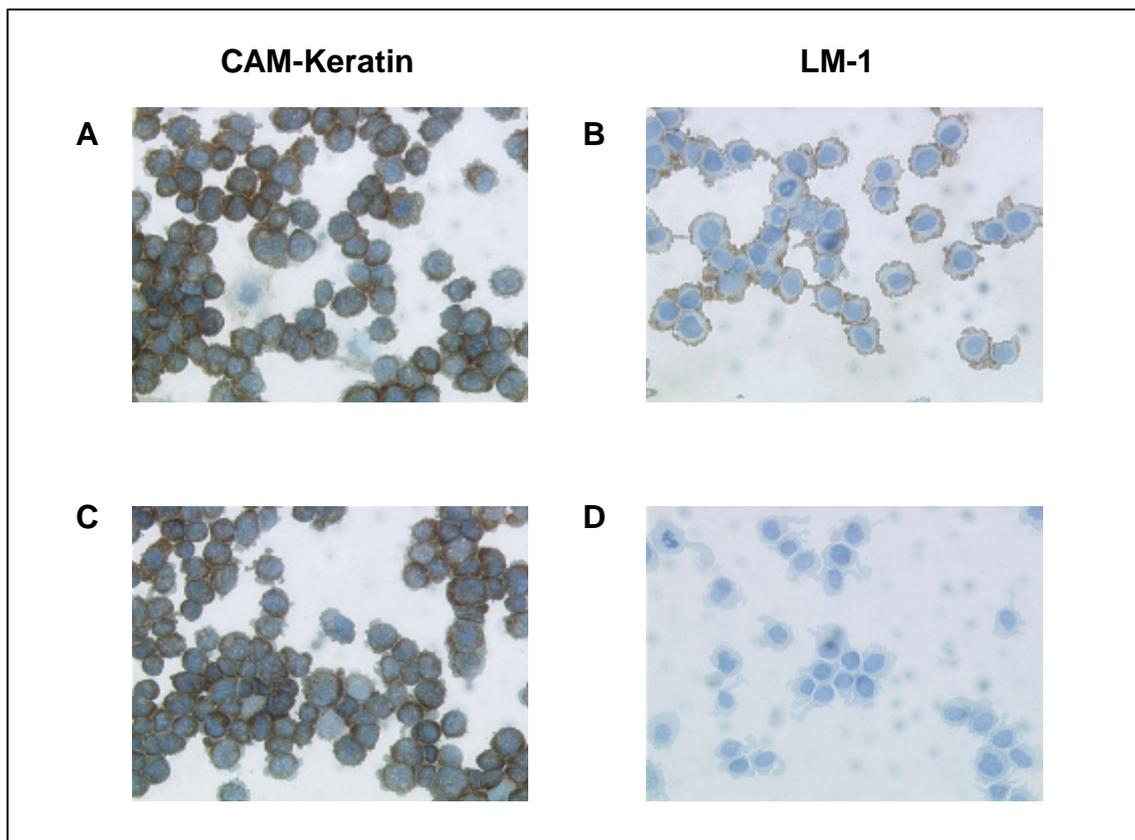


Abb. 14: Einfluss des Glykosidase-Verdau auf die Antikörper-Bindung von LM-1 an die Zelloberfläche der Zelllinie COLO-699. Die Zellen wurden nach Ablösen mit Trypsin/EDTA in Kulturmedium aufgenommen und für 60 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurden Zytospins präpariert, an der Luft getrocknet und mit Azeton fixiert. Danach wurden die Zellen mit 2 U/ml N-Glykosidase inkubiert (3 h, 37°C) (C und D) bzw. Kontrollen ohne Enzym (A und B) mitgeführt. Nach der Inkubationszeit wurden die Zytospins immunhistochemisch mit der Positivkontrolle CAM-Keratin (A und C) und LM-1 (B und D) gefärbt.

3.3 Isolierung und Charakterisierung der Antikörper PM-1 und PM-2

3.3.1 Ursprung der Antikörper PM-1 und PM-2

Die humanen monoklonalen Antikörper PM-1 und PM-2 konnten durch Isolierung von B-Zellen aus der Milz eines Pankreaskarzinom-Patienten und anschließender Fusion mit dem Heteromyelom HAB-1 gewonnen werden. Im Folgenden wird ein Überblick über maligne Erkrankungen des Pankreas und deren Therapie gegeben.

1997 erkrankten beispielsweise nach Schätzungen des Robert-Koch-Instituts Berlin in der Bundesrepublik Deutschland etwa 10100 Menschen neu an Pankreaskrebs. Männer sind dabei ungefähr eineinhalb- bis zweimal so häufig betroffen wie Frauen. Von der absoluten Zahl der Erkrankungen her zählt diese Krebsart im Vergleich zu anderen damit zu den nicht häufigen. Beim Blick auf die Zahlen der krebsbedingten, organbezogenen Todesursachenstatistik rangiert der Pankreaskrebs jedoch mit 11634 Verstorbenen im Jahr 1998 an sechster Stelle. Hierfür gibt es im wesentlichen zwei Gründe: Zum einen werden diese Tumoren meistens erst in fortgeschrittenem Stadium diagnostiziert und sind dann nicht mehr heilbar; zum anderen ist ein Pankreaskrebs, der nicht mehr operativ entfernt werden kann, mit den anderen heute zur Verfügung stehenden therapeutischen Maßnahmen kaum heilbar. Trotz intensiver Forschung ist es bisher nicht gelungen, die Ursachen für die Entstehung des Pankreaskarzinoms aufzudecken.

Histologisch lassen sich verschiedene Formen von Tumoren des Pankreas unterscheiden. Bei weitem am häufigsten ist das duktales Adenokarzinom des Pankreas, welches etwa achtzig bis neunzig Prozent aller Krebserkrankungen des Pankreas ausmacht. Es breitet sich in der Regel rasch über die Lymphbahnen und den Blutweg in die Leber, seltener in die Lunge, in das Skelett und andere Organe aus. Kann das Tumorleiden nicht durch Operation oder palliative Chemo-/Strahlen-/Immuntherapie günstig beeinflusst werden, ist die Prognose ungünstig.

Der Patient, aus dem die Antikörper PM-1 und PM-2 isoliert werden konnten, war an einem Adenokarzinom des Pankreaskorpus erkrankt. Das Tumorstadium wurde im Pathologischen Institut nach der UICC-Klassifizierung mit T1N1aMx diagnostiziert, der Tumorgrad nach Lauren wurde mit G2-G3 angegeben. Im Rahmen der durchgeführten Whipple-Operation wurde diesem Patienten neben dem Tumor auch die Milz entfernt, sodass für die Fusionen Lymphozyten aus der Milz verwendet werden konnten.

In Tabelle 15 sind die Fusionsbedingungen, welche zur Generierung der Antikörper PM-1

und PM-2 führten, angegeben. Die Antikörper entstammen verschiedenen Fusionen.

Tab. 15: Fusionsbedingungen und Effizienz der PM-1 und PM-2 Fusion

Antikörper	PM-1	PM-2
Anzahl verwendeter Lymphozyten	1,2 x 10 ⁸	8,5 x 10 ⁷
Anzahl verwendeter HAB-1 Zellen	4,2 x 10 ⁷	3,9 x 10 ⁷
Menge an verwendetem PEG	1 ml	1 ml
Fusionseffizienz	72%	82%
ELISA-positive Hybridoma-Überstände	36%	38%

Im Falle der PM-1 Fusion wuchsen von 144 zur Verfügung stehenden wells in insgesamt 103 wells Klone heran. Das entspricht einer Fusionseffizienz von 72%. Von diesen Klonen waren 36% im nachfolgenden ELISA-positiv, d.h. sie produzierten Immunglobuline. Bei der Anzahl an Immunglobulin-Isotypen entfielen 61% auf IgM, 14% auf IgG und 25% auf den IgA-Isotyp. Bei der immunhistochemischen Färbung auf autologem Tumorgewebe zeigten drei IgM-Antikörper eine positive Reaktion mit Tumorzellen. Diese Antikörper wurden im Folgenden rekloniert. Auch die erhaltenen Reklone (darunter PM-1) wurden immun-histochemisch auf autologem Tumorgewebe analysiert. Der IgM-Antikörper PM-1 wurde für die weitere Testung herangezogen, da er die höchste Spezifität mit dem Tumorgewebe zeigte.

Im Falle der PM-2 Fusion wuchsen von 120 vorhandenen wells in insgesamt 98 wells Klone heran, was einer Fusionseffizienz von 82% entspricht. Von diesen Klonen waren 38% im anschließenden durchgeführten ELISA-Test positiv, 72% der Immunglobuline waren vom IgM-Isotyp, 12% vom IgG-Isotyp und 18% vom IgA-Isotyp. Bei der immunhistochemischen Färbung zeigte nur ein IgM-Antikörper eine positive spezifische Reaktion mit autologen Tumorzellen. Dieser IgM-Antikörper wurde nachfolgend rekloniert und die erhaltenen Reklone erneut immunhistochemisch auf autologem Tumorgewebe analysiert. Der Reklon PM-2, welcher das beste Färbeergebnis lieferte, wurde für die weitere Testung verwendet

3.3.2 Analyse der Tumorspezifität der Antikörper PM-1 und PM-2

Die Antikörper PM-1 und PM-2 wurden mittels Immunperoxidase-Färbungen auf Kryo- und Paraffinschnitten auf Kreuzreaktivität mit gesunden und maligne entarteten Geweben getestet. Abbildung 15 zeigt Beispiele der Antikörper-Färbungen auf verschiedenen Tumorgeweben. Neben den Immunperoxidase-Färbungen mit einer geeigneten Positivkontrolle, einer Negativkontrolle und den Antikörpern PM-1 und PM-2 ist zur histomorphologischen Begutachtung auch eine Hämatoxilin/Eosin-Färbung dargestellt.

Abbildung 15A zeigt eine deutlich positive Reaktivität des Antikörpers PM-1 und der Positivkontrolle Cytokeratin 7 auf einem Adenokarzinom des Pankreas. Auch auf Plattenepithelkarzinomen der Lunge (B) und des Ösophagus (C) zeigte der Antikörper PM-1 eine spezifische Reaktion mit Tumorzellen. Die entsprechend verwendete Positivkontrolle war in diesem Fall Cytokeratin 5/6.

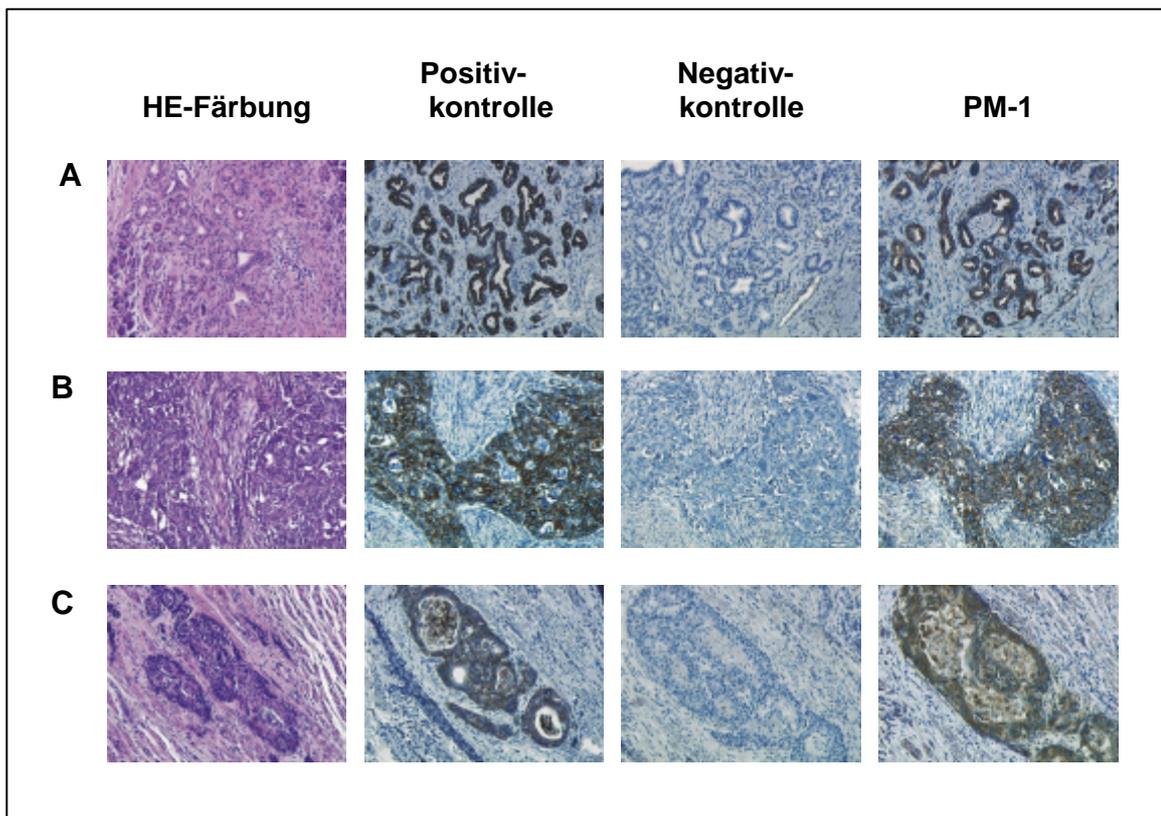


Abb. 15: Immunhistochemische Untersuchung der Tumorspezifität des Antikörpers PM-1 auf verschiedenen Tumoren. Paraffinschnitte von Tumorgeweben wurden entweder nur mit Hämatoxilin/Eosin, einer dem Tumor entsprechenden Positivkontrolle, dem Sekundär-Antikörper als Negativkontrolle sowie mit 25 µg/ml des Antikörpers PM-1 gefärbt: A, Adenokarzinom des Pankreas; B, Plattenepithelkarzinom der Lunge; C, Plattenepithelkarzinom des Ösophagus. Original Vergrößerung x 100.

Die immunhistochemischen Färbungen zeigen deutlich, dass der Antikörper PM-1 spezifisch an die Tumorzellen der Gewebeschnitte bindet. Es werden gleichermaßen Adenokarzinome und Plattenepithelkarzinome markiert. Das den Tumor umgebende Gewebe zeigt dagegen keine Reaktion. Auch die Negativkontrolle, bei der nur der Sekundär-Antikörper verwendet wurde, zeigt keinerlei Farbreaktionen (vgl. Abb. 15).

Es zeigte sich auch im Falle des Antikörpers PM-2 eine deutlich positive Reaktivität auf einer Vielzahl der getesteten Tumorgewebe. Abbildung 16 zeigt die Ergebnisse der immunhistochemischen Färbungen mit dem Antikörper PM-2. Hier sind als anschauliche Beispiele ein Adenokarzinom des Pankreas (A), ein invasiv duktales Karzinom der Brust (B) sowie ein Adenokarzinom des Kolon (C) inklusive der diversen Kontrollen dargestellt. Auch im Falle des Antikörpers PM-2 zeigt sich, ebenso wie bei den Untersuchungen mit PM-1, dass der Antikörper spezifisch an die Tumorzellen, nicht aber an das normale umgebende Gewebe bindet.

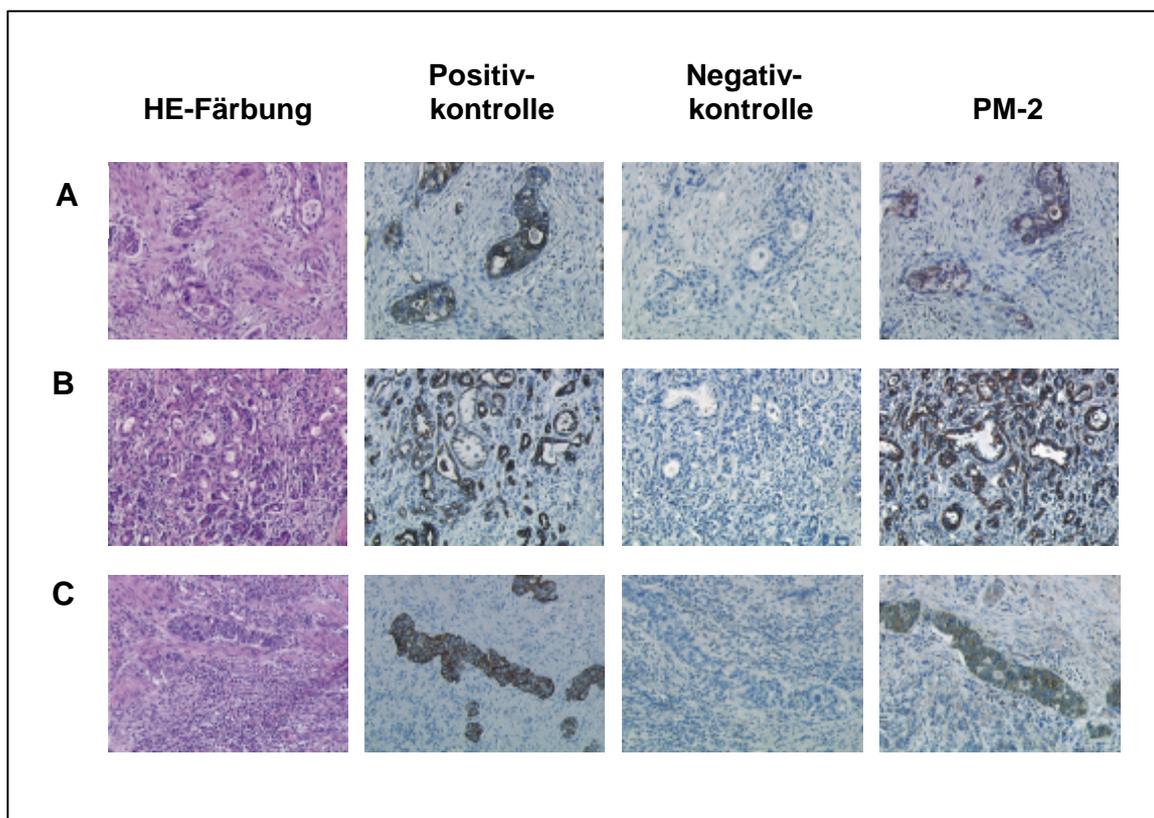


Abb. 16: Immunhistochemische Untersuchung zur Untersuchung der Tumorspezifität des Antikörpers PM-2 auf verschiedenen Tumoren. Paraffinschnitte von Tumorgeweben wurden entweder nur mit Hämatoxylin/Eosin, einer dem Tumor entsprechenden Positivkontrolle, dem Sekundär-Antikörper als Negativkontrolle sowie mit 25 µg/ml des Antikörpers PM-2 gefärbt: A, Adenokarzinom des Pankreas; B, invasiv duktales Karzinom der Brust. C, Adenokarzinom des Kolon. Original Vergrößerung x 100.

In Tabelle 16 sind die Ergebnisse der immunhistochemischen Studien auf den verschiedenen Tumoren zusammengefasst. Es wurden zwischen 1 und 7 verschiedene Fälle pro Karzinom-Typ untersucht. Im Falle des Antikörpers PM-2 wurden insgesamt 45 verschiedene Karzinome getestet. Wie aus der Tabelle ersichtlich wurde nur ein einziges Karzinom (Prostata) nicht erkannt. Die Ergebnisse der Färbungen mit dem Antikörper PM-1 sind nicht derart eindeutig. Insgesamt wurden 49 verschiedene Fälle gefärbt. Es zeigte sich, dass viele Karzinome erkannt wurden, jedoch bei jedem Tumortyp auch einzelne Fälle nicht durch den Antikörper PM-1 markiert wurden. Beispielsweise zeigt der Antikörper bei Karzinomen der Prostata nur in einem von fünf Fällen eine positive Reaktion mit dem Tumorgewebe. Auch Plattenepithelkarzinome der Lunge wurden nur in der Hälfte der untersuchten Fälle markiert.

Tab. 16: Tumorreaktivität der Antikörper PM-1 und PM-2

Gewebe	Tumortyp	PM-1 (+ / -)	PM-2 (+ / -)
Magen	Adeno	3/1	3/0
Kolon	Adeno	2/1	3/0
Lunge	Adeno	3/1	3/0
	Plattenepithel	2/2	3/0
Ösophagus	Plattenepithel	3/1	4/0
	Adeno	5/2	7/0
Pankreas	Adeno	1/4	4/1
Brust	Invasiv ductal	2/1	3/0
	Invasiv lobulär	2/1	3/0
Ovar	Adeno	3/1	5/0
Uterus	Adeno	1/2	3/0
Blase	Urothel	0/1	1/0
Nebenniere	Adeno	1/0	1/0
Dünndarm	Adeno	1/0	1/0

Um die Tumorspezifität des Antikörpers zu untermauern wurden zusätzlich eine Reihe von immunhistochemischen Untersuchungen auf Kryoschnitten von Normalgeweben durchgeführt. Von jedem Gewebe wurden drei unabhängige Färbungen angefertigt. Die Ergebnisse der Färbungen sind in Tabelle 17 zusammengefasst.

Tab. 17: Ergebnisse der immunhistochemischen Untersuchung der Antikörper PM-1 und PM-2 auf normalen Geweben

Gewebe	Zelltyp	PM-1	PM-2
Magen	glandulär	-	-
Kolon	glandulär	-	-
Lunge	glandulär, alveolär	-	-
Ösophagus	epithelial	-	-
Pankreas	glandulär	-	-
Prostata	glandulär	-	-
Brust	glandulär	-	-
Dünndarm	glandulär	-	-
Blase	epithelial	-	-
Nebenniere	endokrin	-	-

Weder der Antikörper PM-1 noch PM-2 wiesen auf normalen, gesunden Geweben eine Reaktivität auf.

PM-2 zeigte also, ebenso wie der unter Punkt 3.3.2 beschriebene Antikörper LM-1, eine überaus breite spezifische Reaktion mit den unterschiedlichsten Karzinomen, jedoch nicht mit gesunden Geweben. PM-1 dagegen färbte tumorspezifisch eine Vielzahl der Karzinome, 37% der untersuchten Fälle wurden jedoch nicht von dem Antikörper markiert.

3.3.3 Genetische Analyse der variablen Region der schweren Immunglobulin-Kette der Antikörper PM-1 und PM-2

Zur näheren Charakterisierung des genetischen Repertoires wurde die VH-Region der monoklonalen Antikörper PM-1 und PM-2 mit spezifischen Primern für die VH-Familien 1-6 in getrennten Ansätzen durch PCR amplifiziert und anschließend die VH-Familie der verwendeten VH-Gene bestimmt. Bei den Antikörpern PM-1 und PM-2 handelt es sich hierbei um Gene aus der VH3-Familie. Zur weiteren Untersuchung wurden die PCR-Fragmente aus dem Gel eluiert und separat in einen pCR-Script-Vektor kloniert und die PCR-Fragmente mit T₃- und T₇-Primern sequenziert. Für die erhaltenen Sequenzen wurden die homologen Keimbahn-Gene identifiziert und die Anzahl der Mutationen bestimmt. Hierbei zeigte sich, dass die Sequenzen der variablen Region der schweren Immunglobulinkette der Antikörper PM-1 und PM-2 homolog zu demselben Keimbahn-Gen (IGHV3-23*01, DP-47) sind. Das zugehörige D-Segment entspricht bei Antikörper PM-2 der Keimbahn-Sequenz IGHD2-21*02, im Falle von Antikörper PM-1 konnte das D-

Segment nicht identifiziert werden. Die Sequenz des J-Segmentes ist bei Antikörper PM-1 homolog zu IGHJ%*02 und bei PM-2 homolog zu IGHJ6*02.

Die untersuchte VH-Region weist bei beiden Antikörpern keinerlei Mutation gegenüber der Sequenz des Keimbahn-Gens auf und ist dieser somit zu 100% homolog.

Abbildung 17 zeigt den Sequenzvergleich der VH-Region von PM-1 und PM-2 mit ihrem homologen Keimbahn-Gen IGHV3-23*01. Die Sequenzanalyse zeigt, dass es sich bei den Antikörpern um natürliche Antikörper handelt, welche keiner Affinitätsreifung durch somatische Hyper-Mutation unterlagen.

	CDR 1														
PM-1/PM-2	GGG	TCC	CTG	AGA	CTC	TCC	TGT	GCA	GCC	TCT	GGA	TTC	ACC	TTT	AGC
IGHV3-23*01	G	S	L	R	L	S	C	A	A	S	G	F	T	F	S
	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
PM-1/PM-2	AGC	TAT	GCC		ATG	AGC	TGG	GTC	CGC	CAG	GCT	CCA	GGG	AAG	GGG
IGHV3-23*01	S	Y	A		M	S	W	V	R	Q	A	P	G	K	G
	---	---	---		---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
	CDR2														
PM-1/PM-2	CTG	GAG	TGG	GTC	TCA	GCT	ATT	AGT	GGT	AGT	GGT	GGT	AGC	ACA	
IGHV3-23*01	L	E	W	V	S	A	I	S	G	S	G	G	S	T	
	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
PM-1/PM-2	TAC	TAC	GCA	GAC	TCC	GTG	AAG		GGC	CGG	TTC	ACC	ATC	TCC	AGA
IGHV3-23*01	Y	Y	A	D	S	V	K		G	R	F	T	I	S	R
	---	---	---	---	---	---	---		---	---	---	---	---	---	---
PM-1/PM-2	GAC	AAT	TCC	AAG	AAC	ACG	CTG	TAT	CTG	CAA	ATG	AAC	AGC	CTG	AGA
IGHV3-23*01	D	N	S	K	N	T	L	Y	L	Q	M	N	S	L	R
	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
PM-1/PM-2	GCC	GAG	GAC	ACG	GCC	GTA	TAT	TAC	TGT	GCG	AAA				
IGHV3-23*01	A	E	D	T	A	V	Y	Y	C	A	K				
	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---				

Abb. 17: Sequenzvergleich der VH-Region der monoklonalen Antikörper PM-1 und PM-2 mit dem homologen Keimbahn-Gen IGHV3-23*01.

- = Keimbahn-Gen Sequenz ist identisch mit der von IGHV3-23*03. Die CDR-Regionen sind durch Balken markiert. Die Sequenzen der VH-Region der Antikörper PM-1 und PM-2 sind zu 100% homolog zum Keimbahn-Gen IGHV3-23*01.

		CDR2													
PM-1	GTG CTG GTC ATC TAT	GAG GAC AGC	AAA CGA CCC TCC GGG ATC												
IGLV3-10*01	V L V I Y	E D S	K R P S G I												
PM-1	CCT	GAG AGA TTC TCT GGC TCC AGC	TCA GGG ACA ATG GCC												
IGLV3-10*01	P	E R F S G S S	S G T M A												
PM-1	ACC TTG ACT ATC AGT GGG GCC CAG GTG GAG GAT GAA GCT GAC TAC														
IGLV3-10*01	T L T I S G A Q V E D E A D Y														
		CDR3													
PM-1	TAC TGT TAC TCA ACA GAC AGC AGT GGT AAT														
IGLV3-10*01	Y C Y S T D S S G N														
PM-1	ATG TCT TCG GAA CTG GGA CCA AGC TCA CCG TCC														
	M S S E L G P S S P S														

Abb. 18: Sequenzvergleich der VL-Region des monoklonalen Antikörpers PM-1 mit dem homologen Keimbahn-Gen IGLV3-10*01.

- = Keimbahn-Gen Sequenz ist identisch mit der von LM-1. **x**: Die Sequenz unterscheidet sich durch das angegebene Nukleotid von der Keimbahn-Sequenz; **x**: Austausch eines Nukleotides führt zum Austausch einer Aminosäure. Die CDR-Regionen sind durch Balken markiert.

Auch in der VL-Region des Antikörpers PM-2 beschränken sich die Nukleotid-Änderungen auf die Framework-Regionen. Hierbei führen drei dieser Veränderungen zu dem Austausch von Aminosäuren, zwei der Mutationen bleiben still (Abb. 19). Die Homologie zum ermittelten Keimbahn-Gen beträgt im Falle der VL-Region von PM-2 98,2%.

PM-2	CAG TCT GCC CTG ACT CAG CCT GCT TCC	CTC TCT GCA TCT CCT													
IGLV5-45*01	Q S A L T Q P A S	L S A S P													
	A V														
		CDR1													
PM-2	GGA GCA TCA GCC AGT CTC ACC TGC ACC TTG CGC AGT GGC ATC AAT														
IGLV5-45*01	G A S A S L T C T L R S G I N														
PM-2	GTT GGT ACC TAC AGG	ATA TAC TGG TAC CAG CAG AAG CCA GGG													
IGLV5-45*01	V G T Y R	I Y W Y Q Q K P G													

voneinander durchgeführt, jeder Ansatz lag in achtfacher Ausführung vor. Die Farbintensität wurde im ELISA-Reader bei einer Wellenlänge von bei λ_{540} nm und λ_{690} nm bestimmt. In Abbildung 20 ist der Einfluss des Antikörpers PM-1 auf die Proliferation der Adenokarzinom-Zelllinien des Pankreas zusammenfassend dargestellt. Hierbei wurde die Proliferationsrate der Kontrolle, bei der die Zellen in normalem Kulturmedium wuchsen, mit 100% angegeben. Abb. 20A zeigt den Einfluss auf die Zelllinie ASPC-1 nach 24 bzw. 48 h Inkubation.

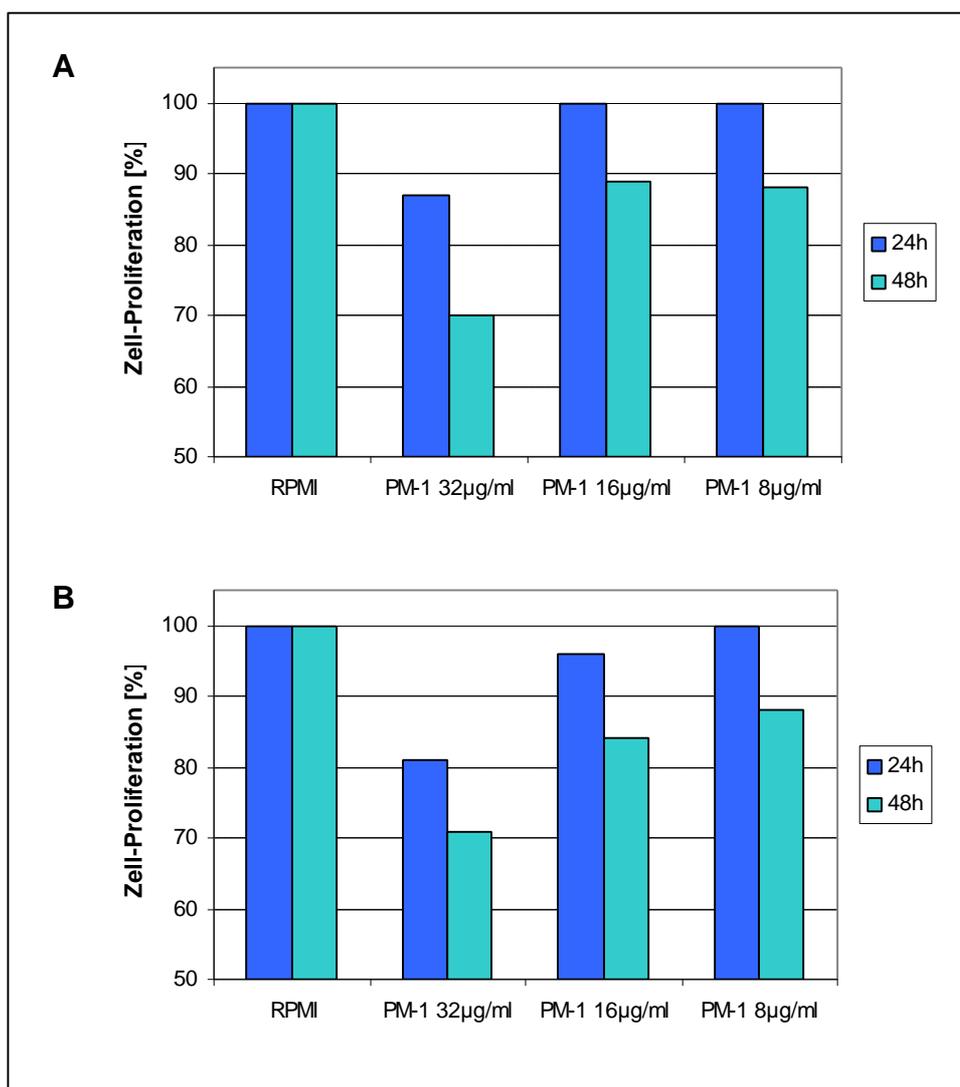
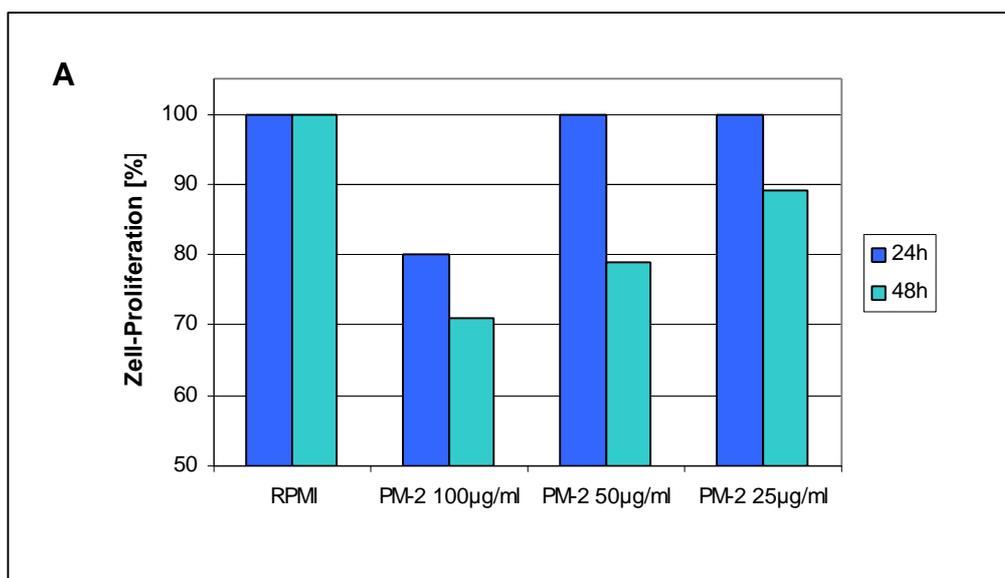


Abb. 20: Messung der Auswirkung des Antikörpers PM-1 auf die Zell-Proliferation von Pankreaskarzinom-Zelllinien mittels MTT-Test. Die Abbildung zeigt den Effekt von verschiedenen Konzentrationen des Antikörpers PM-1 auf die Proliferationsrate der Zelllinie ASPC-1 (A) und BXPC-3 (B) nach 24 und 48 h in %. Hierbei wurde die Proliferationsrate von Zellen, die in normalem Kulturmedium wuchsen, mit 100% angegeben. Bei beiden Zelllinien ist sowohl nach 24 h als auch nach 48 h eine PM-1-Antikörper-induzierte, konzentrationsabhängige Hemmung der Zell-Proliferation zu beobachten.

Nach 24stündiger Inkubation mit dem Antikörper PM-1 zeigt sich ein geringes Maß an konzentrationsabhängiger Hemmung der Zell-Proliferation. Deutlicher wird dieser Effekt nach 48 h Inkubation mit verschiedenen Konzentrationen des Antikörpers PM-1. Hier zeigen Zellen, welche mit einer Konzentration von 32 $\mu\text{g/ml}$ PM-1 inkubiert wurden, eine um 30% verringerte Zell-Proliferation im Vergleich zur Kontrolle. Auch bei der zweiten untersuchten Zelllinie (BXPC-3) zeigt sich nach 24 und 48 h eine deutliche konzentrationsabhängige Proliferations-Hemmung (Abb. 20B) im Vergleich zur normalen Proliferationsrate. Entsprechende Mengen an verbrauchtem Kulturüberstand, welche als Kontrolle mitgeführt wurden, zeigten keinen Effekt auf die Zell-Proliferation der untersuchten Zelllinien.

In Abb. 21 sind die Daten des Antikörpers PM-2 dargestellt. Aufgezeigt sind auch hier die Einflüsse verschiedener Konzentrationen des Antikörpers auf die Proliferation der Adenokarzinom-Zelllinien nach 24 und 48 h. Es zeigt sich das gleiche Bild wie bei Antikörper PM-1. Auch hier zeigen sowohl die ASPC-1- (Abb. 21A) als auch die BXPC-3-Zellen (Abb. 21B) eine deutlich verringerte Zell-Proliferation im Vergleich zur normalen Proliferationsrate.



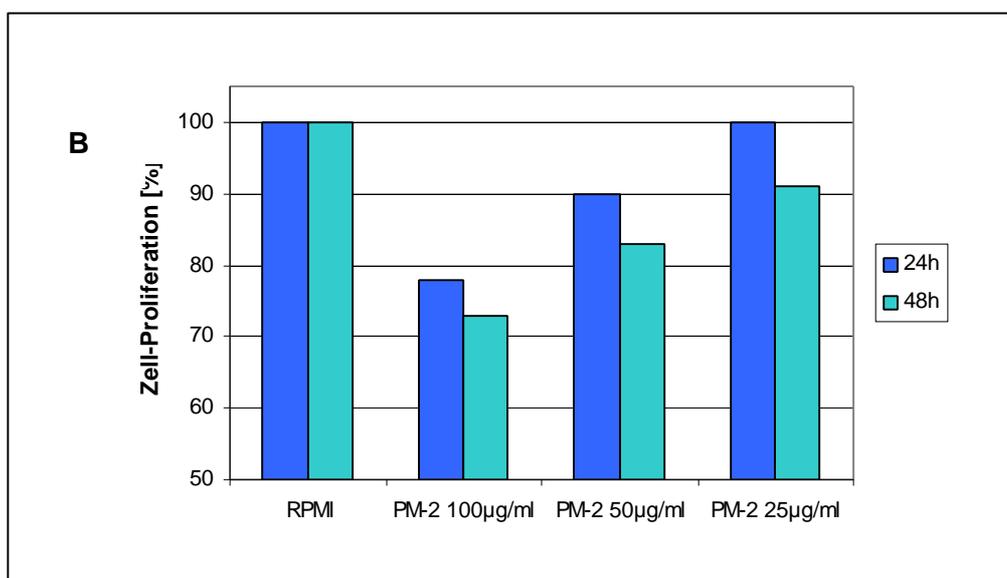


Abb. 21: Messung der Auswirkung des Antikörpers PM-2 auf die Zell-Proliferation von Pankreaskarzinom-Zelllinien mittels MTT-Test. Die Abbildung zeigt den Effekt von verschiedenen Konzentrationen des Antikörpers PM-2 auf die Proliferationsrate der Zelllinie ASPC-1 (A) und BXPC-3 (B) nach 24 und 48 h in %. Hierbei wurde die Proliferationsrate von Zellen, die in normalem Kulturmedium wuchsen, mit 100% angegeben. Bei beiden Zelllinien ist sowohl nach 24 h als auch nach 48 h eine PM-2-Antikörper-induzierte, konzentrationsabhängige Hemmung der Zell-Proliferation zu beobachten.

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

Die Proliferations-Hemmung der Tumorzellen wurde durch einen Apoptose-Test näher charakterisiert. Hierzu wurde die Pankreaskarzinom-Zelllinie BXPC-3 verwendet um eine eventuelle Apoptose-Induktion der Antikörper zu verifizieren.

Zunächst wurden die Tumorzellen in 96-Loch Platten ausgesät und mit Zellkultur-Überständen der PM-1- bzw. PM-2-produzierenden Hybridomzellen in verschiedenen Konzentrationen inkubiert. Nach 24 bzw. 48 Stunden Inkubation im Brutschrank (37°C, 5% CO₂) wurde die relative Anzahl apoptotischer Zellen mittels des Cell Death Detection ELISA^{PLUS} (Roche, Mannheim) ermittelt. Als Negativkontrolle wurden die Zellen einerseits mit der gleichen Menge Kulturmedium und andererseits mit verbrauchtem Zellkulturüberstand, welcher jedoch keine Antikörper enthielt, versetzt. Zusätzlich wurden eine im Test-Kit enthaltene Positivkontrolle und ein Blank-Ansatz mitgeführt. Jeder Ansatz lag in doppelter Ausführung vor. Die Intensität der Antikörper-induzierten Apoptose wurde mit Hilfe eines ELISA-Readers bei λ_{405} nm gegen die Referenzwellenlänge von λ_{490} nm vermessen. Abbildung 22 zeigt die Ergebnisse der

Inkubation mit den Antikörpern PM-1 bzw. PM-2. Bereits nach 24 h zeigte der Antikörper im Vergleich zu den Negativkontrollen eine ausgeprägte konzentrationsabhängige Apoptose-Induktion (A). Dieser Effekt konnte ebenfalls nach 48 Stunden beobachtet werden (B).

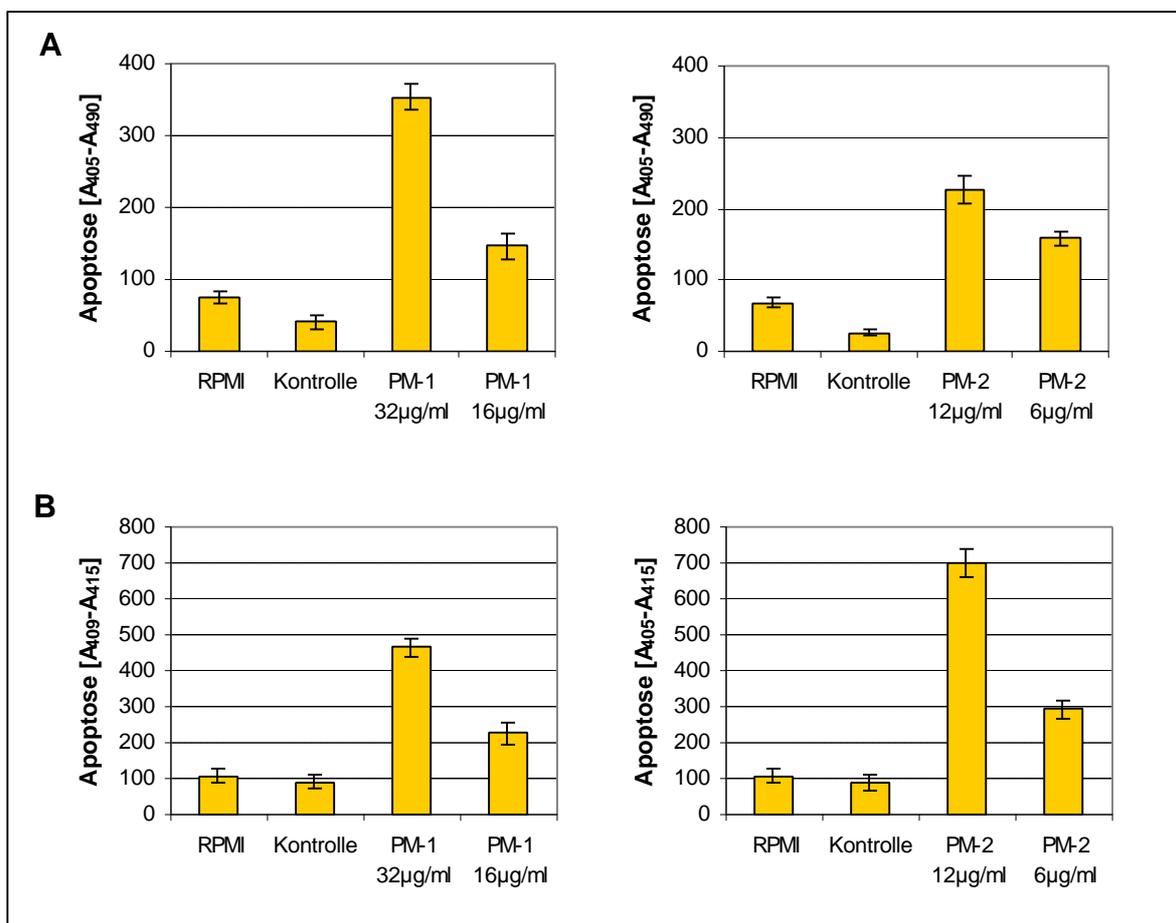


Abb. 22: Messung der Apoptose-Induktion der Antikörper PM-1 und PM-2 auf die Pankreaskarzinom-Zelllinie BXPC-3 mittels Cell Death Detection ELISA^{PLUS}. Tumorzellen wurden in einer 96-Loch Platte für 24 bzw. 48 h im Brutschrank mit verschiedenen Konzentrationen PM-1 und PM-2 Antikörper inkubiert. Anschließend wurde die relative Anzahl apoptotischer Zellen mittels Cell Death Detection ELISA^{PLUS} bestimmt. Die Farbintensität wurde mit dem ELISA-Reader bei λ_{405} nm gegen die Referenzwellenlänge von λ_{490} nm vermessen. Die Abbildung zeigt das Maß an PM-1- und PM-2-induzierter Apoptose nach 24 h (A) und 48 h (B). Im Vergleich zu den Negativkontrollen ist sowohl nach 24 h als auch nach 48 h ist eine deutliche Antikörper-induzierte, konzentrationsabhängige Apoptose der Tumorzelllinie zu beobachten.

3.3.6 Western-Blot Analyse

Um einen ersten Hinweis auf die Antigene zu erhalten, welche durch die Antikörper PM-1 und PM-2 erkannt werden, wurden Western-Blot Analysen durchgeführt. Aus den

immunhistochemischen Untersuchungen war bekannt, dass es sich bei den Antigenen wahrscheinlich um membranständige Moleküle handelt. Aus diesem Grund wurden die Membranproteine von der Pankreaskarzinom-Zelllinie BXPC-3 extrahiert. Die Membranproteine wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt und anschließend im Western-Blot auf Nitrozellulose-Membranen transferiert. Die darauffolgende Immunodetektion wurde mit einer definierten Menge an PM-1- und PM-2-Kulturüberstand durchgeführt (Detektionsbedingungen siehe 2.4.6). Als Kontrolle wurde eine zweite Nitrozellulose-Membran mit der gleichen Menge eines IgM-Kontroll-Antikörpers (Chrompure human IgM) inkubiert.

Abbildung 23 zeigt die Ergebnisse der Western-Blot Analysen.

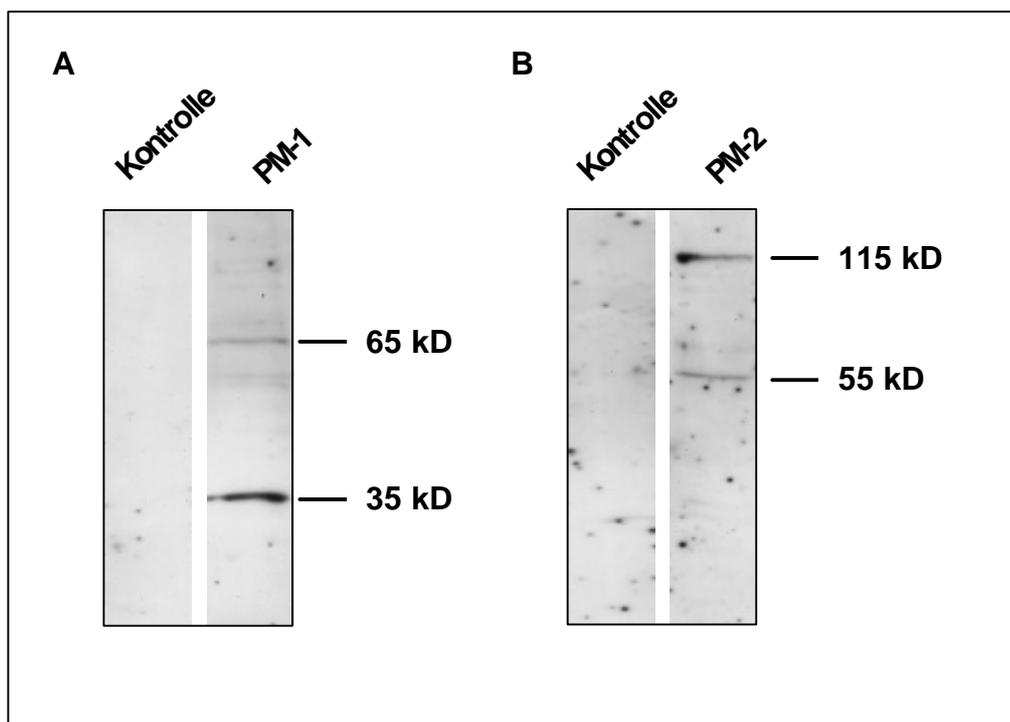


Abb. 23: Western-Blot Analysen mit den Antikörpern PM-1 (A) und PM-2 (B) auf Membranprotein-Lysaten der Pankreaskarzinom-Zelllinie BXPC-3. Membranproteine von BXPC-3 Zellen wurden extrahiert, in einer 10% SDS-PAGE aufgetrennt und auf eine Nitrozellulose-Membran geblottet. Die Detektion der Proteinbanden erfolgte nach Inkubation mit PM-1, PM-2 und humanem Chrompure IgM als Primär-Antikörper und einem Peroxidasegekoppelten Maus anti-human IgM-Antikörper als Sekundär-Antikörper. Die Darstellung erfolgte nach einer Chemilumineszenz-Reaktion durch die Belichtung eines Röntgenfilms.

Der Antikörper PM-1 zeigt eine Bindung an Membranproteine hauptsächlich in zwei Regionen: Eine dominante Proteinbande bei 35 kDa und eine weitere Bande in Bereich von ungefähr 65 kDa.

Auch der Antikörper PM-2 bindet an zwei Membranproteine. Eine detektierte Bande liegt im Bereich von 55 kDa, eine weitere bei 115 kDa. Die durch die Antikörper detektierten Proteinbanden waren in den Kontrollen mit humanem IgM nicht zu beobachten (vgl. Abb. 23).

3.3.7 Einfluss der Proteinglykosylierung auf die Bindung der Antikörper PM-1 und PM-2

Auch im Falle der Antikörper PM-1 und PM-2 sollte untersucht werden, inwieweit das Glykosylierungsmuster der Membranproteine Einfluss auf die Bindung der Antikörper an Zellen der Pankreaskarzinom-Zelllinie BXPC-3 hat. Hierzu wurden Zytospinpräparate der Zellen angefertigt und für 3 h mit O- und N- Glykosidasen behandelt. Anschließend wurden die Zytospins entweder mit dem Antikörper PM-1 oder mit dem Antikörper PM-2 und entsprechenden Kontrollen immunhistochemisch gefärbt.

Abbildung 24 zeigt die Ergebnisse des Glykosidase-Verdau. Dargestellt ist die Färbung von BXPC-3-Zellen mit einer Positivkontrolle (CAM-Keratin) vor und nach Behandlung mit N-Glykosidase (A und B). In Abb. 24C und D sind die Auswirkungen der N-Glykosidase-Inkubation auf die Bindung des Antikörpers PM-2 an die Pankreaskarzinomzellen dargestellt. Es konnte hierbei beobachtet werden, dass die Zellen nach 3stündigem Verdau mit dem Enzym N-Glykosidase nicht mehr mit dem Antikörper PM-2 angefärbt wurden, der Antikörper also nicht mehr an seinen Rezeptor binden konnte.

Auch ein Verdau mit O-Glykosidase führte zu einer Veränderung des Bindungsverhaltens des Antikörpers PM-2 (Abb. 24F). Die Positivkontrolle CAM-Keratin zeigte dagegen keine Veränderung in der immunhistochemischen Färbung (Abb. 24E)

Die durch die Behandlung mit N- bzw. O-Glykosidase beobachtbaren Effekte liefern starke Evidenzen, dass das durch den Antikörper PM-2 erkannte Epitop ein N- / O- gebundener Zucker ist bzw. der N-/O-gebundene Zucker entscheidend in die Bindung involviert ist.

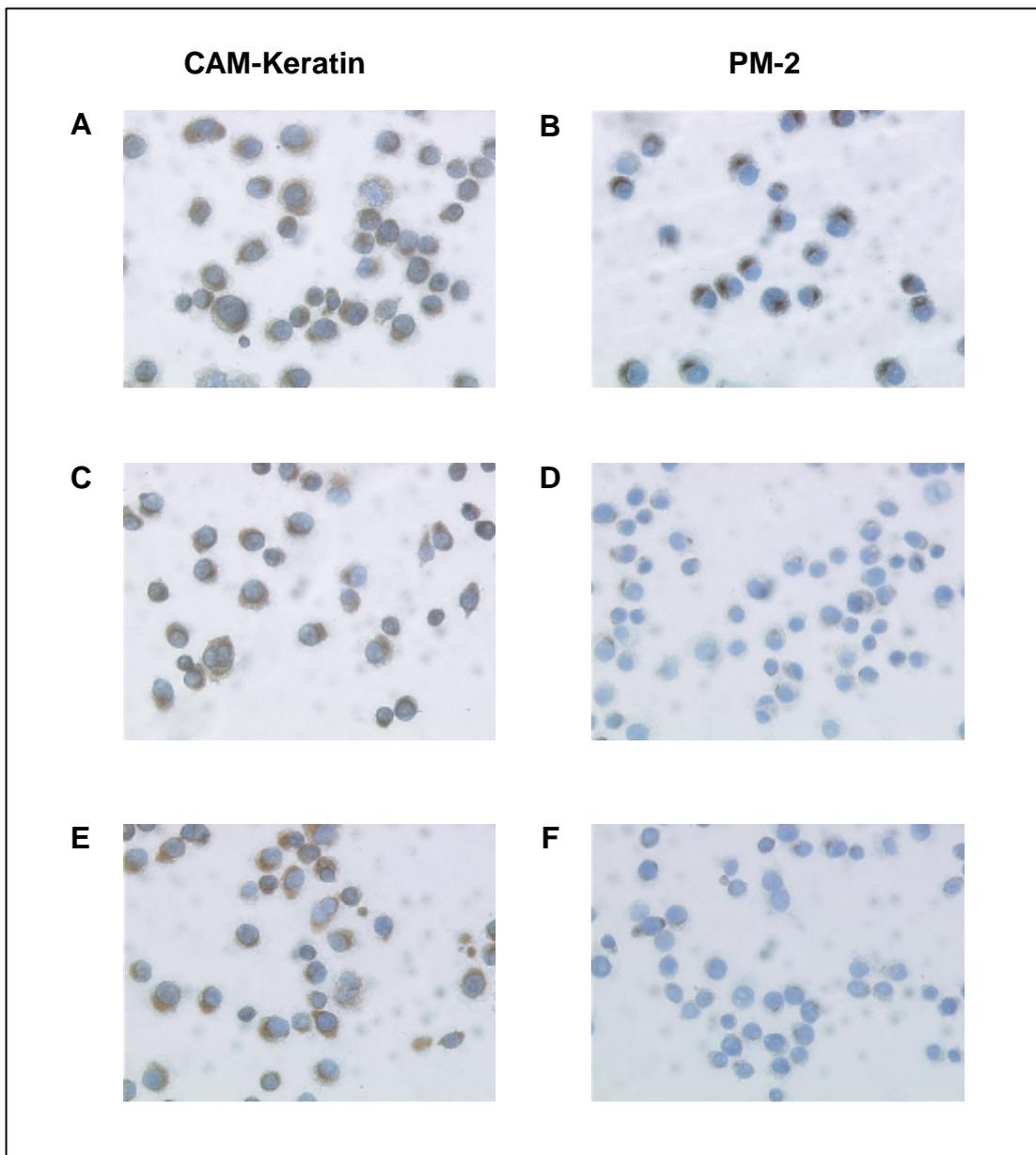


Abb. 24: Einfluss des Glykosidase-Verdau auf die Antikörper-Bindung von PM-2 auf der Zelloberfläche der Zelllinie BXPC-3. Die Zellen wurden nach Ablösen mit Trypsin/EDTA in Kulturmedium aufgenommen und für 60 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurden Zytospins präpariert, an der Luft getrocknet und mit Azeton fixiert. Danach wurden die Zellen mit 2 U/ml N- (B und D) bzw. O-Glykosidase (E und F) inkubiert (3 h, 37°C) bzw. Kontrollen ohne Enzym (A und B) mitgeführt. Nach der Inkubationszeit wurden die Zytospins immunhistochemisch mit der Positivkontrolle CAM-Keratin (A, C, E) und LM-1 (B, D, F) gefärbt.

Auch für den Antikörper PM-1 wurden Zytospin-Präparate der Zellen angefertigt und mit O- und N- Glykosidase behandelt. Durch diesen Versuchsansatz konnte jedoch keine eindeutige Aussage getroffen werden, da sich die Färbungen mit dem Antikörper PM-1 auf den BXPC-3 Zellen generell als sehr schwach herausstellten. Da mit N-Glykosidase jedoch ein leichter Rückgang verzeichnet werden konnte, wurde ein anderer experimenteller

Ansatz gewählt um das Phänomen näher zu charakterisieren. Die Membranproteine der Pankreaskarzinomzellen wurden wie unter 2.4.1 beschrieben isoliert und die erhaltenen Membranextrakte für 16 h bei 37°C mit 2 U/ml N- Glykosidase in Deglykosylierungs-Puffer (50mM Phosphatpuffer, pH 7,2) inkubiert. Die Extrakte wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt und die Proteine auf Nitrozellulose geblottet. Anschließend erfolgte eine Immunodetektion mit dem Antikörper PM-1. Abbildung 25 zeigt den Effekt der Deglykosylierung von Membranproteinen auf die Bindung des Antikörpers PM-1 in der Western-Blot Analyse.

In Spur 1 wurden die unbehandelten Membranproteine aufgetragen, in Spur 2 sind die Membranproteine dargestellt, welche nur mit Deglykosylierungs-Puffer inkubiert waren. In beiden Spuren ist eine deutliche Bindung des Antikörpers PM-1 an Proteine im Bereich von 35 und 65 kDa zu erkennen. Spur 3 zeigt die Membranproteine nach Behandlung mit N-Glykosidase. Es zeigt sich eine deutliche Reduktion der Bindung des Antikörpers an die beiden zuvor genannten Membranproteine. Das Protein im Bereich von 65 kDa war gar nicht mehr detektierbar, bei dem Membranprotein im Bereich von 35 kDa ist eine Verringerung der Antikörperbindung sichtbar.

Auch für Antikörper PM-1 scheint also eine N-gebundene Zuckerverbindung für die Bindung an das entsprechende Epitop von Bedeutung zu sein.

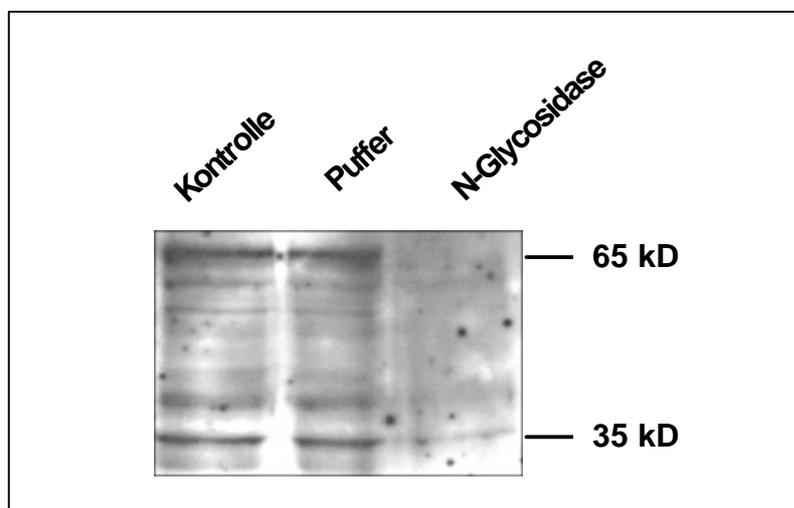


Abb. 25: Verifizierung des Einflusses eines N-Glykosidase-Verdau auf die Antikörper-Bindung von PM-1 an Membranproteine der Zelllinie BXPC-3. Membranextrakte der Pankreaskarzinomzellen wurden isoliert und für 16 h bei 37°C mit 2 U/ml N-Glykosidase in Deglykosylierungspuffer inkubiert. Die Membranproteine wurden in einer 10% SDS-PAGE aufgetrennt und auf eine Nitrozellulose-Membran geblottet. In Spur 1 sind unbehandelte Extrakte aufgetragen, in Spur 2 Extrakte, welche nur mit dem Deglykosylierungs-Puffer inkubiert waren. Spur 3 zeigt die mit N-Glykosidase verdauten Membranproteine. Die Detektion der Proteinbanden erfolgte nach Inkubation mit dem Antikörper PM-1. Dargestellt ist der belichtete Röntgenfilm nach der Chemilumineszenz-Reaktion.

3.4 Isolierung und Charakterisierung der Antikörper CM-1 und CM-2

3.4.1 Ursprung der Antikörper CM-1 und CM-2

Die humanen monoklonalen Antikörper CM-1 und CM-2 konnten durch Isolierung von Lymphozyten aus der Milz eines Patienten mit kolorektalem Karzinom und anschließender Fusion mit dem Heteromyelom HAB-1 gewonnen werden.

Kolorektale Karzinome sind maligne Tumoren des Darmepithels, die mit einer hohen Morbidität und Mortalität assoziiert sind. Mit einer jährlichen Zahl neuer Erkrankungsfälle von 30 bis 40 pro 100000 Einwohner gehören sie in Deutschland zu den häufigsten malignen Neoplasien (Bokemeyer et al., 1997). Der Altersgipfel der Erkrankung liegt zwischen der 6. und 7. Lebensdekade, die Inzidenz und die Mortalität zeigen keine wesentlichen geschlechtsspezifischen Unterschiede (Parkin et al., 1999). Kolorektale Karzinome stellen die zweithäufigste Krebstodesursache sowohl bei Männern als auch bei Frauen dar.

Ätiologisch konnte für die Entstehung eines Kolonkarzinoms neben dem sporadischen Auftreten die Exposition mit bestimmten Risikofaktoren identifiziert werden. Hierzu zählen Ernährungsgewohnheiten wie eine an Fett und tierischen Produkten reiche, aber ballaststoffarme Ernährung, aber auch ein fortgeschrittenes Lebensalter sowie eine familiäre Disposition (Held-Warmkessel, 1998; Wilmink, 1997). Während die beschriebenen Ernährungsgewohnheiten zu einer erhöhten Erkrankungswahrscheinlichkeit führen, stellt die erwähnte familiäre Disposition z.T. obligate Präkanzerosen dar. Als häufig genannte Beispiele sind hier die familiäre adenomatöse Polypose (FAP) sowie das hereditäre nichtpolypöse kolorektale Karzinom (HNPCC) zu nennen.

Die sog. Adenom-Karzinom-Sequenz wird als Modell zur Erklärung der Entstehung kolorektaler Karzinome verwendet (Fearon and Vogelstein, 1990; Kronborg, 2002). Sie postuliert, dass sich bösartige Tumoren aus Adenomen, also primär gutartigen epithelialen Veränderungen entwickeln, die jedoch aufgrund ihres malignen Entartungspotentials als präkanzeröse Läsionen eingestuft werden müssen (Cummings, 2000; Scheiden et al., 2000; Wehrmann and Fruhmorgen, 2000).

Das Ausmaß der Metastasierung kolorektaler Karzinome steigt mit dem T- und N-Stadium des Tumors sowie dem Grad der Entdifferenzierung im histologischen Präparat (Okabe et al., 1998). Ab dem Durchbruch der Lamina muscularis mucosae und Infiltration der Submukosa ist mit ersten Lymphknotenmetastasen zu rechnen (Mitooka, 2000). Die

hämato gene Streuung erfolgt über die Pfortader aufgrund des sog. first-pass-Effekts in die Leber (Mizuno et al., 1998). Erst später werden Lunge, Skelett, Gehirn und weitere Organe des großen Kreislaufs befallen (Horton et al., 2000; Mezger et al., 1997).

Da sich kolorektale Karzinome in der Mehrzahl der Fälle aus prämaligen adenomatösen Vorläuferläsionen entwickeln, trägt die frühe Diagnose und systematische Entfernung dieser Polypen entscheidend zur Prävention kolorektaler Karzinome bei.

Während frühe Tumorstadien durch eine operative Therapie in der Regel mit einer hohen Heilungswahrscheinlichkeit verbunden sind, bereiten weiterhin die fortgeschrittenen Tumorstadien sowie Tumorrezidive therapeutische Probleme. Trotz Verbesserung insbesondere der chemotherapeutischen Strategien (5-Fluorouracil (5-FU) in Kombination mit Leucovorin®) bleibt diese Erkrankung vor allem wegen ihrer hohen Prävalenz eine der ganz häufigen Krebstodesursachen, so dass dringend nach neuen Therapieformen gesucht wird.

Der Patient, aus dem die Antikörper CM-1 und CM-2 isoliert wurden, war an einem mäßig differenzierten Adenokarzinom des Rektums erkrankt. Das Tumorstadium wurde im Pathologischen Institut nach der UICC-Klassifizierung mit T2N0Mx diagnostiziert, der Tumorgrad nach Lauren wurde mit G2 angegeben. Dem Patienten wurde bei der Operation zusätzlich zu dem Tumorgewebe auch die Milz entnommen, sodass für die Fusionen Lymphozyten aus der Milz verwendet werden konnten.

In Tabelle 18 sind die Fusionsbedingungen, welche zur Isolierung der Antikörper CM-1 und CM-2 führten, angegeben.

Tab. 18: Fusionsbedingungen und Effizienz der CM-1 und CM-2 Fusion

Antikörper	CM-1	CM-2
Anzahl verwendeter Lymphozyten	1,3 x 10 ⁸	9 x 10 ⁷
Anzahl verwendeter HAB-1 Zellen	7,5 x 10 ⁷	5 x 10 ⁷
Menge an verwendetem PEG	1 ml	1 ml
Fusionseffizienz	67%	31%
ELISA-positive Hybridoma-Überstände	32%	13%

Im Falle der CM-1 Fusion wuchsen von 144 zur Verfügung stehenden wells in insgesamt 96 wells Klone heran. Das entspricht einer Fusionseffizienz von 67%. Von diesen Klonen

waren 31% im nachfolgenden ELISA positiv, d.h. sie produzierten Immunglobuline. Bei der Anzahl an Immunglobulin-Isotypen entfielen 60% auf IgM, 10% auf IgG und 30% auf den IgA-Isotyp. Bei der immunhistochemischen Färbung auf autologem Tumorgewebe zeigten 5 IgM-Antikörper eine positive Reaktion mit Tumorzellen. Diese Antikörper wurden im Folgenden rekloniert. Auch die erhaltenen Reklone wurden immunhistochemisch auf autologem Tumorgewebe analysiert. Der IgM-Antikörper CM-1 wurde für die weitere Testung herangezogen, da er die höchste Spezifität mit dem Tumorgewebe zeigte.

Im Falle der CM-2 Fusion wuchsen von 96 vorhandenen wells in insgesamt 30 wells Klone heran, was einer Fusionseffizienz von 30% entspricht. Von diesen Klonen waren 13% im anschließen durchgeführten ELISA-Test positiv, 50 % der Immunglobuline waren vom IgM-Isotyp, 25% IgG und 25% vom IgA-Isotyp. Bei der immunhistochemischen Färbung zeigten zwei IgM-Antikörper eine positive spezifische Reaktion mit autologen Tumorzellen. Diese IgM-Antikörper wurde nachfolgend rekloniert und die erhaltenen Reklone erneut immunhistochemisch auf autologem Tumorgewebe analysiert. Der Reklon CM-2, welcher das beste Färbeergebnis lieferte, wurde für die weitere Testung verwendet.

3.4.2 Analyse der Tumorspezifität der Antikörper CM-1 und CM-2

Die Antikörper CM-1 und CM-2 wurden mittels Immunperoxidase-Färbungen auf Kryo- und Paraffinschnitten auf Kreuzreaktivität mit gesunden und maligne entarteten Geweben getestet.

Abbildung 26 zeigt Beispiele der Antikörper-Färbungen auf verschiedenen Tumorgeweben. Neben den Immunperoxidase-Färbungen mit einer geeigneten Positivkontrolle, einer Negativkontrolle und den Antikörpern CM-1 und CM-2 ist zur histomorphologischen Begutachtung auch eine Hämatoxylin/Eosin-Färbung dargestellt.

Abbildung 26A zeigt eine deutlich positive Reaktivität des Antikörpers CM-1 und der Positivkontrolle AE1/AE3 auf einem Adenokarzinom des Kolon, Abbildung 26B demonstriert die gleichen Befunde auf einem invasiv duktalem Karzinom der Brust. Als entsprechende Positivkontrolle für diesen Tumortyp wurde Cytokeratin 8 verwendet.

Auch auf Plattenepithelkarzinomen des Ösophagus (Abb. 26C) zeigte der Antikörper CM-1 eine spezifische Reaktion mit Tumorzellen. Die entsprechend verwendete Positivkontrolle war in diesem Fall Cytokeratin 5/6.

Die immunhistochemischen Färbungen demonstrieren deutlich, dass der Antikörper CM-1 spezifisch an die Tumorzellen der Gewebeschnitte bindet. Es werden gleichermaßen Adenokarzinome und Plattenepithelkarzinome markiert. Das den Tumor umgebende Gewebe zeigt dagegen keine Reaktion. Auch die Negativkontrolle, bei der nur der Sekundär-Antikörper verwendet wurde, zeigt keinerlei Farbreaktionen.

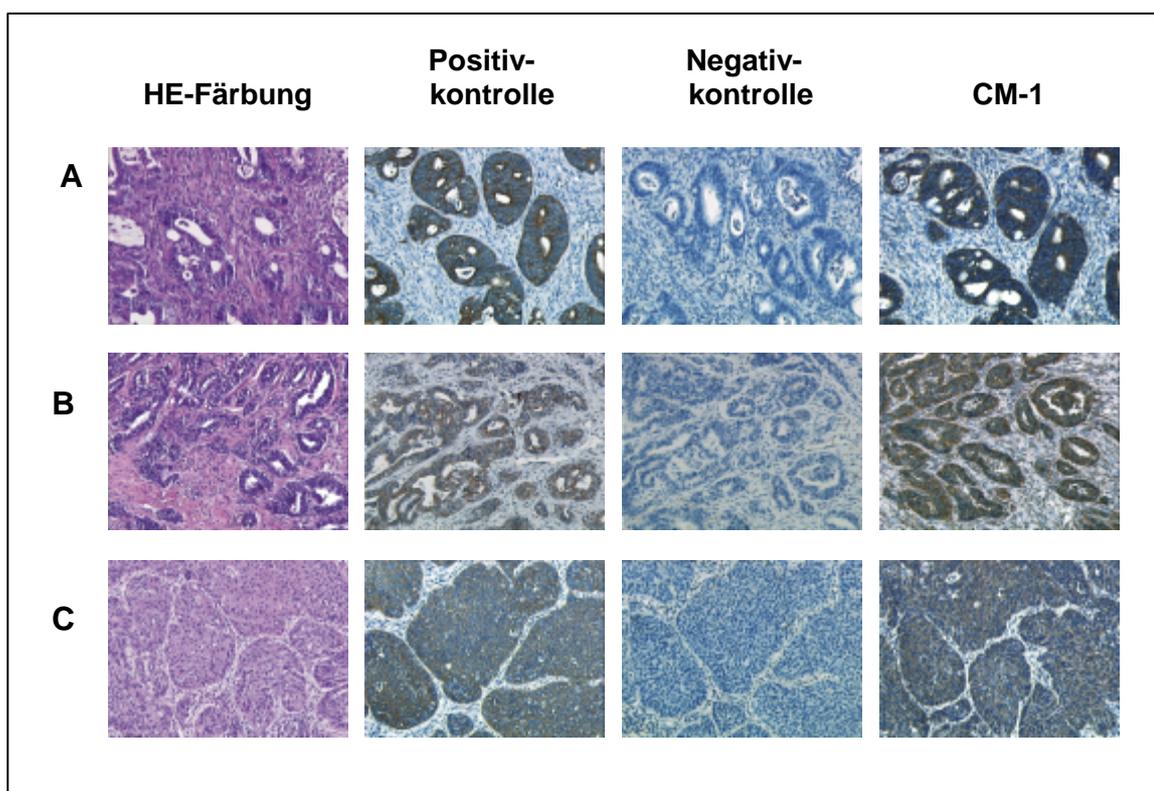


Abb. 26: Immunhistochemische Untersuchung zur Untersuchung der Tumorspezifität des Antikörpers CM-1 auf verschiedenen Tumoren. Paraffinschnitte von Tumorgeweben wurden entweder nur mit Hämatoxylin/Eosin, einer dem Tumor entsprechenden Positivkontrolle, dem Sekundär-Antikörper als Negativkontrolle, sowie mit 25 µg/ml des Antikörpers CM-1 gefärbt: A, Adenokarzinom des Kolon; B, invasiv duktales Karzinom der Brust; C, Plattenepithelkarzinom des Ösophagus. Original Vergrößerung x 100.

Im Falle des Antikörpers CM-2 zeigten sich positive Reaktionen mit Tumorzellen nur bei kolorektalen Adenokarzinomen. Von diesem Tumortyp wurden ca. 40% der untersuchten Karzinome durch den Antikörper positiv markiert. Alle anderen getesteten Tumortypen zeigten keine positive Reaktion mit dem Antikörper. Abbildung 27 zeigt eine immunhistochemische Färbung mit dem Antikörper CM-2 auf einem kryokonservierten kolorektalen Karzinom. Der Antikörper bindet spezifisch an die Tumorzellen, nicht aber an

das normale umgebende Gewebe. Als Positivkontrolle wurde der Antikörper AE1/AE3 verwendet.

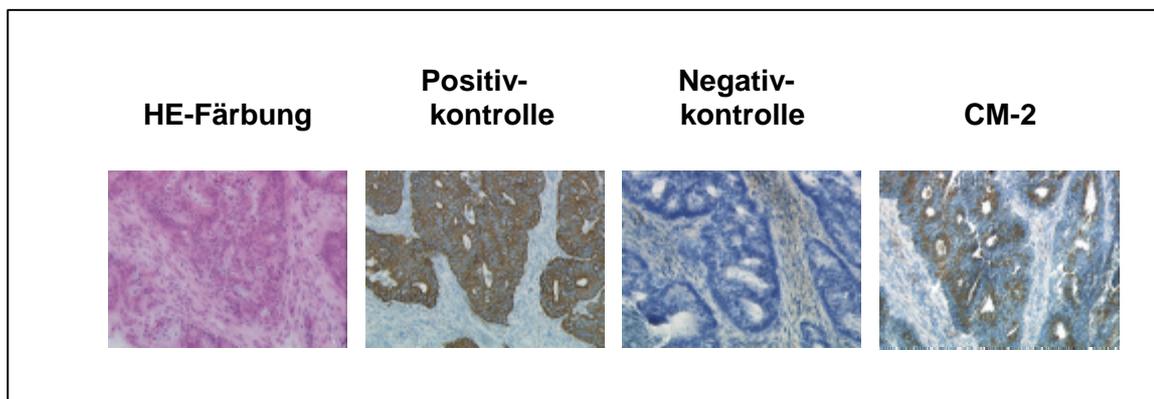


Abb. 27: Immunhistochemische Untersuchung zur Untersuchung der Tumorspezifität des Antikörpers CM-2. Kryoschnitte eines kolorektalen Adenokarzinoms wurden entweder nur mit Hämatoxylin/Eosin, mit AE1/AE3 als Positivkontrolle, dem Sekundär-Antikörper als Negativkontrolle, sowie mit 25 µg/ml des Antikörpers CM-2 gefärbt. Original Vergrößerung x 100

In Tabelle 19 sind die Ergebnisse der immunhistochemischen Studien auf verschiedenen mit CM-1 und CM-2 getesteten Tumoren zusammengefasst. Es wurden zwischen 1 und 27 verschiedene Fälle pro Karzinom-Typ untersucht. Im Falle des Antikörpers CM-1 wurden insgesamt 65 verschiedene Karzinome getestet. Wie aus der Tabelle ersichtlich reagierte der Antikörper mit einer Vielzahl der getesteten Karzinome. Im Falle der kolorektalen Karzinome, von denen insgesamt 27 verschiedene Fälle untersucht wurden, konnte eine positive Reaktion mit über 90% der getesteten Karzinome festgestellt werden. Von den untersuchten Pankreaskarzinomen wurde dagegen nur ein Fall von sechs durch den Antikörper CM-1 positiv markiert. Auch bei Magenkarzinomen wurde nur ein Drittel der Fälle erkannt.

Insgesamt wurden 63 verschiedene Fälle immunhistochemisch mit dem CM-2 Antikörper getestet. Wie schon erwähnt wurden ausschließlich kolorektale Karzinome positiv markiert, davon jedoch nur eine begrenzte Anzahl. Alle anderen Tumortypen zeigten in keiner der durchgeführten Testungen eine positive Reaktion.

Tab. 19: Tumorreaktivität der Antikörper CM-1 und CM-2

Gewebe	Tumortyp	CM-1 (+ / -)	CM-2 (+ / -)
Magen	Adeno	1/2	0/3
Kolon	Adeno	25/2	11/16
Lunge	Adeno	3/1	0/4
	Plattenepithel	2/1	0/3
Ösophagus	Plattenepithel	3/0	0/3
Pankreas	Adeno	1/5	0/6
Prostata	Adeno	4/3	0/5
Brust	Invasiv ductal	3/0	0/3
	Invasiv lobulär	1/2	0/3
Ovar	Adeno	2/1	0/2
Uterus	Adeno	2/0	0/3
Blase	Urothel	0/1	0/1

Um die Tumorspezifität der Antikörper genauer zu charakterisieren wurden zusätzlich eine Reihe von immunhistochemischen Untersuchungen auf Kryoschnitten von Normalgeweben durchgeführt. Von jedem Gewebe wurden drei unabhängige Färbungen durchgeführt. Die Ergebnisse der Färbungen sind in Tabelle 20 zusammengefasst.

Tab. 20: Ergebnisse der immunhistochemischen Untersuchung der Antikörper CM-1 und CM-2 auf normalen Geweben

Gewebe	Zelltyp	CM-1	CM-2
Magen	glandulär	-	-
Kolon	glandulär	-	-
Lunge	epithelial	-	-
Ösophagus	epithelial	+	-
Pankreas	glandulär	-	-
Prostata	glandulär	-	-
Brust	glandulär	-	-
Dünndarm	glandulär	-	-
Blase	urothel	-	-
Nebenniere	neuroendokrin	-	-
Schilddrüse	glandulär	-	-
Niere	epithelial	-	-
Hoden	germinal	-	-
Ovar	germinal	-	-
Uterus	glandulär	-	-

Wie aus der Tabelle ersichtlich wies der Antikörper CM-2 keine Kreuzreaktivität mit normalem Gewebe auf. Bei Antikörper CM-1 zeigte sich dagegen eine positive Reaktion mit normalem Ösophagusgewebe. Die anderen getesteten Normalgewebe waren jedoch nicht betroffen.

3.4.3 Genetische Analyse der variablen Region der schweren Immunglobulin-Kette der Antikörper CM-1 und CM-2

Auch die VH-Region der monoklonalen Antikörper CM-1 und CM-2 wurde analog dem Vorgehen der anderen Anikörper mit spezifischen Primern für die VH-Familien durch PCR amplifiziert und so die VH-Gene bestimmt. Bei dem Antikörper CM-1 handelt es sich um ein Gen aus der VH3-Familie, bei CM-2 um ein Gen aus der VH5-Familie. Zur weiteren Untersuchung wurden die PCR-Fragmente aus dem Gel eluiert, separat in einen pCR-Script-Vektor kloniert und die PCR-Fragment von beiden Seiten mit T₃- und T₇-Primern sequenziert. Für die erhaltenen Sequenzen wurden mit Hilfe der DNAPLOT/IMGT Datenbank die homologen Keimbahn-Gene identifiziert und die Anzahl der Mutationen bestimmt. Hierbei zeigte sich, dass die Sequenz der variablen Region der schweren Immunglobulinkette des Antikörpers CM-1 homolog zu dem Keimbahn-Gen IGHV3-30/3-30.5*01 (DP-49) ist. Das zugehörigen D-Segment konnte nicht identifiziert werden, die Sequenz des J-Segmentes ist homolog zu der Keimbahn-Sequenz IGHJ5*01. Die untersuchte VH-Region weist bei Antikörper CM-1 keinerlei Mutation gegenüber der Sequenz des Keimbahn-Gens auf und ist dieser somit zu 100% homolog.

Abbildung 28 zeigt den Sequenzvergleich der VH-Region von CM-1 mit seinem homologen Keimbahn-Gen IGHV3-30/3-30.5*01. Die Sequenzanalysen zeigen, dass es sich bei den Antikörpern CM-1 und CM-2 um natürliche Antikörper handelt, welche keiner Affinitätsreifung durch somatische Hyper-Mutation unterlagen.

	CDR1														
CM-1	AGG	TCC	CTG	AGA	CTC	TCC	TGT	GCA	GCC	TCT	GGA	TTC	ACC	TTC	AGT
IGHV3-30	R	S	L	R	L	S	C	A	A	S	G	F	T	F	S
	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
CM-1	AGC	TAT	GGC		ATG	CAC	TGG	GTC	CGC	CAG	GCT	CCA	GGC	AAG	GGG
IGHV3-30	S	Y	G		M	H	W	V	R	Q	A	P	G	K	G
	---	---	---		---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---

	CDR2															
CM-1	CTG	GAG	TGG	GTG	GCA	GTT	ATA	TCA	TAT	GAT	GGA	AGT	AAT	AAA		
	L	E	W	V	A	V	I	S	Y	D	G	S	N	K		
IGHV3-30	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---		
CM-1	TAC	TAT	GCA	GAC	TCC	GTG	AAG			GGC	CGA	TTC	ACC	ATC	TCC	AGA
	Y	Y	A	D	S	V	K			G	R	F	T	I	S	R
IGHV3-30	---	---	---	---	---	---	---			---	---	---	---	---	---	---
CM-1	GAC	AAT	TCC	AAG	AAC	ACG	CTG	TAT	CTG	CAA	ATG	AAC	AGC	CTG	AGA	
	D	N	S	K	N	T	L	Y	L	Q	M	N	S	L	R	
IGHV3-30	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	
CM-1	GCT	GAG	GAC	ACG	GCT	GTG	TAT	TAC	TGT	GCG	AAA					
	A	E	D	T	A	V	Y	Y	C	A	K					
IGHV3-30	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---					
CM-1	CGG	TCT	TCG	GGC	TAC	TAC	GGT	ATG	GAC	GTC	TGG	GGC	CAA	GGC	ACC	
	R	S	S	G	Y	Y	G	M	D	V	W	G	Q	G	T	
CM-1	CTG	GTC	ACC													
	L	V	T													

Abb. 28: Sequenzvergleich der VH-Region des monoklonalen Antikörpers CM-1 mit dem homologen Keimbahn-Gen.

- = Keimbahn-Gen Sequenz ist identisch mit der von IGHV3-30/3-30.5*01. Die CDR-Regionen sind durch Balken markiert. Die Sequenz der VH-Region des Antikörpers CM-1 ist zu 100% homolog zum Keimbahn-Gen.

Die homologe Keimbahn-Gen-Sequenz der variablen Region der schweren Immunglobulinkette des Antikörpers CM-2 ist IGHV5-51*01 (DP73). Die Sequenz des D-Segmentes ist homolog zu IGHD5-12*01. Die Sequenz des J-Segmentes ist bei Antikörper CM-2 homolog zu IGHJ6*02. Die Sequenz des Antikörpers weist insgesamt 8 Mutationen im Vergleich zum homologen Keimbahn-Gen auf. Drei dieser Mutationen entfallen auf den Bereich der Framework-Region, wovon zwei zu einem Austausch von Aminosäuren führen. Fünf Mutationen befinden sich in der CDR-Region. Davon führen drei Mutationen zu einem Aminosäure-Austausch, zwei Änderungen in der Nukleotidsequenz bleiben dagegen still (siehe Abb. 29).

CM-2	AAA AAG CCC GGG GAG TCT CTG AGG ATC TCC TGT AAG GGC TCT GGA
	K K P G E S L R I S C K G S G
IGHV5-51*01	--- --- --- --- --- --- --- -A- --- --- --- --- --T --- ---
	K
CDR1	
CM-2	TAC AGT TTT ACC ACC TAC TGG ATC GGC TGG GTG CGC CAG ATG
	Y S F T T Y W I G W V R Q M
IGHV5-51*01	--- --C --- --- -G- --- --- --- --- --- --- ---
	S
CDR2	
CM-2	CCC GGG AAA GGC CTG GAG TGG ATG GGG ATC ATC TAT CCT GGT GAC
	P G K G L E W M G I I Y P G D
IGHV5-51*01	--- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- ---
CM-2	TCT GAT ACC AGA TAC AGC CCG TCC TTC CAA GGC CAG GTC
	S D T R Y S P S F Q G Q V
IGHV5-51*01	--- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- ---
CM-2	ACC ATC TCA GCC GAC ACG TCC ATC AGT ACC GCC TAC CTG CAG TGG
	T I S A D T S I S T A Y L Q W
IGHV5-51*01	--- --- --- --- --- -A- --- --- --C --- --- --- --- ---
	K
CM-2	AGC AGC CTG AAG GCC TCG GAC ACC GCC ATA TAT TAC TGT GCG AGA
	S S L K A S D T A I Y Y C A R
IGHV5-51*01	--- --- --- --- --- --- --- --- --- --G --- --- --- --- ---
	M
CM-2	CAG
	E
IGHV5-51*01	--C
	H
CM-2	GTC TAT ACT GGC CGA AAC TAC TAC TAC TAC GGT CTG GAC GTC TGG
	V Y T G R N Y Y Y Y G L D V W
IGHV5-51*01	--- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- ---
CM-2	GGC CAA GGA ACC CTG GTC AC
	G Q G T L V

Abb. 29: Sequenzvergleich der VH-Region des monoklonalen Antikörpers CM-2 mit dem homologen Keimbahn-Gen.

- = Keimbahn-Gen Sequenz ist identisch mit der von CM-2. **x**: Die Sequenz unterscheidet sich durch das angegebene Nukleotid von der Keimbahn-Sequenz; **x**: Austausch eines Nukleotides, welcher zum Austausch einer Aminosäure führt. Die CDR-Regionen sind durch Balken markiert. Die Sequenz der VH-Region des Antikörpers CM-2 ist zu 97,2% homolog zum Keimbahn-Gen IGHV5-51*01.

CM-2	AAC	ACG	GCC	TCC	CTG	ACC	ATC	TCT	GGA	CTC	CAG	GCT	GAG	GAC	GAG
	N	T	A	S	L	T	I	S	G	L	Q	A	E	D	E
IGLV2-14*01	---	---	---	---	---	---	---	---	--G	---	---	---	---	---	---
	CDR3														
CM-2	GCT	GAT	TAC	TAC	TGC	AGC	TCA	AAA	AGA	AGC	AGC	AAC	ACT	CTA	
	A	D	Y	Y	C	S	S	K	R	S	S	N	T	L	
IGLV2-14*01	---	---	--T	---	---	---	---	T-T	-C-	---	---	-G-	---	--C	
								Y	T			S			
CM-2	GTA	TTC	GGC	GGA	GGG	ACC	AAG	CTG	ACC	GTC	CTA	GG			
	V	F	G	G	G	T	K	L	T	V	L				

Abb. 31: Sequenzvergleich der VL-Region des monoklonalen Antikörpers CM-2 mit dem homologen Keimbahn-Gen IGLV2-14*01.

- = Keimbahn-Gen Sequenz ist identisch mit der von LM-1. **X**: Die Sequenz unterscheidet sich durch das angegebene Nukleotid von der Keimbahn-Sequenz; **X**: Austausch eines Nukleotides führt zum Austausch einer Aminosäure. Die CDR-Regionen sind durch Balken markiert.

3.4.5 Funktionelle Analyse der Antikörper CM-1 und CM-2

3.4.5.1 Proliferationstest (MTT-Assay)

Um den Einfluss der Antikörper CM-1 und CM-2 auf das Wachstum verschiedener Kolonkarzinom-Zelllinien *in vitro* näher zu untersuchen wurden funktionelle zellbiologische Tests durchgeführt.

Zunächst wurden Tumorzellen verschiedener Kolonkarzinom-Zelllinien (CACO-2 und COLO 206F) in 96-Loch Platten ausgesät und mit Zellkultur-Überständen der CM-1- bzw. CM-2-produzierenden Hybridomzellen in verschiedenen Konzentrationen inkubiert. Nach 24 bzw. 48 Stunden wurde die Proliferation der Kolonkarzinom-Zelllinien mit Hilfe des MTT-Assays bestimmt. Die Tests wurden mit jeder Zelllinie dreimal unabhängig voneinander durchgeführt, jeder Ansatz lag in achtfacher Ausführung vor. Die Farbintensität wurde im ELISA-Reader bei einer Wellenlänge von λ_{540} nm und λ_{690} nm bestimmt. In Abbildung 32 ist der Einfluss des Antikörpers CM-1 auf die Proliferation der Adenokarzinom-Zelllinien des Kolons zusammenfassend dargestellt. Hierbei wurde die Proliferationsrate der Kontrolle, bei der die Zellen in normalem Kulturmedium wuchsen, mit 100% angegeben. Abb. 32A zeigt den Einfluss auf die Zelllinie CACO-2 nach 24 bzw. 48h Inkubation.

Nach 24stündiger Inkubation mit dem Antikörper CM-1 zeigt sich bereits eine konzentrationsabhängiger Hemmung der Zell-Proliferation. Deutlicher wird dieser Effekt

nach 48 h Inkubation mit verschiedenen Konzentrationen des Antikörpers CM-1. Auch bei der zweiten untersuchten Zelllinie (COLO-206F) zeigt sich nach 24 und 48 h eine deutliche konzentrationsabhängige Proliferations-Hemmung (Abb. 32B) im Vergleich zur normalen Proliferationsrate.

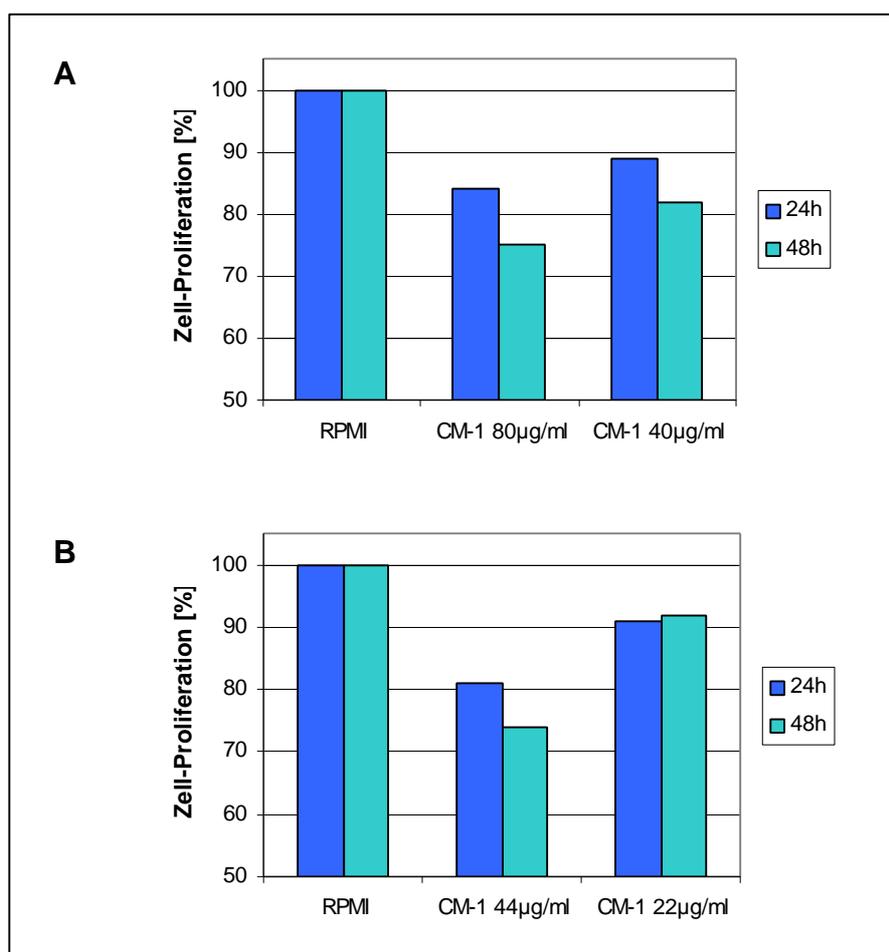


Abb. 32: Messung der Auswirkung des Antikörpers CM-1 auf die Zell-Proliferation von Kolonkarzinom-Zelllinien mittels MTT-Test. Die Abbildung zeigt den Effekt von verschiedenen Konzentrationen des Antikörpers CM-1 auf die Proliferationsrate der Zelllinie CACO-2 (A) und COLO-206F (B) nach 24 und 48 h in %. Hierbei wurde die Proliferationsrate von Zellen, die in normalem Kulturmedium wuchsen, mit 100% angegeben. Bei beiden Zelllinien ist sowohl nach 24 h als auch nach 48 h eine CM-1-Antikörper-induzierte, konzentrationsabhängige Hemmung der Zell-Proliferation zu beobachten.

In Abbildung 33 sind die Daten der MTT-Assays des Antikörpers CM-2 dargestellt. Aufgezeigt sind auch hier die Einflüsse verschiedener Konzentrationen des Antikörpers auf die Proliferation der Adenokarzinom-Zelllinien nach 24 und 48 h. Auch hier zeigen sowohl die CACO-2- (Abb. 33A) als auch die COLO-206F-Zellen (Abb. 33B) eine deutlich

verringerte Zell-Proliferation im Vergleich zur normalen Proliferationsrate. Zu beobachten war außerdem, dass der Antikörper CM-2 – obwohl er in niedrigeren Konzentrationen eingesetzt wurde als Antikörper CM-1 – einen höheren Prozentsatz an Antikörper-induzierter Proliferations-Hemmung zeigte. Dieser Effekt konnte bei beiden verwendeten Zelllinien beobachtet werden.

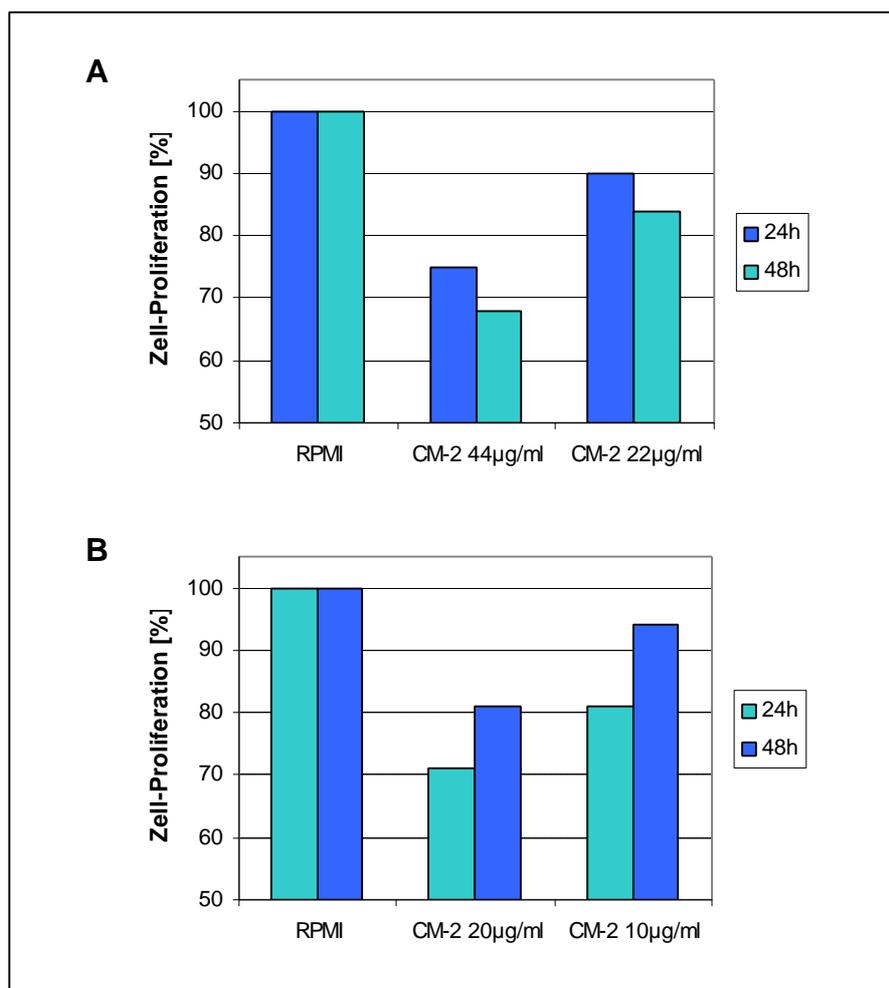


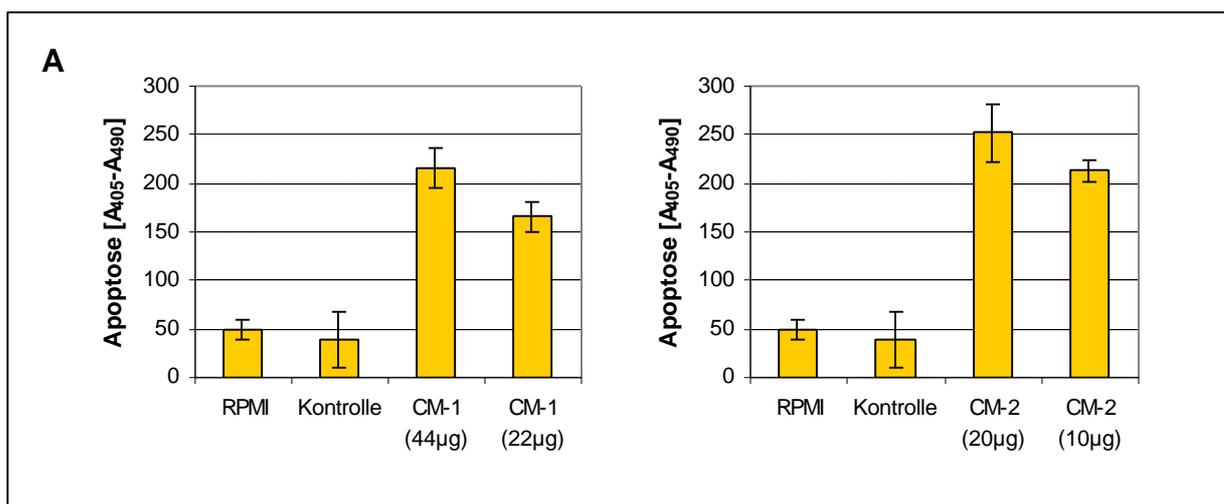
Abb. 33.: Messung der Auswirkung des Antikörpers CM-2 auf die Zell-Proliferation von Kolonkarzinom-Zelllinien mittels MTT-Test. Die Abbildung zeigt den Effekt von verschiedenen Konzentrationen des Antikörpers CM-2 auf die Proliferationsrate der Zelllinie CACO-2 (A) und COLO-206F (B) nach 24 und 48 h in %. Hierbei wurde die Proliferationsrate von Zellen, die in normalem Kulturmedium wuchsen, mit 100% angegeben. Bei beiden Zelllinien ist sowohl nach 24 h als auch nach 48 h eine CM-2-Antikörper-induzierte, konzentrationsabhängige Hemmung der Zell-Proliferation zu beobachten.

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

Die Antikörper-induzierte Proliferations-Hemmung der Tumorzellen wurde mit Hilfe eines Apoptose-Tests näher charakterisiert. Hierzu wurde die Kolonkarzinom-Zelllinie COLO-206F verwendet um eine Aussage über eine eventuelle Apoptose-Induktion der Antikörper treffen zu können.

Zunächst wurden die Tumorzellen in 96-Loch Platten ausgesät und mit Zellkultur-Überständen der CM-1- bzw. CM-2-produzierenden Hybridomzellen in verschiedenen Konzentrationen inkubiert. Nach 24 bzw. 48 Stunden Inkubation im Brutschrank (37°C, 5% CO₂) wurde die relative Anzahl apoptotischer Zellen mittels des Cell Death Detection ELISA^{PLUS} (Roche, Mannheim) ermittelt. Als Negativkontrolle wurden die Zellen einerseits mit der gleichen Menge Kulturmedium und andererseits mit verbrauchtem Zellkulturüberstand, der keine Antikörper enthielt, versetzt. Zusätzlich wurden eine im Test-Kit enthaltene Positivkontrolle und ein Blank-Ansatz mitgeführt. Jeder Ansatz lag in doppelter Ausführung vor. Die Intensität der Antikörper-induzierten Apoptose wurde mit Hilfe eines ELISA-Readers bei λ_{405} nm gegen die Referenzwellenlänge von λ_{490} nm vermessen. Abbildung 34 zeigt die Ergebnisse der Inkubation mit den Antikörpern CM-1 und CM-2.

Nach 24stündiger Inkubation mit den Antikörpern zeigte sich im Vergleich zu den Negativkontrollen eine ausgeprägte konzentrationsabhängige Apoptose-Induktion (Abb. 34A). Dieser Effekt konnte ebenfalls nach 48 Stunden beobachtet werden (Abb. 34B). Auch bei diesem Assay war deutlich sichtbar, dass der Antikörper CM-2 deutlich mehr Apoptose induziert, obwohl er in geringerer Konzentration eingesetzt wurde.



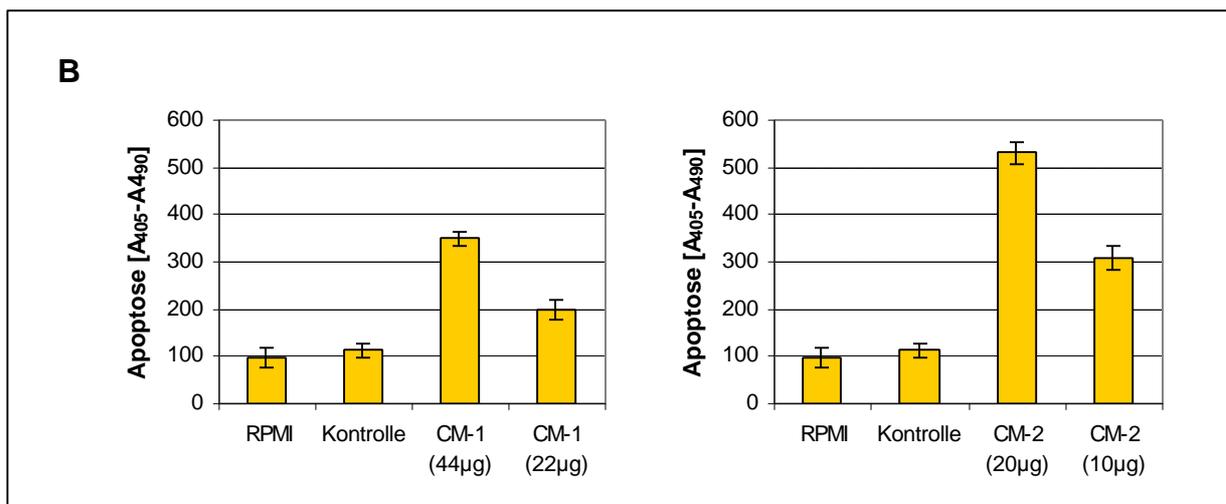


Abb. 34: Messung der Apoptose-Induktion der Antikörper CM-1 und CM-2 auf die Kolonkarzinom-Zelllinie COLO-206F mittels Cell Death Detection ELISA^{PLUS}. Tumorzellen wurden in einer 96-Loch Platte für 24 bzw. 48 h im Brutschrank mit verschiedenen Konzentrationen CM-1 und CM-2 Antikörper inkubiert. Anschließend wurde die relative Anzahl apoptotischer Zellen mittels Cell Death Detection ELISA^{PLUS} bestimmt. Die Farbintensität wurde mit dem ELISA-Reader bei λ_{405} nm gegen die Referenzwellenlänge von λ_{490} nm vermessen. Die Abbildung zeigt das Maß an CM-1- und CM-2-induzierter Apoptose nach 24 h (A) und 48 h (B). Im Vergleich zu den Negativkontrollen ist sowohl nach 24 h als auch nach 48 h ist eine deutliche Antikörper-induzierte, konzentrationsabhängige Apoptose der Tumorzelllinie zu beobachten.

3.4.5 Western-Blot Analyse

Um die Antigene, welche durch die Antikörper CM-1 und CM-2 erkannt werden, näher zu charakterisieren, wurden Western-Blot Analysen durchgeführt. Anhand der immunhistochemischen Untersuchungen zeigte sich, dass es sich bei den Antigenen um membranständige Moleküle handelt. Aus diesem Grund wurden die Membranproteine von der Kolonkarzinom-Zelllinie CACO-2 isoliert wie unter 2.4.1 beschrieben. Die Membranproteine wurden elektrophoretisch aufgetrennt und anschließend im Western-Blot auf Nitrozellulose-Membranen überführt. Die darauffolgende Immunodetektion wurde mit einer definierten Menge an CM-1- und CM-2-Kulturüberstand durchgeführt (Detektionsbedingungen siehe 2.4.6). Als Kontrolle wurde eine zweite Nitrozellulose-Membran mit der gleichen Menge eines IgM-Kontroll-Antikörpers (Chrompure human IgM) inkubiert.

Abbildung 35 zeigt die Ergebnisse der Western-Blot Analysen. Der Antikörper CM-1 (Abb. 35A) zeigt eine Bindung an Membranproteine in zwei Hauptregionen: Eine

dominante Proteinbande bei 45 kDa und zwei weitere Banden in Bereich von ungefähr 80 kDa. Der Antikörper CM-2 (Abb. 35B) bindet an Membranproteine, die im Bereich von 40-50 kDa liegen. Die durch die Antikörper detektierten Proteinbanden waren in den Kontrollen mit humanem IgM nicht zu beobachten (siehe Abb. 35).

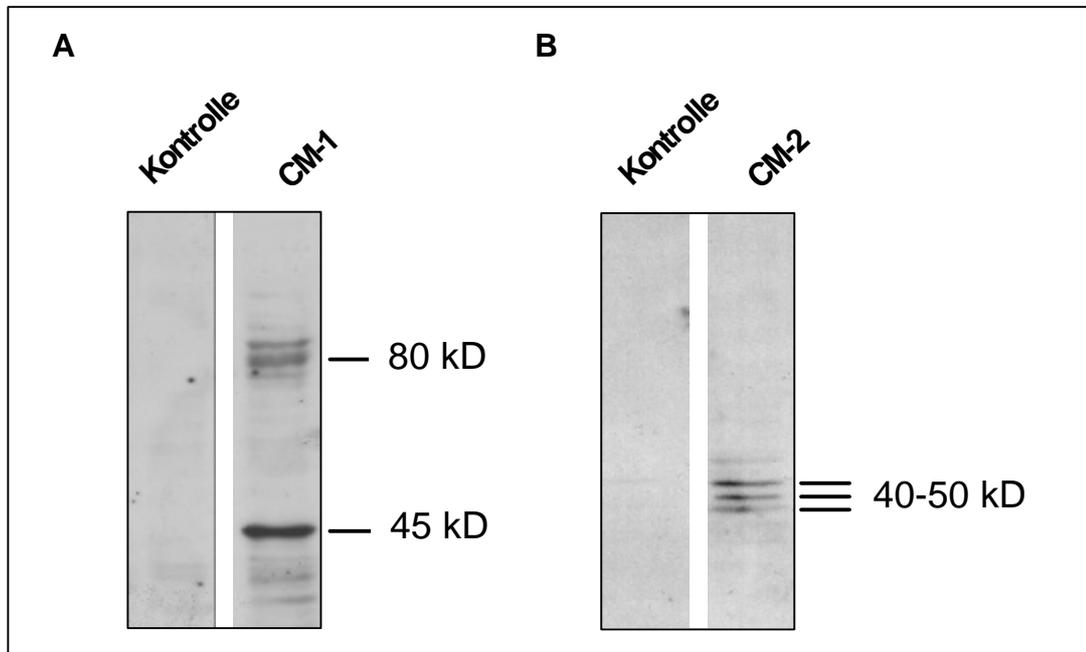


Abb. 35: Western-Blot Analysen mit den Antikörpern CM-1 (A) und CM-2 (B) auf Membranprotein-Lysaten der Kolonkarzinom-Zelllinie CACO-2. Membranproteine von CACO-2 Zellen wurden extrahiert, in einer 10% SDS-PAGE aufgetrennt und auf eine Nitrozellulose-Membran geblottet. Die Detektion der Proteinbanden erfolgte nach Inkubation mit CM-1, CM-2 und humanem Chompure IgM als Primär-Antikörper und einem Peroxidasegekoppelten Maus anti-human IgM-Antikörper als Sekundär-Antikörper. Die Darstellung erfolgte nach einer Chemilumineszenz-Reaktion durch die Belichtung eines Röntgenfilms.

3.4.7 Einfluss der Proteinglykosylierung auf die Bindung der Antikörper CM-1 und CM-2

Analog dem Vorgehen bei den anderen beschriebenen Antikörpern wurde auch für die Antikörper CM-1 und CM-2 der Einfluss eines Glykosidase-Verdaus auf das Bindungsverhalten der Antikörper untersucht. Hierzu wurden Zytospinpräparate einer Kolonkarzinom-Zelllinie angefertigt und für 3 h mit O- und N- Glykosidasen behandelt. Anschließend wurden die Zytospins entweder mit dem Antikörper CM-1 oder mit dem Antikörper CM-2 und entsprechenden Kontrollen immunhistochemisch gefärbt.

Abbildung 36 zeigt die Ergebnisse des Glykosidase-Verdaus. Dargestellt ist die Färbung

von CACO-2-Zellen mit einer Positivkontrolle (CAM-Keratin) vor und nach Behandlung mit N-Glykosidase (Abb. 36A und B). In Abbildung 36C und D sind die Auswirkungen der N-Glykosidase-Inkubation auf die Bindung des Antikörpers CM-1 an die Kolonkarzinomzellen dargestellt. Es konnte hierbei beobachtet werden, dass die Inkubation eine Reduktion der Bindung des Antikörpers CM-1 hervorrief. Auch bei der Bindung des Antikörpers CM-1 an sein Epitop scheint demnach ein N-gebundener Zucker eine Rolle zu spielen.

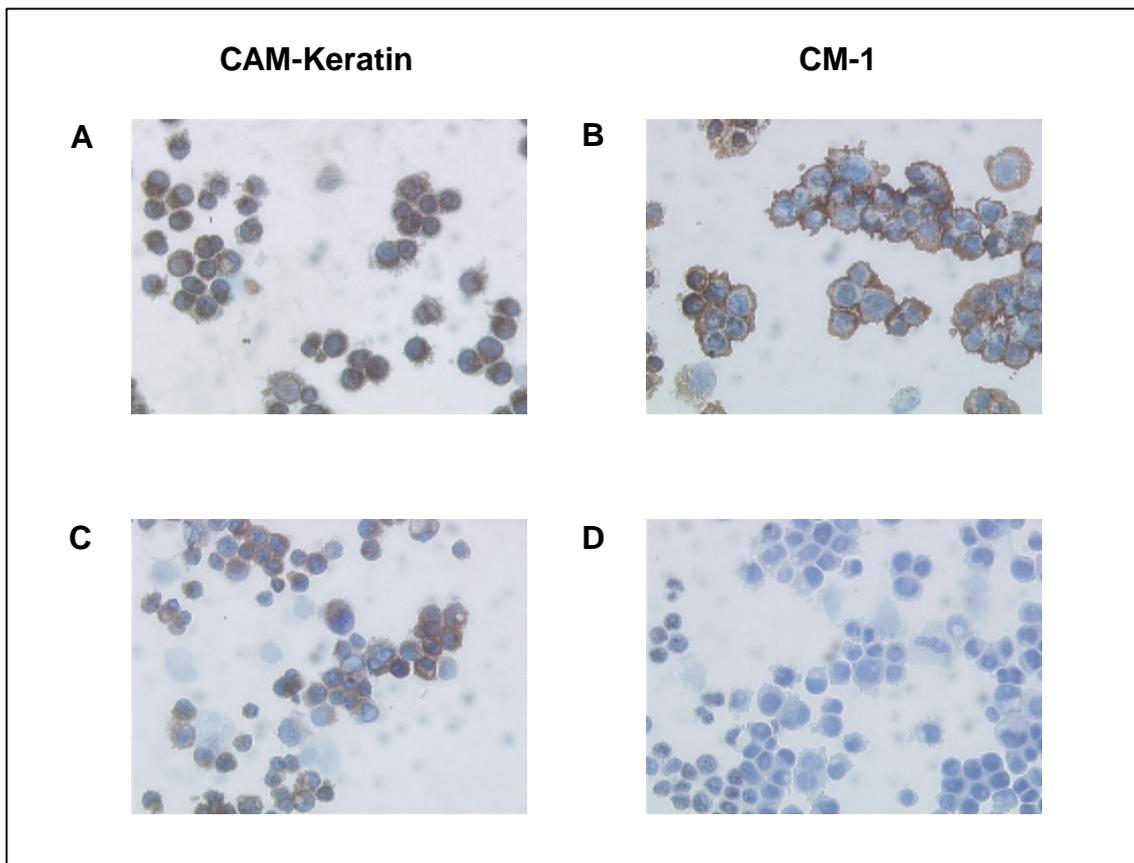


Abb. 36: Einfluss des Glykosidase-Verdau auf die Antikörper-Bindung von CM-1 auf der Zelloberfläche der Zelllinie CACO-2. Die Zellen wurden nach Ablösen mit Trypsin/EDTA in Kulturmedium aufgenommen und für 60 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurden Zytospins präpariert, an der Luft getrocknet und mit Azeton fixiert. Danach wurden die Zellen mit 2 U/ml N-Glykosidase inkubiert (3 h, 37°C) (C und D) bzw. Kontrollen ohne Enzym (A und B) mitgeführt. Nach der Inkubationszeit wurden die Zytospins immunhistochemisch mit der Positivkontrolle CAM-Keratin (A, C) und CM-1 (B und D) gefärbt.

Mit dem Antikörper CM-2 war es nicht möglich eine Aussage über die Beteiligung von Zuckern an der Rezeptor-Bindung zu treffen. Sowohl die durchgeführten Deglykosylierungs-Studien auf Zytospins als auch auf Membranextrakten und anschließender Western-Blot Analyse zeigten keine eindeutig interpretierbaren Ergebnisse.

3.5 Isolierung von tumorspezifischen Antikörpern aus Milz-Lymphozyten gesunder Probanden

3.5.1 Ergebnisse der durchgeführten Fusionen

Bei den durch somatische Hybridisierung von Lymphozyten an Krebs erkrankter Patienten im Rahmen dieser Arbeit isolierten tumorspezifischen Antikörpern handelte es sich ausschließlich um IgM-Antikörper. Sequenzanalysen zeigten, dass es sich bei den humanen monoklonalen Antikörpern um nicht oder wenig mutierte Moleküle handelt, die keiner Affinitätsreifung durch Antigenkontakt unterlagen. Die Antikörper können somit zur natürlichen/innaten Immunität des Menschen gezählt werden. Aus diesem Grund sollte die Untersuchung des B-Zell-Repertoires von gesunden Menschen Auskunft über die natürliche Existenz tumorspezifischer Antikörper geben.

Voraussetzung für diese Untersuchung ist die Existenz einer Lymphozytenquelle von gesunden Menschen, was sich als problematisch herausstellte. Trotzdem ist es gelungen Milzgewebe von zwei Patienten zu erhalten, denen die Milz bei einer Operation entnommen wurde. Die Patienten waren nicht an einem Tumorleiden erkrankt.

Um die angeborene humorale Immunität gegen maligne Zellen genauer zu analysieren wurden die Milzzellen der gesunden Probanden durch Fusion mit dem Heteromyelom HAB-1 immortalisiert.

Durchschnittlich wurden ungefähr 6×10^7 Lymphozyten pro Fusion verwendet. Tabelle 21 zeigt die Anzahl der durchgeführten Fusionen, die Fusions-Effizienz sowie die Gesamtzahl der gewachsenen Klone. Die Fusions-Effizienz lag im Durchschnitt bei 66% .

Die Zellkultur-Überstände aller gewachsenen Hybridoma-Klone wurden zuerst in einem ELISA getestet, durch welchen zum einen gezeigt wurde, wie viele der Klone Immunglobuline sezernieren. Zum anderen wurde gleichzeitig der Immunglobulin-Isotyp der Antikörper bestimmt. Tabelle 21 zeigt, wie viele der gewachsenen Klone Immunglobuline sezernierten. Zusammenfassend bleibt die Beobachtung, dass durchschnittlich zwischen 25 und 40% der gewachsenen Klone Immunglobuline produzierten. Bei den Fusionen mit Lymphozyten des Patienten 1 wuchsen insgesamt 87 Klone heran, von denen 34 Immunglobuline produzierten. Die Antikörper von vier Klonen erwiesen sich in den nachfolgenden Tests als tumorreaktiv. Bei den Fusionen mit

Milzlymphozyten von Patient 2 wuchsen 91 Klone, 27 produzierten Immunglobuline. Insgesamt konnten bisher 5 tumorreaktive Antikörper isoliert werden.

Tab. 21: Ergebnisse der mittels der humanen Hybridoma Technologie durchgeführten Fusionen mit Milzzellen gesunder Probanden

Patient (Nr.)	Geschlecht/ Alter	Anzahl an Fusionen	Fusions-Effizienz [%]	Gewachsene Klone	ELISA positive Klone	Tumor-reaktive Antikörper
1	W/ 50	2	60	87	34	4
2	M/ 14	2	70	91	27	5

Bei näherer Betrachtung der Immunglobulin-Isotypen der isolierten Antikörper war auch bei Fusionen mit Lymphozyten gesunder Probanden auffällig, dass die überwiegende Mehrheit der tumorreaktiven Antikörper vom IgM-Isotyp waren (Tab. 22). Durch weitere Selektion wurden schließlich nur solche Antikörper herausgefiltert, welche ausschließlich mit Tumorzellen reagierten, nicht aber mit gesunden Zellen. Wie aus Tabelle 22 ersichtlich waren ausnahmslos alle isolierten tumorreaktiven und gleichzeitig tumorspezifischen Antikörper IgMs.

Tab. 22: Übersicht über die Immunglobulintypen der mit Hilfe der humanen Hybridoma Technologie isolierten Antikörper aus gesunden Probanden

Patient (Nr.)	ELISA-positive Antikörper			Tumorreaktive Antikörper			Tumorspezifische Antikörper		
	IgM	IgG	IgA	IgM	IgG	IgA	IgM	IgG	IgA
1	15	5	14	5	-	1	4	-	-
2	25	1	1	5	-	-	5	-	-

3.5.2 Ursprung der Antikörper N-1 und N-2

Die Antikörper wurden aus zwei Patienten isoliert, die nicht an einer Tumorerkrankung litten, deren Milzen aber aus anderen Gründen bei der Operation entfernt wurden. Bei Patient1 (weiblich, 50 Jahre) wurde nach Verdacht auf ein Pankreaskarzinom eine

Operation mit Splenektomie durchgeführt. Das Operationsmaterial zeigte jedoch keine malignen Veränderungen, sodass sich der anfängliche Verdacht als unbegründet erwies. Bei Patient 2 (männlich, 14 Jahre) zeigte sich in Voruntersuchungen eine Zyste im Bereich der Milz. Aufgrund dieses Befundes wurde die Milz vorsorglich entfernt. Es handelte sich hierbei um eine gutartige epitheliale Veränderung im Bereich der Milz, die keinerlei Anhaltspunkt auf Malignität ergab. In Tabelle 23 sind die Fusionsbedingungen, welche zur Generierung der Antikörper N-1 und N-2 führten, dargestellt.

Tab. 23: Fusionsbedingungen und Effizienz der N-1 und N-2 Fusion

Antikörper	N-1	N-2
Anzahl verwendeter Lymphozyten	$1,0 \times 10^8$	$4,3 \times 10^7$
Anzahl verwendeter HAB-1 Zellen	$4,0 \times 10^7$	$1,7 \times 10^7$
Menge an verwendetem PEG	1 ml	0,6 ml
Fusionseffizienz	60%	67%
ELISA-positive Hybridoma-Überstände	39%	25%

Im Falle der N-1 Fusion wuchsen von 144 zur Verfügung stehenden wells in insgesamt 87 wells Klone heran. Das entspricht einer Fusionseffizienz von 60%. Von diesen Klonen waren 39% im nachfolgenden ELISA-positiv und produzierten somit Immunglobuline. Bei der Anzahl an Immunglobulin-Isotypen entfielen 44% auf IgM, 14% auf IgG und 42% auf den IgA-Isotyp. Bei der immunhistochemischen Färbung auf autologem Tumorgewebe zeigten drei IgM-Antikörper eine vergleichbare positive Reaktion mit Tumorzellen. Der Antikörper N-1 wurde beispielhaft für die weitere Testung herangezogen.

Bei der N-2 Fusion wuchsen von 60 vorhandenen wells in insgesamt 40 wells Klone heran, was einer Fusionseffizienz von 67% entspricht. Von diesen Klonen waren 25% im anschließend durchgeführten ELISA-Test positiv, davon waren 100% der Immunglobuline vom IgM-Isotyp. Bei der immunhistochemischen Färbung zeigten drei IgM-Antikörper eine positive spezifische Reaktion mit Tumorzellen der getesteten Tumorgewebe. Der Antikörper N-2, welcher das beste Färbeergebnis lieferte, wurde für die weitere Testung verwendet.

3.5.3 Analyse der Tumorspezifität der Antikörper N-1 und N-2

Die Antikörper N-1 und N-2 wurden mittels Immunperoxidase-Färbungen auf Paraffinschnitten auf Kreuzreaktivität mit gesunden und maligne entarteten Geweben getestet. Abbildung 40 zeigt Beispiele der Antikörper-Färbungen auf verschiedenen Tumorgeweben. Neben den Immunperoxidase-Färbungen mit einer geeigneten Positivkontrolle, einer Negativkontrolle und den Antikörpern N-1 und N-2 ist zur histomorphologischen Begutachtung auch eine Hämatoxilin/Eosin-Färbung dargestellt.

Abbildung 37A zeigt eine deutlich positive Reaktivität des Antikörpers N-1 und der Positivkontrolle AE1/AE3 auf einem Adenokarzinom des Kolon. Auch auf Adenokarzinomen des Magens (Abb. 37B) und des Pankreas (Abb. 37C) zeigte der Antikörper N-1 eine spezifische Reaktion mit Tumorzellen. Die entsprechend verwendeten Positiv-Kontrollen waren Cytokeratin 8 (Magen) und Cytokeratin 7 (Pankreas).

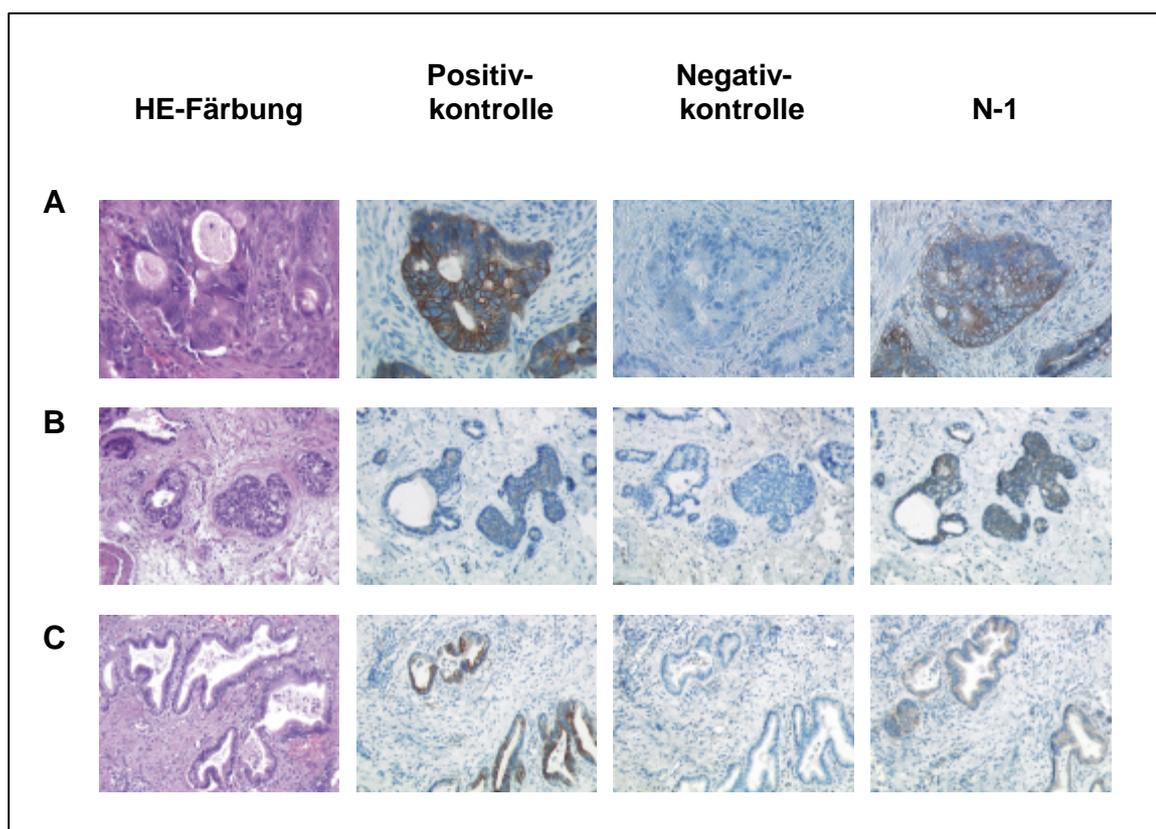


Abb. 37: Immunhistochemische Untersuchung zur Untersuchung der Tumorspezifität des Antikörpers N-1 auf verschiedenen Tumoren. Paraffinschnitte von Tumorgeweben wurden entweder nur mit Hämatoxilin/Eosin, einer dem Tumor entsprechenden Positivkontrolle, dem Sekundär-Antikörper als Negativkontrolle sowie mit Antikörper N-1 gefärbt: A, Adenokarzinom des Kolon; B, Adenokarzinom des Magens; C, Adenokarzinom des Pankreas. Original Vergrößerung x 100.

Abbildung 38 zeigt Beispiele der Reaktivität des Antikörpers N-2. Die positiven spezifischen Reaktionen des Antikörpers mit Tumorzellen sind dargestellt für ein Adenokarzinom des Magens (Abb. 38A), ein Adenokarzinom der Lunge (Abb. 38B) sowie für ein Adenokarzinom des Kolon (Abb. 38C). Die entsprechend verwendeten Positivkontrollen waren Cytokeratin 8 (Magen und Lunge) und AE1/AE3 (Kolon). Die negativ verwendeten Positivkontrollen waren Cytokeratin 8 (Magen und Lunge) und AE1/AE3 (Kolon).

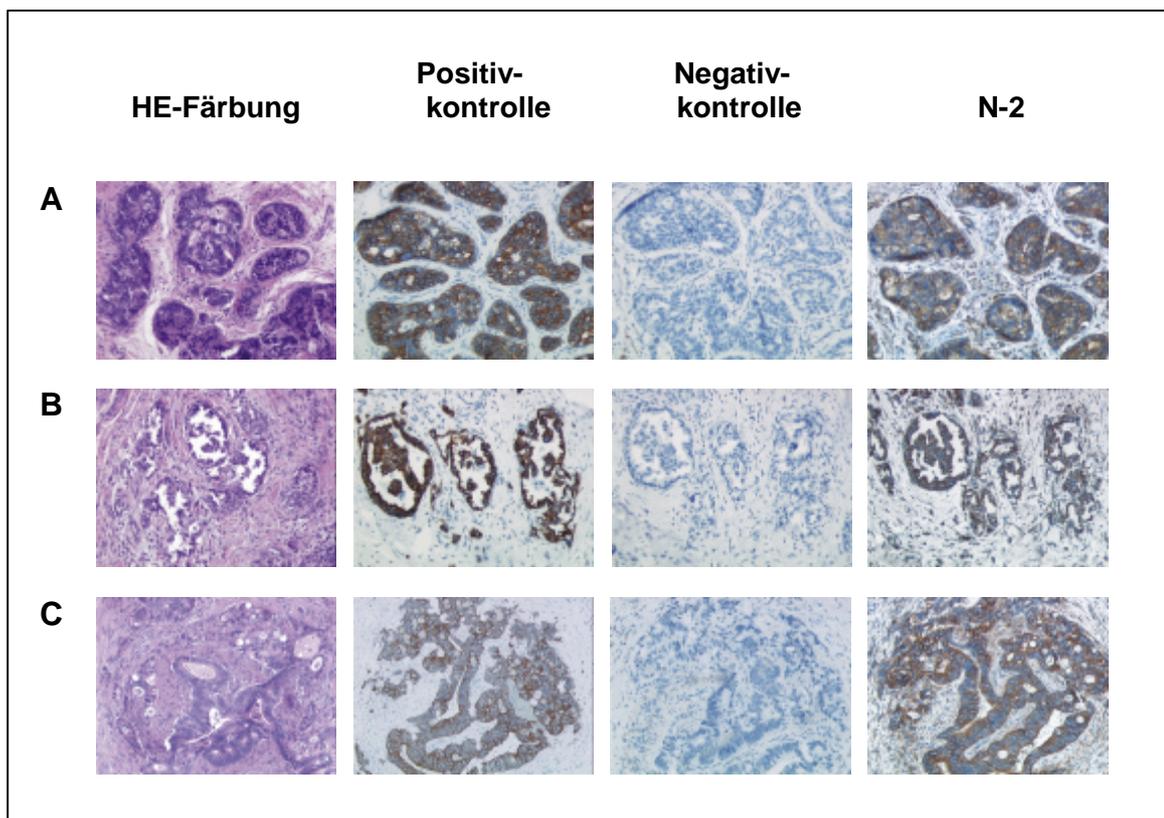


Abb. 38: Immunhistochemische Untersuchung zur Untersuchung der Tumorspezifität des Antikörpers N-2 auf verschiedenen Tumoren. Paraffinschnitte von Tumorgewebe wurden entweder nur mit Hämatoxylin/Eosin, einer dem Tumor entsprechenden Positivkontrolle, dem Sekundär-Antikörper als Negativkontrolle, sowie mit dem Antikörper N-2 gefärbt: A, Adenokarzinom des Magens; B, Adenokarzinom der Lunge; C, Adenokarzinom des Kolon. Original Vergrößerung x 100.

Die beispielhaft ausgewählten immunhistochemischen Färbungen zeigen deutlich, dass sowohl der Antikörper N-1 als auch der Antikörper N-2 spezifisch an die Tumorzellen der Gewebeschnitte binden. Das den Tumor umgebende Gewebe weist dagegen keine Reaktion auf. Auch die Negativkontrolle, bei der nur der Sekundär-Antikörper verwendet wurde, zeigt keinerlei Farbreaktionen.

Die immunhistochemischen Analysen der beiden Antikörper wurden auch auf normale Gewebe ausgeweitet um die Tumorspezifität der Antikörper zu verifizieren.

Abbildung 39 stellt die Ergebnisse der Färbungen mit dem Antikörper N-1 auf normalen Geweben dar. Zur besseren Anschaulichkeit wurden die gleichen Organe wie im Falle der Karzinome (vgl. Abb. 37) verwendet, also gesundes Kolon-, Magen- und Pankreasgewebe. Weder normales Kolongewebe (Abb. 39A) noch normales Magen- und Pankreasgewebe (Abb. 39B und C) zeigen eine Färbung mit dem Antikörper N1.

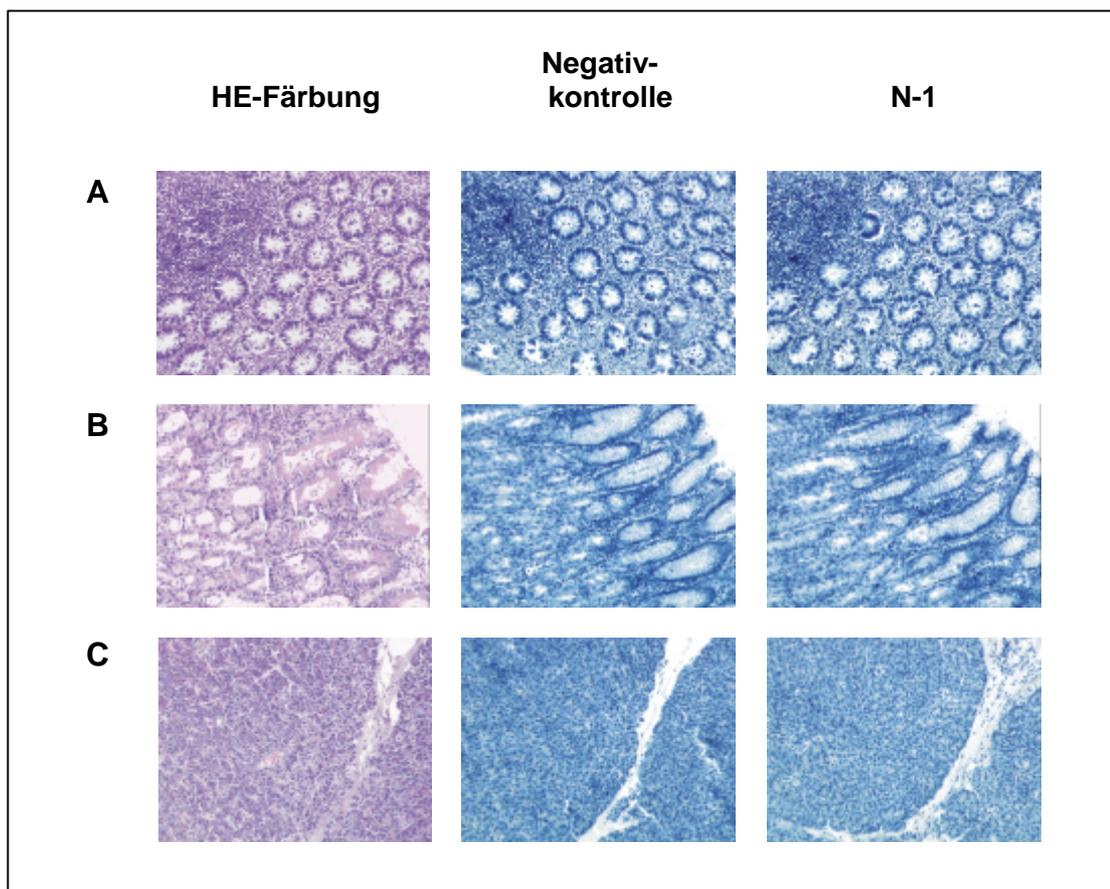


Abb. 39: Immunhistochemische Färbung mit dem Antikörper N-1 auf normalen Geweben.

Paraffinschnitte wurden mit Hämatoxylin/Eosin (HE), nur dem Sekundär-Antikörper als Negativkontrolle und dem Antikörper N-1 gefärbt: A, normales Kolongewebe; B, normales Magen- und Pankreasgewebe; C, normales Pankreasgewebe. Original Vergrößerung x100.

In Abbildung 40 sind die Ergebnisse der Färbungen mit dem Antikörper N-2 auf normalen Geweben dargestellt. Auch hier wurden aus Gründen der besseren Vergleichbarkeit die gleichen Organe wie im Falle der zuvor gezeigten Karzinome (vgl. Abb. 38) verwendet. In diesem Falle handelte es sich um gesundes Magen-, Lungen und Kolongewebe. Auch der

Antikörper N-2 zeigt keine Reaktion mit den getesteten gesunden Geweben wie in Abbildung 40A (Magen), 40B (Lunge) und 40C (Kolon) ersichtlich.

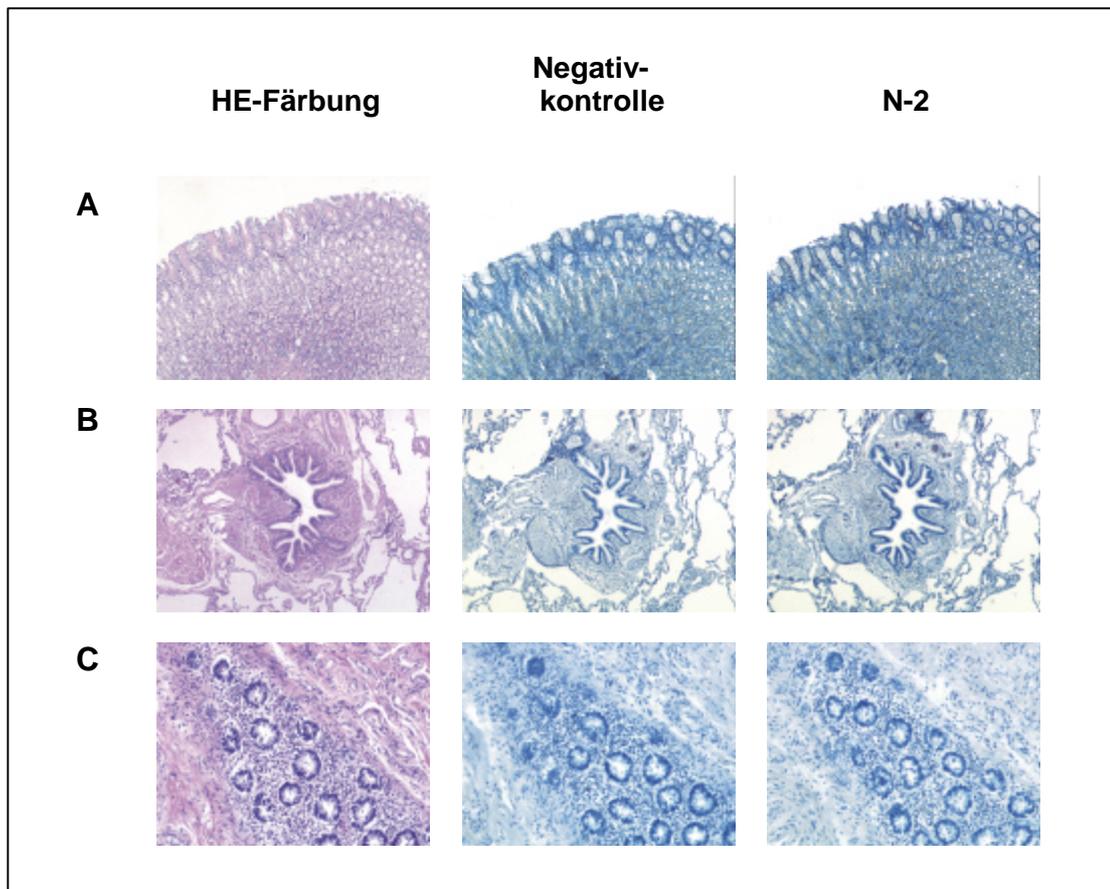


Abb. 40: Immunhistochemische Färbung mit dem Antikörper N-2 auf normalen Geweben. Paraffinschnitte wurden mit Hämatoxylin/Eosin (HE), nur dem Sekundär-Antikörper als Negativkontrolle und dem Antikörper N-2 gefärbt: A, normales Magengewebe; B, normales Bronchialgewebe; C, normales Kolongewebe. Original Vergrößerung x100.

3.5.4 Genetische Analyse der variablen Region der schweren und leichten Immunglobulin-Kette des Antikörpers N-1

Um genauerer Einblicke in den genetischen Hintergrund der tumorspezifischen Antikörper aus gesunden Probanden zu erhalten wurden exemplarisch die VH-Regionen der schweren und leichten Immunglobulin-Kette des Antikörpers N-1 sequenziert. Hierbei wurden die VH- und VL-Regionen mit spezifischen Primern in getrennten Ansätzen durch PCR amplifiziert. Nach elektrophoretischer Auftrennung der PCR-Ansätze im Agarose-Gel konnte die VH-Familie bzw. die VL-Familie der verwendeten Gene bestimmt werden. Bei

dem Antikörper N1 handelt es sich hierbei um ein Gen aus der VH3-Familie. Zur weiteren Untersuchung wurden die PCR-Fragmente aus dem Gel eluiert und separat in einen pCR-Script-Vektor kloniert. Die klonierten PCR-Fragmente wurden von beiden Seiten mit T₃- und T₇-Primern sequenziert. Für die erhaltenen Sequenzen konnten mit Hilfe der DNAPLOT/ IMGT Datenbank die homologen Keimbahn-Gene identifiziert und die Anzahl der Mutationen bestimmt werden.

Hierbei zeigte sich, dass die Sequenz der variablen Region der schweren Immunglobulinkette des Antikörpers N-1 von einem Gen aus der VH-3-Familie determiniert wird. Es zeigte sich eine Homologie zu dem Keimbahn-Gen IGHV3-23*01 (DP-47). Das zugehörige D-Segment entspricht der Keimbahn-Sequenz IGHD3-22*01. Die Sequenz des J-Segmentes ist homolog zu IGHJ6*03.

Die untersuchte VH-Region weist keinerlei Mutation gegenüber der Sequenz des Keimbahn-Gens auf und ist dieser somit zu 100% homolog.

Abbildung 41 zeigt den Sequenzvergleich der VH-Region von N-1 mit seinem homologen Keimbahn-Gen DP-47.

	CDR 1														
N-1	GGG	TCC	CTG	AGA	CTC	TCC	TGT	GCA	GCC	TCT	GGA	TTC	ACC	TTT	AGC
	G	S	L	R	L	S	C	A	A	S	G	F	T	F	S
IGHV3-23*01	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
N-1	AGC	TAT	GCC		ATG	AGC	TGG	GTC	CGC	CAG	GCT	CCA	GGG	AAG	GGG
	S	Y	A		M	S	W	V	R	Q	A	P	G	K	G
IGHV3-23*01	---	---	---		---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
	CDR2														
N-1	CTG	GAG	TGG	GTC	TCA	GCT	ATT	AGT	GGT	AGT	GGT	GGT	AGC	ACA	
	L	E	W	V	S	A	I	S	G	S	G	G	S	T	
IGHV3-23*01	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	
N-1	TAC	TAC	GCA	GAC	TCC	GTG	AAG		GGC	CGG	TTC	ACC	ATC	TCC	AGA
	Y	Y	A	D	S	V	K		G	R	F	T	I	S	R
IGHV3-23*01	---	---	---	---	---	---	---		---	---	---	---	---	---	---
N-1	GAC	AAT	TCC	AAG	AAC	ACG	CTG	TAT	CTG	CAA	ATG	AAC	AGC	CTG	AGA
	D	N	S	K	N	T	L	Y	L	Q	M	N	S	L	R
IGHV3-23*01	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---

```

N-1          GCC GAG GAC ACG GCC GTA TAT TAC TGT GCG AAA
              A  E  D  T  A  V  Y  Y  C  A  K
IGHV3-23*01  --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- ---

```

Abb. 41: Sequenzvergleich der VH-Region des monoklonalen Antikörpers N-1 mit dem homologen Keimbahn-Gen IGHV3-23*01.

- = Keimbahn-Gen Sequenz ist identisch mit der von IGHV3-23*03. Die CDR-Regionen sind durch Balken markiert. Die Sequenz der VH-Region des Antikörpers N-1 ist zu 100% homolog zum Keimbahn-Gen IGHV3-23*01.

Die variable Region der leichten Immunglobulin-Kette des Antikörpers N-1 erwies sich als homolog zu den Keimbahn-Genen IGLV3-10*01 und IGLJ3*02.

In Abbildung 42 ist der Sequenzvergleich mit den homologen Keimbahn-Genen dargestellt. Die VL-Region des Antikörpers N-1 weist zwei Mutationen im Framework auf, wovon eine der Mutationen zu einem Austausch von Aminosäuren führt. Somit ergibt sich eine Homologie der VL-Region zu dem Keimbahn-Gen von 99%. Die CDR-Regionen weisen keine Mutationen auf.

```

N-1          TCC TAT GTG CTG ACT CAG CCA CCC TCG          GTG TCA GTG TCC CCA
              S  Y  V  L  T  Q  P  P  S          V  S  V  S  P
IGHV3-10*01  --- --- -A- --- --A --- --- --- ---          --- --- --- --- ---
              E

```

```

N-1          GGA CAA ACG GCC AGG ATC ACC TGC TCT GGA GAT GCA TTG CCA AAA
              G  Q  T  A  R  I  T  C  S  G  D  A  L  P  K
IGHV3-10*01  --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- ---

```

CDR1

```

N-1          AAA TAT          GCT TAT TGG TAC CAG CAG AAG TCA GGC CAG GCC CCT
              K  Y          A  Y  W  Y  Q  Q  K  S  G  Q  A  P
IGHV3-10*01  --- ---          --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- ---

```

```

N-1          GTG CTG GTC ATC TAT GAG GAC AGC          AAA CGA CCC TCC GGG ATC
              V  L  V  I  Y  E  D  S          K  R  P  S  G  I
IGHV3-10*01  --- --- --- --- --- --- --- ---          --- --- --- --- --- ---

```

CDR2

```

N-1          CCT          GAG AGA TTC TCT GGC TCC AGC          TCA GGG ACA ATG GCC
              P          E  R  F  S  G  S  S          S  G  T  M  A
IGHV3-10*01  ---          --- --- --- --- --- ---          --- --- --- --- ---

```

```

N-1          ACC TTG ACT ATC AGT GGG GCC CAG GTG GAG GAT GAA GCT GAC TAC
              T  L  T  I  S  G  A  Q  V  E  D  E  A  D  Y
IGHV3-10*01  --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- ---

```

	CDR3									
N-1	TAC	TGT	TAC	TCA	ACA	GAC	AGC	AGT	GGT	AAT
	Y	C	Y	S	T	D	S	S	G	N
IGLV3-10*01	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---

Abb. 42: Sequenzvergleich der VL-Region des monoklonalen Antikörpers N-1 mit dem homologen Keimbahn-Gen IGLV3-10*01.

- = Keimbahn-Gen Sequenz ist identisch mit der von N-1. **x**: Die Sequenz unterscheidet sich durch das angegebene Nukleotid von der Keimbahn-Sequenz; **x**: Austausch eines Nukleotides führt zum Austausch einer Aminosäure. Die CDR-Regionen sind durch Balken markiert.

Die Sequenzanalyse zeigt, dass es sich auch bei einem Antikörper, welcher aus gesunden Probanden isoliert werden konnte, um einen natürlichen IgM-Antikörper handelt, welcher keiner Affinitätsreifung durch somatische Hyper-Mutation unterlag.

3.5.5 Funktionelle Analyse der Antikörper N-1 und N-2

3.5.5.1 Proliferationstest (MTT-Assay)

Mit Hilfe funktioneller zellbiologischer Tests wurde im Folgenden auch der Einfluss der Antikörper N-1 und N-2 auf das Wachstum einer Karzinomzelllinie *in vitro* charakterisiert. Zunächst wurden Tumorzellen der Magenkarzinom-Zelllinie 23132/87 in 96-Loch Platten ausgesät und mit Zellkultur-Überständen der N-1- bzw. N-2-produzierenden Hybridomzellen inkubiert. Nach 24 bzw. 48 Stunden wurde die Proliferation der Magenkarzinomzellen mit Hilfe des MTT-Assays bestimmt. Die Tests wurden zweimal unabhängig voneinander durchgeführt, jeder Ansatz lag in achtfacher Ausführung vor. Die Farbintensität wurde im ELISA-Reader bei λ_{540} nm und λ_{690} nm bestimmt. In Abbildung 43 ist der Einfluss der Antikörper N-1 (A) und N-2 (B) auf die Proliferation der Magenkarzinom-Zelllinie zusammenfassend dargestellt. Hierbei wurde die Proliferationsrate der Kontrolle, bei der die Zellen in normalem Kulturmedium wuchsen, mit 100% angegeben.

Nach 24 und 48 h zeigt sich eine Proliferations-Hemmung (Abb. 43A, B) der mit den Antikörpern N-1 bzw. N-2 inkubierten Karzinomzellen im Vergleich zur normalen Proliferationsrate. Entsprechende Mengen an verbrauchtem Kulturüberstand, welche als Kontrolle mitgeführt wurden, zeigten wiederum keinen Effekt auf die Zell-Proliferation der untersuchten Zelllinien.

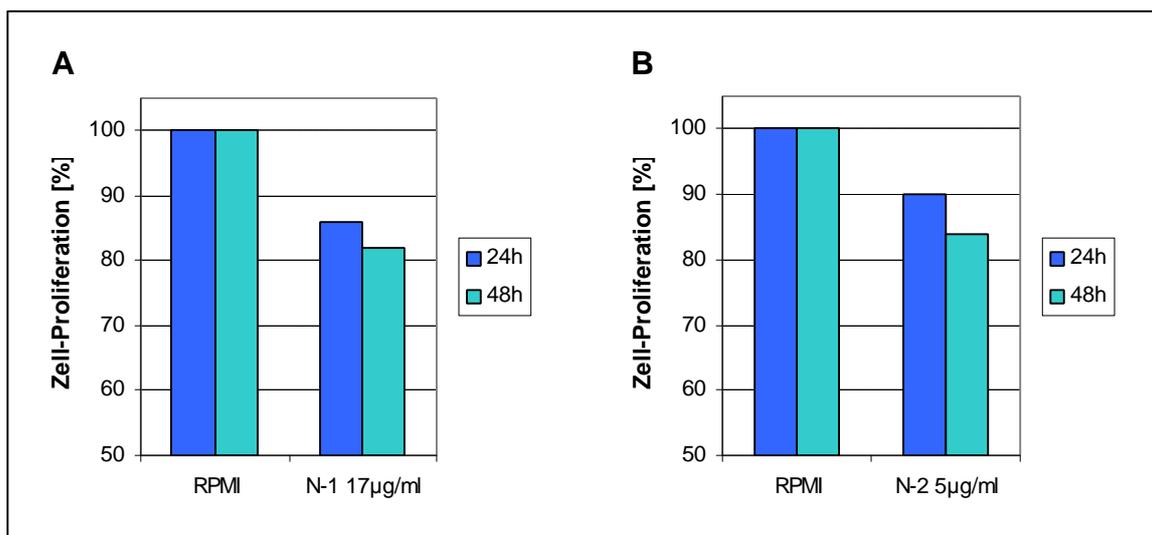


Abb. 43: Messung der Auswirkung der Antikörper N-1 und N-2 auf die Zell-Proliferation von Magenkarzinomzellen mittels MTT-Test. Die Abbildung zeigt den Effekt der Antikörper N-1 (A) und N-2 (B) auf die Proliferationsrate der Zelllinie 23132/87 nach 24 und 48 h in %. Hierbei wurde die Proliferationsrate von Zellen, die in normalem Kulturmedium wuchsen, mit 100% angegeben. Sowohl nach 24 h als auch nach 48 h ist eine N-1-bzw. N-2-Antikörper-induzierte Hemmung der Zell-Proliferation zu beobachten.

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

Die Antikörper-induzierte Proliferations-Hemmung der Magenkarzinomzellen wurde mit Hilfe eines Apoptose-Tests näher untersucht. Hierzu wurde erneut die Magenkarzinom-Zelllinie 23132/87 verwendet um eine Aussage über die eventuelle Apoptose-Induktion der Antikörper N-1 und N-2 treffen zu können.

Der Test wurde wie bereits für die anderen Antikörper beschrieben durchgeführt und die relative Anzahl apoptotischer Zellen mittels des Cell Death Detection ELISA^{PLUS} (Roche, Mannheim) nach 24 bzw. nach 48 h ermittelt. Als Negativkontrolle wurden die Zellen einerseits mit der gleichen Menge Kulturmedium und andererseits mit verbrauchtem Zellkulturüberstand, welcher jedoch keine Antikörper enthielt, versetzt. Zusätzlich wurden eine im Test-Kit enthaltene Positivkontrolle und ein Blank-Ansatz mitgeführt. Jeder Ansatz lag in doppelter Ausführung vor. Die Intensität der Antikörper-induzierten Apoptose wurde mit Hilfe eines ELISA-Readers bei λ_{405} nm gegen die Referenzwellenlänge von λ_{490} nm vermessen. Abbildung 44 zeigt die Ergebnisse der Inkubation mit den Antikörpern N-1 und N-2. Bereits nach 24 h zeigten die Antikörper im Vergleich zu

den Negativkontrollen eine ausgeprägte konzentrationsabhängige Apoptose-Induktion (A). Dieser Effekt konnte ebenfalls nach 48 Stunden beobachtet werden (B).

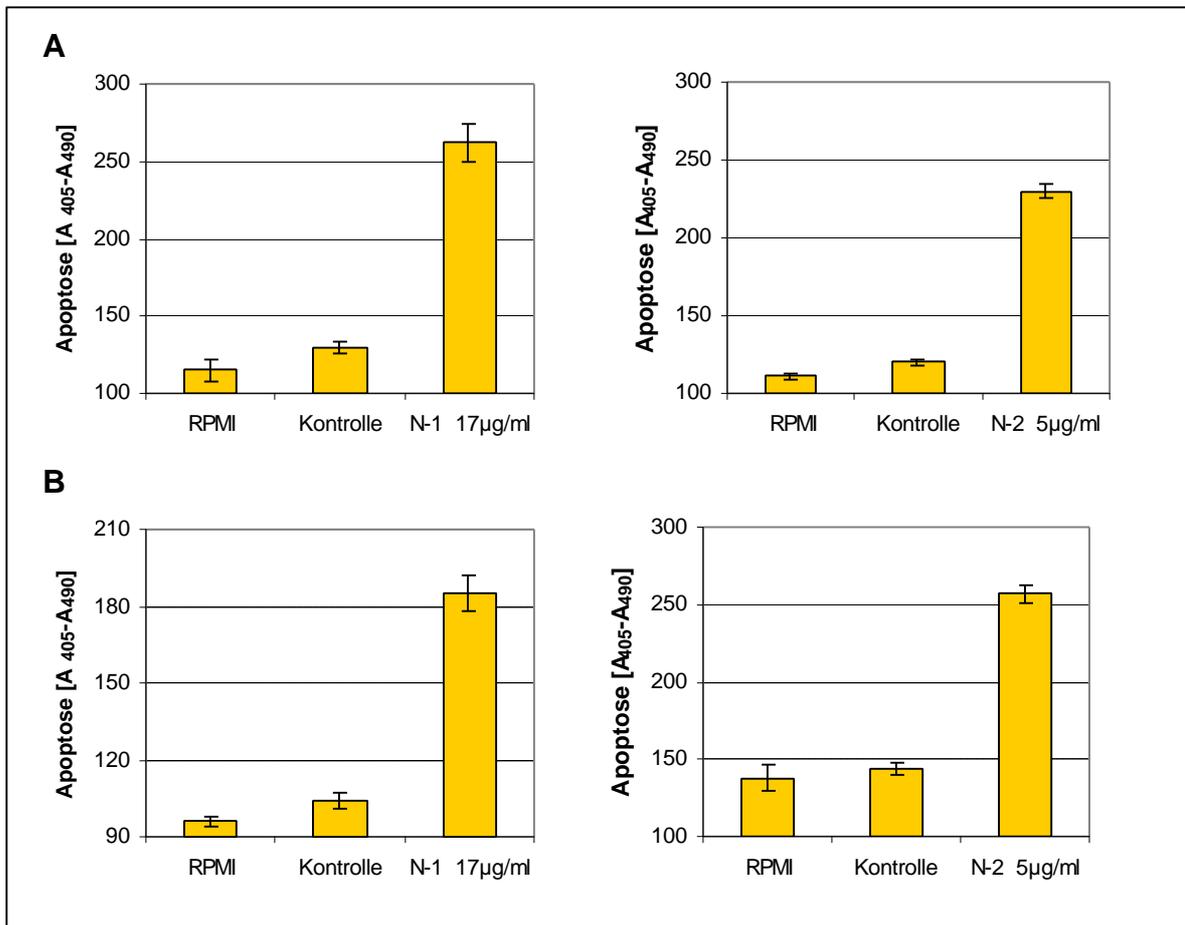


Abb. 44: Messung der Apoptose-Induktion der Antikörper N-1 und N-2 auf die Magenkarzinom-Zelllinie 23132/87 mittels Cell Death Detection ELISA^{PLUS}. Tumorzellen wurden in einer 96-Loch Platte für 24 bzw. 48 h im Brutschrank mit N-1 und N-2 Antikörper inkubiert. Anschließend wurde die relative Anzahl apoptotischer Zellen mittels Cell Death Detection ELISA^{PLUS} bestimmt. Die Farbintensität wurde mit dem ELISA-Reader bei λ_{405} nm gegen die Referenzwellenlänge von λ_{490} nm vermessen. Die Abbildung zeigt das Maß an N-1- und N-2-induzierter Apoptose nach 24 h (A) und 48 h (B). Im Vergleich zu den Negativkontrollen ist sowohl nach 24 h als auch nach 48 h ist eine deutliche Antikörper-induzierte, Apoptose der Tumorzelllinie zu beobachten.

Die aus gesunden Probanden isolierten Antikörper zeigten sowohl in ihrer Tumorspezifität und ihrem genetischen Hintergrund, als auch in ihrer Funktion vergleichbare Eigenschaften wie die zuvor beschriebenen Antikörper aus Tumorpatienten.

4 Diskussion

Jede maligne Transformation ist das Ergebnis eines mehrstufigen Prozesses. Ein multizellulärer Organismus ist unter normalen Bedingungen ein perfekt organisierter Verbund aus differenzierten Zellen und Organen. Alle zellulären Prozesse wie Proliferation, Regeneration, Reparatur etc. unterliegen einer strikten Kontrolle. Jedoch entstehen während Millionen von Zellteilungen innerhalb eines Lebens häufig natürliche und induzierte Mutationen. Diese können zu tiefgreifenden genetischen Veränderungen und in der Folge zu unkontrolliert wachsenden Zellen führen. Fast alle diese entarteten Zellen werden durch Kontrollmechanismen erkannt und entfernt. In einigen seltenen Fällen können diese Zellen jedoch der Kontrolle entkommen, sich im weiteren Verlauf zu Tumoren entwickeln und damit letztlich zur Schädigung oder gar zum Tod des Organismus führen.

Die Entstehung maligner Zellen durch irreversible genetische Veränderungen ist demnach sozusagen ein „chronischer“ Prozess. Allein die spontane Mutationsrate reicht aus um in einem Organismus permanent transformierte Zellen entstehen zu lassen, die den Körper in kürzester Zeit überschwemmen würden. Auch wenn bestimmte genetische Schäden frühzeitig durch Reparaturmechanismen beseitigt werden und sich nicht jede transformierte Zelle in einem Tumor manifestiert, so ist die eigentliche Frage, die bereits J.D. Watson formulierte, nicht, warum Krebs entsteht, sondern warum er bei der hohen Mutationsrate so selten auftritt („The major question is not why cancer occurs, but why it occurs so infrequently“)(Watson in Alberts 1994).

Hauptverantwortlich für eine frühe Erkennung und Beseitigung aberranter Zellen sind Moleküle und Zellen der Immunabwehr. Jeder Organismus verfügt über ein Immunsystem, das für die Erkennung und Beseitigung infektiöser Partikel und spontan transformierter Zellen verantwortlich ist. Vertebraten besitzen neben der primären, angeborenen Immunität zusätzlich eine erworbene, sekundäre Immunität, die durch Reifung und Mutation eine höhere Variabilität der Rezeptoren gegen fremde Strukturen erreichen kann (Du Pasquier, 2001; Rinkevich, 1999; Williams, 2001). Grundsätzlich stellt sich deshalb hier die Frage, welche Funktion die beiden Systeme in der Erkennung und Abwehr fremder Partikel und aberranter Zellen haben. Müssen Fremdantigene erst eine Reifung und Entstehung immunkompetenter Zellen induzieren oder ist das Repertoire der natürlichen, angeborenen Immunität ausreichend für eine spezifische Immunantwort und Abwehr?

Die primäre Erkennung und Beseitigung infektiöser Partikel erfolgt bei Säugetieren über die angeborene Immunität (Amakata et al., 2001; Berczi et al., 2000; Moretta et al., 2002a; Soloski, 2001). Hier sind hauptsächlich Natürliche Killerzellen (NK) auf zellulärer und B1 (CD5+)-B-Zellen und natürliche Antikörper auf humoraler Ebene, deren Reaktion noch vor einiger Zeit als unspezifisch abgetan und als „Background“ von vermeintlich spezifischer Reaktion abgezogen wurde, für die Primärreaktion und die Induktion einer sekundären Immunität verantwortlich (Boes, 2000a; Casali and Notkins, 1989; Fearon and Locksley, 1996; Hardy and Hayakawa, 1994; Janeway and Medzhitov, 2002; Medzhitov, 2001; Medzhitov and Janeway, 1997).

Hinsichtlich der spezifischen Erkennung und Beseitigung spontan transformierter Zellen sind die zellulären, molekularen und genetischen Mechanismen allerdings weiterhin relativ unklar (Bohn, 1999; Medzhitov, 2001).

Die konventionelle Hybridoma Technologie ermöglicht es Einblicke in die Mechanismen der humoralen Immunität gegen maligne Zellen zu gewinnen. Anhand des vorgestellten Vorgehens ist es im Rahmen dieser Arbeit gelungen eine Reihe neuer humaner monoklonaler IgM-Antikörper zu generieren sowie deren Reaktivität, ihren genetischen Ursprung und ihre funktionelle Aktivität näher zu charakterisieren.

4.1 Antikörper PAM-1

Der humane IgM-Antikörper PAM-1 (Klon 103/51), welcher mittels humaner Hybridoma Technologie aus einem Patienten mit einem Magenkarzinom isoliert werden konnte, wurde hinsichtlich seiner Reaktivität auf normalen Geweben, Präkanzerosen und Tumoren in dieser Arbeit umfassend untersucht (Brändlein et al., 2003). Bekannt war bereits, dass der Antikörper an eine Carbohydratstruktur einer modifizierte Form des CFR-1 Rezeptors (Cysteine rich fibroblast growth factor receptor 1) bindet, welcher auf einigen epithelialen Tumoren exprimiert wird, nicht jedoch auf den bis dahin untersuchten normalen Geweben (Hensel 2001a).

Zu den Tumoren, die durch den Antikörper PAM-1 spezifisch erkannt werden, gehören die weltweit häufigsten Karzinome wie das Adenokarzinom des Kolons, der Brust, der Lunge, des Magens und der Prostata. Aber auch Karzinome der Bauchspeicheldrüse, der Speiseröhre, des Gebärmutterhalses, der Eierstöcke sowie der Leber werden erkannt. Zudem exprimieren Plattenepithelkarzinome der Lunge, des Ösophagus und des

Gebärmutterhalses den CFR-1/PAM-1 Rezeptor (Hensel et al., 2001a; Hensel et al., 1999b; Vollmers et al., 1994; Brändlein et al., 2003). Die in dieser Arbeit vorgestellten immunhistochemischen Untersuchungen der CFR-1/PAM-1 Rezeptor Expression auf verschiedenen epithelialen Tumoren zeigen deutlich das überaus breite Reaktionsspektrum des Antikörpers auf den untersuchten Tumoren. Die Färbungen zeigen des weiteren, dass PAM-1 hochspezifisch an Tumorzellen bindet. Die mit PAM-1 gefärbten Gewebeschnitte weisen darüber hinaus eine intensive und homogene Färbung der Tumorzellen auf.

Die Ergebnisse der semiquantitativen RT-PCR zeigen eine deutlich verringerte Expression von CFR-1 mRNA in normalem Magengewebe verglichen mit der Expression in Tumorgewebe. Dieser Befund zeigt, dass der durch den Antikörper PAM-1 definierte CFR-1 Rezeptor in maligne entartetem Magengewebe überexprimiert wird. Dennoch zeigt in der semiquantitativen RT-PCR auch normales Magengewebe eine basale Expression des CFR-1 Rezeptors. Da durch immunhistochemische Analysen zweifelsfrei gezeigt werden konnte, dass der Antikörper PAM-1 ausschließlich mit maligne veränderten Zellen reagiert und nicht mit normalen Zellen, liegt die Vermutung nahe, dass es sich bei dem CFR-1/PAM-1 Rezeptor um eine post-transkriptionelle Modifikation von CFR-1 handelt, welche nur auf entarteten Zellen vorkommt.

Regenerative, hyperplastische und dysplastische Proliferationen stellen den idealen Ausgangspunkt für maligne Neoplasien dar. Es gibt beispielsweise einige gut untersuchte Zusammenhänge zwischen zervikaler intraepithelialer Neoplasie I-III (CIN I-III) und dem Zervixkarzinom (Arends et al., 1998). Ebenso sind die Plattenepithel-Metaplasie und –Dysplasie des Bronchus bei Rauchern als Vorläuferstadium für das Bronchialkarzinom bekannt (Colby et al., 1998; Franklin, 2000). Auch das Barrettkarzinom entsteht häufig auf dem Boden einer Vorstufe, der sog. Barrett-Metaplasie oder –Dysplasie (Haggitt, 1994; Spechler, 1996). Über den multifaktoriellen und vielstufigen Prozess der Magenkarzinomentwicklung auf molekularer Ebene ist dagegen wenig bekannt (Correa, 1992). Es gilt jedoch als gesichert, dass an der Initiation der Karzinogenese sehr salzhaltige Speisen, Alkohol, Nitrosamine und *H. pylori* -Infektion beteiligt sind. Neben der *H. pylori*-assoziierten Gastritis zählen auch die chronisch atrophische Gastritis sowie die intestinale Metaplasie und Dysplasie zu den Präkanzerosen des Magenkarzinoms.

Auch benigne Neoplasien, primär gutartige epitheliale Veränderungen, werden zum Teil zu den Präkanzerosen gezählt, zum Beispiel die tubulären und villösen Adenome des Kolons. Das Risiko für Kolonkarzinome kann abhängig von der Größe bis zu 50% betragen. Daher

wird die Adenom-Karzinom-Sequenz als wahrscheinlichste Pathogenese postuliert (Cummings, 2000; Scheiden et al., 2000; Wehrmann and Fruhmorgen, 2000).

Im Rahmen der Tumorprävention spielt nicht nur die Identifizierung von Risikofaktoren und deren Beseitigung eine Rolle, sondern auch die Früherkennung von Vorläuferstadien und Präkanzerosen. Viele solide maligne Tumoren können erfolgreich therapiert werden, wenn sie früh erkannt werden. Die Entdeckung dieser präkanzerösen Zellen basiert in der Hauptsache auf mikroskopischen Analysen von Gewebebiopsien und Abstrichen. Diese morphologische Diagnose, die Differenzierung zwischen gesundem und malignem Gewebe, gestaltet sich oft schwierig, da die zellulären Veränderungen oft minimal sind. Die histologischen Diagnosen werden zudem durch die Subjektivität des Untersuchers beeinflusst und dadurch erschwert, dass keine einheitlichen Diagnosekriterien als Goldstandard vorhanden sind (Plummer et al., 1997). Aus diesem Grund werden zusätzliche immunhistochemische Methoden zur Erkennung von zellulären Veränderungen herangezogen, zum Beispiel der Gebrauch von Proliferationsmarkern. Die meisten Proliferationsmarker wie beispielsweise Ki67 differenzieren jedoch weder zwischen gesunden und malignen Zellen noch reagieren sie zuverlässig mit allen Tumorzellen (Brown and Gatter, 2002; Scholzen and Gerdes, 2000; van Diest et al., 1998).

Das Grading dysplastischer Veränderungen beruht auf der Begutachtung von morphologischen und zytologischen Veränderung der Zelle, wie beispielsweise strukturellen Atypien, Variation in Größe und Form der Zelle und des Kerns, z.B. Hyperchromasie und atypische Mitosen. Als besonders schwierig gilt die Unterscheidung zwischen low grade Dysplasien und regenerativer Mukosa und akut entzündlichen Epithelschäden (Plummer et al., 1997; Riethdorf et al., 1999; Spechler, 2001; Wong et al., 2000). Es werden verschiedene biologische Marker verwendet um die Diagnose zu sichern und die Prognose abzuschätzen wie beispielsweise der Proliferationsmarker Ki67. Dieser Marker, der auch in Teilen dieser Arbeit als Kontrolle verwendet wurde (siehe 3.1.3), differenziert jedoch nicht zwischen gesundem und malignem Gewebe. Außerdem scheinen zusätzliche verwendete Proliferationsmarker wie PCNA (proliferating cell nuclear antigen) auch in nicht proliferierenden Zellen hochreguliert zu sein, was zu widersprüchlichen Ergebnissen führen kann (van Diest et al., 1998; van Oijen et al., 1998). PCNA ist ein sehr stark konserviertes 36 kDa großes Kernprotein, welches essenziell für DNA- Replikation, -Reparatur, Postreplikationsverarbeitung und Apoptose ist. Das sliding clamp Protein PCNA wurde nicht nur in zahlreichen Tumoren, sondern auch in proliferierenden Zellen

von Normalgewebe nachgewiesen (Dworakowska et al., 2002; Paunesku et al., 2001; Warbrick, 2000).

Die Wichtigkeit der Tumorfrüherkennung für den weiteren Verlauf der Erkrankung macht den Einsatz hochspezifischer neuer Diagnosemarker unabdingbar. CFR-1/PAM-1 ist durch sein bisheriges Verteilungsmuster ein solcher potentieller Marker für entartete Zellen. Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten immunhistochemische Studien verschiedener Präkanzerosen zeigten eine positive Reaktion von PAM-1 auf Präkanzerosen des Magens (*H. pylori*-assoziierte Gastritis, intestinale Metaplasie, high grade Dysplasie), des Barrett-Ösophagus (Barrett-Metaplasie und Barrett-Dysplasie), der Zervix (CIN I-III) und des Bronchus (Plattenepithel-Metaplasie und -Dysplasie). Untersucht wurden auch die als Vorstufen klassifizierten tubulären und villösen Adenome des Kolons sowie die Colitis-ulcerosa-assoziierte Dysplasie. PAM-1 bindet auch im Falle dieser Präkanzerosen spezifisch an die atypischen, entarteten Zellen. Gesunde Zellen dagegen werden nicht erkannt (Brändlein et al., 2003).

Die Reaktivität des PAM-1 Antikörpers wurde mit der Expression des Ki67 Proteins verglichen, welches einer der meist verwendeten Standardmarker ist (Scholzen and Gerdes, 2000, Brown and Gatter, 2002). Die Funktion dieses Proteins, welches im Nukleolus proliferierender Zellen lokalisiert ist, bleibt bis jetzt relativ unbekannt (Endl and Gerdes, 2000). Während der PAM-1 Antikörper eine intensive Färbung auf allen untersuchten Präkanzerosen zeigt, färbt der Ki67 Antikörper nur mit einer schwachen Reaktion die entarteten proliferierenden Zellen an. Im Allgemeinen lässt sich ein klarer Unterschied in der Qualität und Quantität der Ki67 Expression verglichen mit CFR-1/PAM-1 beobachten. In fast allen Karzinomen und Präkanzerosen, die getestet wurden, zeigt CFR-1 eine homogene Expression auf zytologisch veränderten Zellen und einen Anstieg der Intensität mit dem Grad der Malignität. Im Gegensatz zu CFR-1/PAM-1 ist Ki67 sowohl auf gesundem als auch auf malignem proliferierendem Gewebe exprimiert. Außerdem zeigen nicht alle getesteten Präkanzerosen eine positive Ki67 Reaktivität, zudem wurde oft eine nicht konstante und inhomogene Expression beobachtet (Brändlein et al., 2003). Zusammenfassend zeigte sich der CFR-1/PAM-1 Rezeptor bei der Erkennung neoplastischer zellulärer Veränderungen dem Standardmarker Ki67 überlegen. PAM-1 wird zukünftig wohl vor allem auf dem Gebiet der Diagnostik und Früherkennung im Rahmen der Krebsprävention eine bedeutende Rolle spielen. Ein Antikörper, der spezifisch an entartete Zellen, nicht aber an normale Zellen bindet, wird auch für therapeutische Anwendungen von großem Interesse sein.

Der Antikörper PAM-1 ist zusammen mit dem in der Einleitung beschriebenen Antikörper SC-1 ein hervorragendes Beispiel für diagnostisch und therapeutisch wertvolle humane monoklonale Antikörper, welche direkt aus Krebspatienten gewonnen werden konnten. Diese Ergebnisse bildeten die Grundlage für die Isolierung weiterer vielversprechender humaner monoklonaler IgM-Antikörper mittels der humanen Hybridoma Technologie im Rahmen dieser Arbeit.

4.2 Antikörper LM-1, PM-1, PM-2, CM-1 und CM-2

Analog dem Vorgehen der Generierung der SC-1 und PAM-1 produzierenden permanenten Zelllinien konnte ein IgM-Antikörper (LM-1) aus einem Patienten isoliert werden, der an einem Lungenkarzinom erkrankt war. Zudem gelang es zwei Antikörper aus einem Patienten mit Pankreaskarzinom (PM-1 und PM-2) und zwei weitere Antikörper (CM-1 und CM-2) aus einem Patienten mit Kolonkarzinom zu isolieren (Brändlein et al., 2002).

Die mittels der humanen Hybridoma Technologie erhaltenen Antikörper wurden einer ausführlichen immunhistochemischen Untersuchung zugeführt um eine Aussage über ihre Bindung an Tumorzellen bzw. normale Zellen zu ermöglichen. Hierzu wurden die fünf IgM-Antikörper auf einer Vielzahl von verschiedenen Tumorgeweben sowie auf normalen Geweben getestet. Hierbei zeigte sich, dass die Antikörper spezifisch an Tumorzellen binden, nicht jedoch mit normalen Geweben kreuzreagieren. Die Antikörper reagieren somit tumorspezifisch. Interessanterweise zeigten sich Unterschiede im Grad der Reaktivität zwischen den einzelnen Antikörpern. Während die Antikörper LM-1 und PM-2 ein überaus breites Reaktionsspektrum auf Tumorgeweben aufwiesen und darüber hinaus auf nahezu allen getesteten Fällen eine positive Reaktion zeigten, verhielten sich die Antikörper PM-1, CM-1 und CM-2 unterschiedlich. Diese Antikörper reagierten zwar durchaus mit fast allen getesteten Karzinomtypen positiv, nicht aber mit allen untersuchten Fällen. Bemerkenswert ist in diesem Zusammenhang vor allem der Antikörper CM-2, welcher ausschließlich auf kolorektalen Karzinomen ein positives Ergebnis aufwies. Der Antikörper zeigte auf keinem anderen Tumortyp eine Reaktion mit Tumorzellen und auch im Falle der kolorektalen Karzinome markierte er nur in ca. 39% der untersuchten Fälle zuverlässig die Tumorzellen.

Die Untersuchungen zeigten, dass die aus Tumorpatienten isolierten IgM-Antikörper, ähnlich wie der Antikörper PAM-1, spezifisch mit entarteten Zellen reagieren. Nur bei

einem Antikörper (CM-1) konnte eine Kreuzreaktion mit normalem Ösophagusgewebe beobachtet werden. Die Resultate der Gewebefärbung lassen erste Rückschlüsse auf Art und Verteilung der spezifischen Antigene der einzelnen Antikörper zu. Bei der Auswertung der Ergebnisse fiel auf, dass die Antikörper LM-1 und PM-2 zumeist identische Reaktionen mit den verschiedenen Gewebetypen zeigen. Es ist daher denkbar, dass sich beide Antikörper gegen Antigene richten, die nur geringe Unterschiede in der molekularen Struktur und Verteilung auf den Geweben aufweisen. Vergleicht man dagegen die Antikörper CM-1 und CM-2, zeigen sich große Unterschiede. Antikörper CM-2 zeigt im Vergleich zu CM-1 deutlich weniger positive Resultate auf kolorektalen Karzinomen und Tumoren anderen histologischen Ursprungs. Sie reagieren aber beide weder mit nicht-neoplastischem adultem noch, wie andere Untersuchungen zeigten, mit fetalem Gewebe. Daraus könnte man schließen, dass es sich bei der von CM-2 erkannten antigenen Determinanten um ein vergleichsweise selten vorkommendes Molekül handeln muss, welches zudem weder auf gesunden Zellen noch während der fetalen Entwicklungsphase exprimiert wird. Es wäre in diesem Zusammenhang denkbar, dass es sich um ein relativ spezifisches, nur von einigen kolorektalen Karzinomen exprimiertes, modifiziertes Antigen handelt, sodass der gegen das Antigen gerichtete Antikörper keinerlei Kreuzreaktionen mit gesundem Gewebe aufweist.

Da die Zahl der Antikörper-Antigen-Bindungen nicht nur davon abhängt, in welcher Kopienzahl ein Antigen auf einem Gewebe exprimiert wird, sondern auch davon, welche Affinität der Antikörper zu seinem Antigen aufweist, könnte auch eine geringere Affinität von CM-2 zu seinem Antigen die Ursache dafür sein, dass mit diesem Antikörper nur wenige positive Färberesultate zu beobachten waren. Die Anfärbung einer Großzahl verschiedener Gewebe durch die Antikörper LM-1, PM-1, PM-2 und CM-1 deutet dagegen darauf hin, dass diese Antikörper entweder eine sehr hohe Affinität zu ihren Antigenen haben oder aber dass die Antigene auf verschiedenen Zellen diverser Gewebe vorkommende Moleküle sein müssen.

Mit Hilfe funktioneller zellbiologischer Tests wurde der Einfluss der im Rahmen dieser Arbeit isolierten IgM-Antikörper auf das Wachstum verschiedener Karzinomzelllinien *in vitro* charakterisiert. Mit Hilfe von Proliferationstests (MTT-Test) konnte gezeigt werden, dass die Antikörper nach Inkubation auf verschiedenen Zelllinien eine deutliche Hemmung des Zellwachstums bewirkten. Die durch diese Tests belegte Wachstumshemmung der Tumorzellen wurde mit Hilfe eines Apoptose-Tests (Cell Death Detection ELISA^{PLUS}) näher charakterisiert. Hiermit konnte eindeutig nachgewiesen werden, dass alle

untersuchten Antikörper nicht nur die Proliferation hemmen sondern darüber hinaus eine Apoptose-Induktion auf die Tumorzellen ausüben (Brändlein et al., 2002). Diese funktionelle Aktivität der humanen IgM-Antikörper ist vor allem für einen potentiellen therapeutischen Einsatz der Antikörper von größtem Interesse.

Im weiteren Verlauf wurden die VH- und VL-Regionen der schweren und leichten Immunglobulin-Ketten der fünf Antikörper zur näheren Charakterisierung ihres genetischen Repertoires sequenziert und ihre homologen Keimbahn-Gene bestimmt. Hierbei zeigte sich, dass die schweren Immunglobulin-Ketten der Antikörper PM-1, PM-2 und CM-1 durch Gene der VH3-Familie determiniert werden. Bei Antikörper LM-1 wurde ein Gen aus der VH4-Familie, bei Antikörper CM-2 ein Gen aus der VH5-Familie verwendet. Bei den Sequenzierungen der leichten Immunglobulin-Ketten zeigte sich, dass diese durch verschiedene VL-Gene der Familien 2, 3 und 5 kodiert werden. Ein auffälliger Aspekt ist hier die ausschließliche Verwendung der κ -leichten Kette.

Durch den Vergleich mit den zugehörigen homologen Keimbahn-Genen konnte das sog. R/S Verhältnis ermittelt werden. Dieses Verhältnis von R- (Replacement = Aminosäureaustausch-Mutation) zu S- (silent = stille Mutation) Mutationen ist ein Maß für die Affinitätsreifung der Antikörper durch somatische Mutation. Liegt das R/S Verhältnis über 2.9, hat der Antikörper eine Reifung durch Antigen-Aktivierung durchlaufen (Matsuda et al., 1998; Shlomchik et al., 1987). Da das R/S Verhältnis der hier dargestellten Antikörper bei beiden Immunglobulin-Ketten durchgehend bei unter 2.9 liegt, gehören die Antikörper somit zur Gruppe der nicht affinitätsgereiften, natürlichen Antikörpern und sind somit Produkte der angeborenen Immunität.

4.3 Angeborene Immunität

Im Speziellen versteht man unter der angeborenen (natürlichen) Immunität ein vererbtes, nicht klonales und nicht durch Affinitätsreifung entstandenes, in allen multizellulären Organismen vorkommendes und sofort verfügbares Abwehrsystem. Verantwortlich für die angeborene Immunität sind zum einen Zellen der myeloischen Reihe sowie Makrophagen, Natürliche Killer (NK)-Zellen und gamma-delta T-Lymphozyten, welche zytotoxisch wirken. Zum anderen sind an der natürlichen Immunität Lymphozyten, also B-Zellen (B1 oder CD 5+ Zellen) und das Komplementsystem beteiligt (Boes, 2000b; Bohn, 1999; Colucci et al., 2002; Ferrarini et al., 2002; Kronenberg and Gapin, 2002; Kuppen et al., 2001; Moretta et al., 2002b). Im Gegensatz zur adaptiven Immunität, bei der erst eine

klonale Expansion von T- und B-Zellen nach Antigenpräsentation im Kontext mit „Selbst“ (MHC) stattfinden muss, reagiert die angeborene Immunität sofort nach Antigenkontakt. Diese T-Zell- und MHC-unabhängige Immunantwort setzt allerdings voraus, dass die angeborene Immunität über eine ausreichende Anzahl von unterschiedlichen Rezeptoren verfügt, die in der Lage sind, möglichst viele unterschiedliche „fremde“ Zellen zu erkennen.

In der angeborenen Immunität erfolgt die Erkennung, also die Unterscheidung von „Selbst-Nicht-Selbst“, über konservative, allgemeine Strukturen wie z.B. ubiquitär vorhandene Polysaccharid-Strukturen auf infektiösen Bakterien, also Strukturen, die einer geringeren Mutationsrate unterliegen als Proteine. Die Bindung dieser Antigene erfolgt wiederum über distinkte Keimbahn-kodierte, strukturell unterschiedliche Sets von Rezeptoren auf allen immunkompetenten Zellen der angeborenen Abwehr, sog. Pathogen- oder Pattern-Recognition-Receptors (PRR) (Janeway, 1989). Diese evolutionäre Strategie verhindert die Entwicklung sog. Escape-Mutanten und ermöglicht, dass eine geringe Anzahl von Keimbahn-kodierten (germ-line) Rezeptoren ein breites Spektrum an „fremden“ Strukturen erkennen kann (Medzhitov and Janeway, 1997).

Zu diesen PRRs, welche zu ganz bestimmten Proteinfamilien zählen, gehören z.B. sog. Secreted Proteins, die nach Bindung von Mannose zu einer Komplementaktivierung führen, Phagocytosis- Rezeptoren auf Makrophagen, die zu einer Opsonisierung führen und sog. TLRs (toll like receptors, humanes Homolog zu den aus *Drosophila* bekannten Toll Rezeptoren) auf Makrophagen, Dendriten, und NK-Zellen und auf B1(CD5+)-B-Zellen (Gay and Keith, 1991; Hashimoto et al., 1988; Janeway and Medzhitov, 2002; Medzhitov and Janeway, 1997; Muzio et al., 2000). Nach der Bindung erfolgt eine Heterodimerisierung oder Komplexisierung mit anderen membrangebundenen oder löslichen Molekülen, welche eine Signalkaskade induzieren, die wiederum zu einer Zytokinausschüttung (z. B. IL-1), damit zu inflammatorischen Prozessen und zu einer Aktivierung weiterer Immunzellen führen (Janeway and Medzhitov, 2002; Means et al., 2000).

Alle PRR liegen in einer entsprechenden Variabilität vor und müssen nicht erst durch Mutationen erzeugt werden. Diese Keimbahn-kodierten Moleküle besitzen in der Regel eine breite Spezifität und erkennen so beispielsweise viele verwandte Strukturen auf pathogenen (PAMPs (pathogen-associated molecular patterns) (Medzhitov and Janeway, 2000) und weniger spezifische Strukturen. Bei den PAMPs handelt es sich in der Regel um Polysaccharide und Polynukleotide, die sich geringfügig von Pathogen zu Pathogen

unterscheiden und nicht im Organismus vorkommen. PAMPs spielen in der Struktur von Bakterien oft eine entscheidende Rolle und sind daher relativ konserviert exprimiert. Einige typische Beispiele sind LPS (z.B. Lipid A), Peptidoglycan (PGN), Lipoproteine (Lipoarabinomannan), bakterielle DNA und bakterielle Flagellen.

Wie die Erkennung und Abwehr von entarteten Zellen erfolgt, ist zumindest auf humoraler Seite bisher relativ unklar. Allerdings weisen die Ergebnisse der letzten Jahre und dieser Arbeit über natürliche IgM-Antikörper, wie beispielsweise deren Kreuzreaktionen, ihre geringe Affinität, die Erkennung von Carbohydraten etc. (Hensel et al., 1999a und b; Hensel et al., 2001a; Brändlein et al., in prep.), verblüffende Parallelen zur bakteriellen Abwehr auf, sodass zumindest vermutet werden kann, dass möglicherweise die gleichen Erkennungsmuster vorliegen wie bei der Erkennung von bakteriellen Antigenen.

4.4 Natürliche B-Zellen

Wie bereits erwähnt sind an der natürlichen Immunität spezielle Lymphozyten und die von ihnen gebildeten Antikörper entscheidend beteiligt. B1-Zellen repräsentieren ein uniques Set von Lymphozyten, die sich phylogenetisch, phänotypisch und funktionell von den konventionellen B- (B2) Zellen unterscheiden (Forster et al., 1991; Hardy, 1992; Haughton et al., 1993; Hayakawa and Hardy, 2000a; Hayakawa et al., 1985; Herzenberg, 2000; Kipps, 1989; Martin and Kearney, 2001b; Rothstein, 2002; Su and Tarakhovsky, 2000; Wortis and Berland, 2001). B1-Zellen entstehen im Organismus zeitlich vor den B2-Zellen, sie machen den Hauptteil der neonatalen B-Zellen aus und verringern ihre Anzahl mit der Zunahme von B2-Zellen (Rothstein, 2002; Hayakawa et al., 1983; Lalor et al., 1989; Hamilton et al., 1994). Ein typisches Merkmal ist die Expression des pan T Glycoproteins CD5 zusammen mit membrangebundenem IgM, IgD, B220, CD23 und CD43. In normalen Individuen sind B1-Zellen für die Produktion von natürlichen IgM- und IgA-Antikörpern verantwortlich (Forster and Rajewsky, 1987; Ishida et al., 1992; Kroese et al., 1993; Lam and Rajewsky, 1999; Martin and Kearney, 2001; Sidman et al., 1986). Diese von B1-Zellen produzierten Immunglobuline sind meist Keimbahn-kodiert, mit geringer Anzahl somatischer Mutationen und einem beschränktem Genrepertoire. Sie durchlaufen, im Gegensatz zu den B2 Antikörpern, keine weitere Affinitätsreifung (Feeney, 1990; Forster et al., 1988; Gu et al., 1990; Pennell et al., 1988; Wortis, 1992).

B1-Zellen werden mit einer Vielzahl pathophysiologischer Erkrankungen in Verbindung gebracht, z.B. bei Autoimmunerkrankungen. So ist beispielsweise bei der Autoimmunen

Dyskrasie die Anzahl der B1-Zellen stark erhöht (Burastero et al., 1988; Dauphinee et al., 1988). B1-Zellen können somatische Mutationen durchlaufen, einen sog. „isotype switch“ durchführen und hochspezifische pathologische Autoantikörper sezernieren (Arnold et al., 1988; Mantovani et al., 1993; Wuttke et al., 1997). Außerdem können B1-Zellen durch maligne Transformationen zu chronisch lymphatischen Leukämie (CLL) Zellen entarten (Caligaris-Cappio et al., 1982; Gu et al., 1990). B1-Zellen sind auch dazu in der Lage natürliche IgM-Antikörper gegen ABO-Blutgruppen zu sezernieren, die durch Kreuzreaktion mit bakteriellen Antigenen stark zunehmen können (Wuttke et al., 1997).

Die B1-Zell-Antigenerkennung der angeborenen Immunität erfolgt über spezifische membrangebundene Immunglobuline (mIg), die allerdings nicht singuläre Strukturen, sondern als PRRs ganz bestimmte Pattern erkennen (PAMPs, siehe oben). Die PRRs unterscheiden zwischen verschiedenen konservativen Molekülen auf unterschiedlichen Trägern (Moller, 1999). Das erste Signal, die Bindung der Antigene an mIg, induziert ein Cross-linking und damit eine B-Zell-Proliferation. Ein zweites Signal induziert die Aktivierung der ebenfalls konstitutiv auf B-Zellen exprimierten Toll-like-Rezeptoren (TLRs) und schließlich die Antikörperproduktion (Ogata et al., 2000; Vos et al., 2000). Die Antigenbindung und Aktivierung dieser B-Zell-TLRs induziert inflammatorische Zytokine wie IL-1, IL-8, IL-6, IFN-gamma und die Expression co-stimulatorischer Moleküle wie CD80 (Medzhitov et al., 1997). Die häufigsten B-Zell-aktivierenden PAMPs sind hochrepetitive Moleküle wie Lipopolysaccharide der Bakterienzellwand (Wright, 1995), virale Hemagglutinone (Cash et al., 1996; Rott and Cash, 1994), oder CpG-reiche bakterielle DNA (Krieg, 1996). Die sezernierten Antikörper sind Keimbahn-kodierte, oligoreaktive und nieder-affine IgM-Moleküle.

Die nötige Variabilität der Ig-Rezeptoren auf B1-Zellen erfolgt durch kombinatorische Assoziation von Keimbahn-Immunglobulin-Genen (Cedar and Bergman, 1999; Clarke and Arnold, 1998; Feeney, 1990; Forster et al., 1988; Hayakawa and Hardy, 2000; Klinman and Holmes, 1990; Pennell et al., 1988; Qin et al., 1999; Sidman et al., 1986). Durch Rekombination der V-(D)-J Segmente kann theoretisch eine Vielzahl an Spezifitäten erzeugt werden, welche ausreicht um einen natürlichen Schutz gegen pathogene Organismen und Zellen zu gewährleisten. Allein die V-Gene der H-Ketten bestehen bei Säugetieren aus mehreren hundert V-Elementen, 20-30 D und bis zu 10 J Elementen (Cedar and Bergman, 1999; Constantinescu and Schlissel, 1997; Gellert, 1997; Lewis, 1994; Papavasiliou et al., 1997; Schatz et al., 1992). Durch zusätzliche Additionen und Deletionen, sowie durch Fehler während der Rekombination wird die tatsächliche Zahl der

B1-Spezifitäten noch größer. Schätzungen sprechen von ca. 10^6 möglichen mIg-Spezifitäten, im Gegensatz zu ca. 10^8 der adaptierten Immunität, welche durch weitere Mutationen entstehen (Litman et al., 1993). Eine zusätzliche Variabilität kann durch Kombination der V-D-J und V-J Gene mit den verschiedenen Genen der konstanten (C) Regionen erzeugt werden. Dies führt wiederum zu unterschiedlichen Immunglobulinen, welche die gleiche Spezifität aufweisen, aber unterschiedliche Effektorfunktionen ausüben (Litman et al., 1993; Nezlin, 2001; Rothenberg, 2000).

Für den in unserem Labor isolierten und charakterisierten Antikörper SC-1 konnte inzwischen anhand von Untersuchungen mit einem anti-SC-1-Idiotyp Antikörper gezeigt werden, dass er von CD-5 + B-Zellen gebildet wird (Brändlein et. al. in prep.). Ähnliche Untersuchungen sind mit weiteren Antikörpern geplant.

4.5 IgM-Antikörper

Untersuchungen der humanen Immunität gegen maligne Zellen, deren Mechanismen, beteiligten Komponenten und Strukturen sollten möglichst an dem Organismus angestellt werden, bei welchem diese Prozesse stattfinden, nämlich am Menschen selbst. Wie sich in den letzten Jahren gezeigt hat, führt die künstliche Induktion einer Immunantwort durch Xenoinmunisierung von Tieren mit humanen Zellen zu einer Immunantwort gegen alle möglichen Strukturen auf den injizierten Zellen, nie aber gegen Tumorantigene im eigentlichen Sinne. Der Grund hierfür liegt in der Natur der meisten tumorspezifischen Strukturen. Es handelt sich hierbei meistens um geringfügige Unterschiede zwischen normalen und entarteten Zellen wie beispielsweise Carbohydratmodifikationen (Egea et al., 1993; Hanisch et al., 1996; Turner, 1992, Hensel et al., 1999a; Hensel et al., 2001a und b). Die Xenoinmunisierung führt dagegen in der Regel zu einer Immunantwort gegen die Hauptkomponenten auf den menschlichen Tumorzellen, welche in der Regel zur Gruppe der normalen oder zum Teil auch überexprimierten Differenzierungsantigene gehören. Aus diesem Grund ist es in den letzten 25 Jahren nicht gelungen einen einzigen Maus-Antikörper gegen ein Tumorantigen auf menschlichen Zellen zu generieren.

Die in dieser Arbeit beschriebene und von unserem Labor entwickelte Methode der humanen Hybridoma Technologie, welche sich hauptsächlich aus einer Immortalisierung von B-Lymphozyten und nachfolgender autologer bzw. syngener Austestung der isolierten Antikörper zusammensetzt, garantiert dagegen die Entdeckung von tumorspezifischen

Antikörpern. Durch diese Methode ist es möglich von vornherein spezifische Tumor-Antikörper zu identifizieren und diese von Auto-Antikörpern abzugrenzen. Solche Antikörper, welche im Verlauf der Testung nicht mit normalen Zellen reagieren sondern ausschließlich mit Tumorzellen, sind demzufolge in der Tat als tumorspezifisch anzusehen. Darüber hinaus ist es mit den Antikörpern, die mittels dieser Methode isoliert wurden, zudem möglich neue Tumorantigene zu identifizieren, wie die Beispiele der CD55/SC-1 und CFR-1/PAM-1 Rezeptoren zeigen (Hensel et al., 1999a; Hensel et al., 2001a. Da es sich bei den erkannten Epitopen um auf Tumorzellen modifizierte Carbohydrate handelt, wären diese Antigene mittels anderer Methoden (z.B. Xenoinmunisierung) vermutlich nie identifiziert worden.

Mit dem Ziel der Generierung neuer tumorspezifischer Antikörper aus verschiedenen Karzinompatienten wurden in den letzten Jahren in diesem Labor eine Reihe von Fusionen mit Lymphozyten verschiedenen Ursprungs durchgeführt. Ein Teil der Fusionen waren Bestandteil der vorliegenden Arbeit. Die Lymphozyten wurden aus verschiedenen Geweben (Milz, Tumor, Lymphknoten) von insgesamt 50 Tumorpatienten isoliert und durch Fusion mit dem Heteromyelom HAB-1 immortalisiert. Durchschnittlich wurden ungefähr 7×10^7 Lymphozyten pro Fusion verwendet. Tabelle 24 zeigt die Art der Lymphozytenquelle, die Anzahl der durchgeführten Fusionen, die Fusionseffizienz sowie die Gesamtzahl der gewachsenen Klone. Die Fusionseffizienz lag im Durchschnitt bei 30–75% und war abhängig von der Lymphozyten-Quelle. Die größte Effizienz konnte mit Lymphozyten erreicht werden, die aus Milzen isoliert wurden. Hier wuchsen während der HAT-Selektion in ca. 75% der wells Klone heran. Fusionen mit Lymphozyten anderen Ursprungs zeigten im Durchschnitt ein geringeres Wachstum.

Die Zellkultur-Überstände aller gewachsenen Hybridoma-Klone wurden zuerst in einem ELISA getestet, durch welchen zum einen gezeigt wurde, wie viele der Klone Immunglobuline sezernieren. Zum anderen wurde gleichzeitig der Immunglobulin-Isotyp der Antikörper bestimmt. Tabelle 24 zeigt, dass zwischen 30 und 60% der gewachsenen Klone Immunglobuline produzierten. Auch hier wurden die besten Ergebnisse mit Lymphozyten aus Milzen erreicht. Zusammenfassend kann zudem bemerkt werden, dass sich aus Patienten jeglicher Tumorerkrankung solche Antikörper isolieren lassen.

Weiterhin konnte beobachtet werden, dass die Wachstumsfrequenz, d.h. die Fusions-effizienz weitgehend unabhängig von der Art des erkrankten Organs ist. Der entscheidende Faktor für das Wachstum der Klone scheint vielmehr die Lymphozyten-Quelle zu sein.

Vergleicht man beispielsweise die Effizienz von Fusionen, die mit Milz-Lymphozyten von Magen-, Kolon- und Pankreaskarzinom-Patienten durchgeführt wurden, zeigt sich, dass unabhängig vom erkrankten Organ eine einheitliche hohe Effizienz erreicht werden konnte. Auch beim Vergleich von Fusionen mit aus Lymphknoten isolierten Lymphozyten aus Lunge und Prostata zeigt sich eine einheitliche Fusionseffizienz bei Lungen- und Prostatakarzinom-Patienten. Nur bei somatischen Hybridisierungen mit Lymphozyten von Brustkarzinom-Patienten zeigte sich eine ähnlich schlechte Effizienz wie bei Fusionen mit Lymphozyten aus dem Knochenmark.

Tab. 24: Überblick über Fusionen mittels humaner Hybridoma Technologie

Tumor	Lymphozyten Quelle	Patienten Zahl	Anzahl an Fusionen	Fusions-effizienz [%]	Gewachsene Klone	ELISA-positive Klone	Tumor-reaktive Antikörper
Magen	Milz	4	165	75	13500	7500	80
	Tumor	10	10	50	550	250	2
	Knochenmark	8	8	30	65	60	0
Kolon	Milz	1	15	75	615	295	45
	Tumor	1	1	45	76	30	1
	Knochenmark	1	1	30	10	0	0
Pankreas	Milz	1	7	75	540	139	21
Lunge	Lymphknoten	13	31	50	1430	395	31
Prostata	Lymphknoten	8	14	45	560	178	28
Brust	Lymphknoten	3	5	30	85	23	3

Die Reaktivität der isolierten humanen Antikörper wurde im weiteren zunächst auf autologem Tumorgewebe getestet. In einigen Fällen, in denen kein autologes Gewebe zur Testung vorlag, wurde ein Tumor gewählt, der in Typ und Klassifizierung dem autologen Tumor entsprach. In Tabelle 24 ist dargestellt, wie viele der ELISA-positiven Antikörper in der nachfolgenden immunhistochemischen Testung auf dem autologen Tumorgewebe ein positives Ergebnis zeigten, d.h. an Tumorzellen gebunden haben. Bei näherer Betrachtung der Immunglobulin-Isotypen der isolierten Antikörper war auffällig, dass die überwiegende Mehrheit der tumorreaktiven Antikörper vom IgM-Isotyp waren.

Nach einer positiven Reaktion wurden diese tumorreaktiven Antikörper im Folgenden auf einer Reihe von gesunden Geweben untersucht. Hierdurch sollte festgestellt werden,

welche dieser Antikörper tumorspezifisch im eigentlichen Sinne sind, d.h. welche Antikörper ausschließlich mit Tumorgewebe reagieren und keinerlei Kreuzreaktivität mit gesunden Geweben zeigen. Die besten Ergebnisse wurden auch hier bei Antikörpern gefunden, welche Fusionen aus Lymphozyten der Milz oder Lymphknoten entstammten. Die Fusionen mit Lymphozyten, die aus Knochenmark isoliert wurden, brachten dagegen weder tumorreaktive noch tumorspezifische Antikörper hervor.

Wie bereits erwähnt produzieren zwischen 30 und 60% der wachsenden Hybridoma-Klone Immunglobuline. Schaut man sich nun die Verteilung der einzelnen Immunglobulin-Isotypen, die durch den initialen ELISA ermittelt wurden, genauer an, zeigt sich, dass abhängig vom betroffenen Organ zwischen 35 und 70% der sezernierten Antikörper vom IgM-Isotyp sind (Abb. 45).

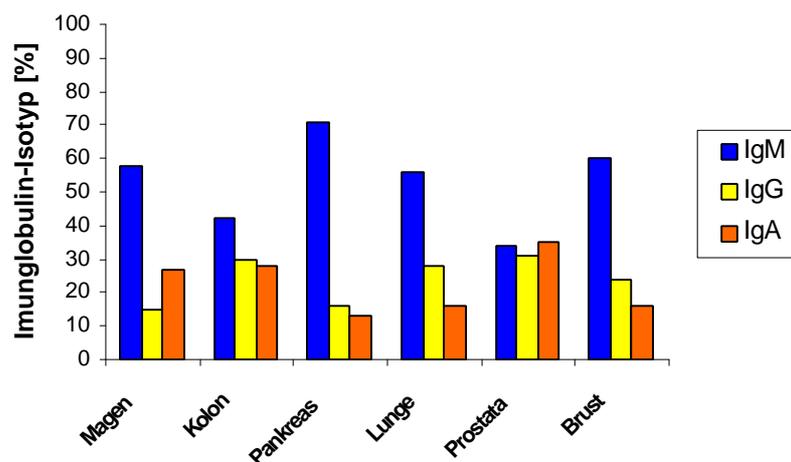


Abb. 45: Übersicht über die Immunglobulintypen der mit Hilfe der humanen Hybridoma Technologie isolierten Antikörper. Das Verhältnis der Isotypen ist für die einzelnen Organe dargestellt, die von der Tumorerkrankung betroffen waren. Antikörper, die aus Magen-, Pankreas-, Lungen- und Brustkarzinom-Patienten isoliert wurden waren hauptsächlich vom IgM-Isotyp, während das Verhältnis bei Antikörpern aus Kolon- und Prostatakarzinom-Patienten ausgeglichener war.

Zum Beispiel konnte beobachtet werden, dass Antikörper von Magen-, Pankreas-, Lunge- und Brustkarzinom-Patienten einen Überschuss an IgM zeigen. Die Antikörper, die aus Kolon- und Prostatakarzinom-Patienten isoliert wurden, zeigten im Bezug auf die Verteilung der Ig-Isotypen IgM, IgG und IgA ein ausgeglicheneres Verhältnis. Generell

wurden IgM-Antikörper häufig gefunden, aber auch IgG- und IgA-Antikörper wurden in großen Mengen durch die humane Hybridoma Technologie isoliert (15-30%).

Betrachtet man nun im speziellen die Antikörper, welche im ersten immunhistochemischen Test mit dem autologen Tumor reagierten, d.h. tumorreaktiv waren, ergibt sich folgendes Bild (siehe Abb. 46). Das Diagramm zeigt, dass sich das Verhältnis der Immunglobulin-Isotypen zu IgM hin verschiebt. Mindestens 55% bis hin zu 100% der isolierten Antikörper, welche bei immunhistochemischer Testung mit dem autologen Tumor reagierten, waren IgMs.

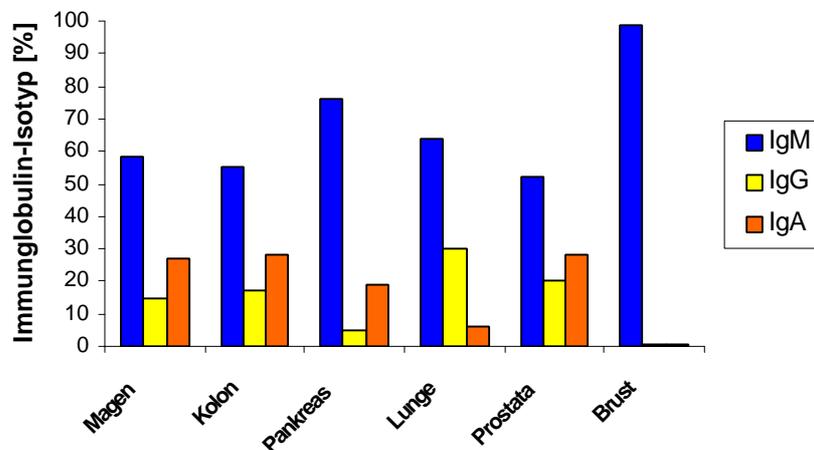


Abb. 46: Übersicht über die Immunglobulintypen der mit Hilfe der humanen Hybridoma Technologie isolierten tumorreaktiven Antikörper. Das Verhältnis der Isotypen ist für die einzelnen Organe dargestellt, die von der Tumorerkrankung betroffen waren. Die tumorreaktiven Antikörper aus allen betroffenen Organen zeigen einen deutlichen Überschuss des IgM-Isotyps.

Antikörper, welche in immunhistochemischen Tests ausschließlich mit Tumorgewebe und nicht mit Normalgewebe reagierten, werden im Folgenden als tumorspezifisch bezeichnet. Noch eindeutiger zeigt sich der zuvor beobachtete Trend in der Verteilung der Ig-Isotypen bei den wirklich tumorspezifischen Antikörpern (Abb. 47). Alle mit Hilfe der Hybridoma Technologie isolierten humanen monoklonalen Antikörper, welche spezifisch mit Tumorgewebe reagierten, waren ohne Ausnahme IgM-Antikörper.

IgMs sind pentamere Aggregate, die durch ein J-Protein verknüpft werden. Eine Grundeinheit hat ein durchschnittliches Molekulargewicht von 900 kD. Sie bilden den größten Anteil der natürlichen Antikörper und werden im Verlauf einer Immunantwort als erste Antikörperklasse produziert. Sie sind in der Lage Bakterien zur Phagozytose zu

opsonieren, Tumorzellen oder infizierte Zellen für die antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity durch Killerzellen zu sensitivieren/markieren (Parkin and Cohen, 2001). Ein großer Anteil der natürlichen Antikörper (IgM) ist (kreuz)reaktiv mit entwicklungs-geschichtlich konservierten Strukturen wie Nukleinsäuren, Hitzeschockproteinen, Phospholipiden und Kohlenhydraten (Boes, 2000). Durch das Fehlen der somatischen Mutation im V-Segment von IgM-Antikörpern neigen diese zu einer niedrigeren Affinität bei der Antigenbindung. Diese können sie unter anderem durch ihre pentamere Struktur kompensieren. Durch ihre pentamere Struktur können sie beispielsweise das Komplementsystem besonders wirksam über den klassischen Weg aktivieren (Boes, 2000).

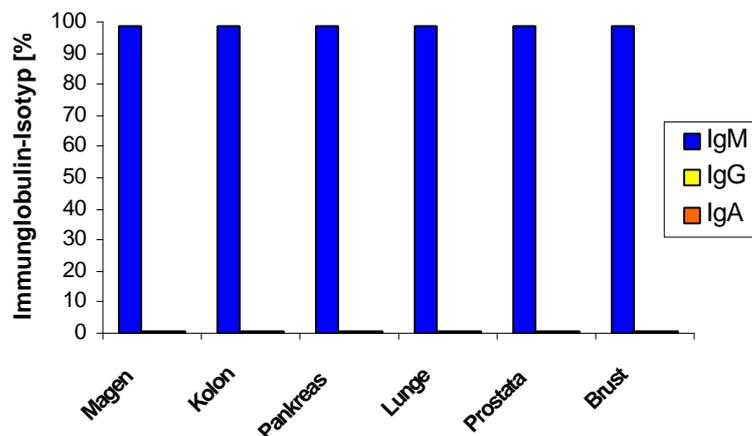


Abb. 47: Übersicht über die Immunglobulintypen der mit Hilfe der humanen Hybridoma Technologie isolierten tumorspezifischen Antikörper. Das Verhältnis der Isotypen ist für die einzelnen Organe dargestellt, die von der Tumorerkrankung betroffen waren. Die tumorspezifischen Antikörper, d.h. Antikörper, welche spezifisch mit Tumorgewebe, nicht aber mit Normalgewebe reagierten, sind ausschließlich IgMs.

4.5.1 IgM Genetik

Die in dieser Arbeit isolierten humanen IgM-Antikörper, die spezifisch mit Tumorzellen reagieren, zeigen ganz bestimmte Charakteristika. Es handelt sich immer um IgM-Antikörper, welche Keimbahn-kodiert bzw. nur sehr schwach mutiert sind. Die verwendeten Keimbahn-Gene der schweren Immunglobulin-Ketten gehören hauptsächlich der VH3- und VH4-Familie an.

Diese Ergebnisse passen in das Bild welches die in den letzten Jahren in unserer Arbeitsgruppe isolierten Antikörper aus Lymphozyten von Tumorpatienten zeichneten. Es zeigte sich im Laufe der Jahre eine restriktive Verwendung von bestimmten Genen, die hauptsächlich aus der VH3 und VH4 Familie stammen. Untersuchungen von B-Lymphozyten, welche im peripheren Blut zirkulieren, zeigten dagegen eine Verwendung von Genen der VH3-Familie bei nur 56% der untersuchten Zellen und von Genen der VH4-Familie bei 20% (Brezinschek et al., 1995). Durch den Vergleich der Sequenzen der VH-Regionen mit den homologen Keimbahn-Genen wurde eine weitere Restriktion bei der Verwendung der VH-Gene offensichtlich. Das Keimbahn-Gen IgHV3-30 (DP-49), das in der normalen B-Zell-Population bei 8,5% aller Antikörper bei der Rekombination verwendet wird (Brezinschek et al., 1995), konnte bei über 50% der bisher untersuchten Antikörper nachgewiesen werden. Auch der Antikörper CM-1, der im Rahmen dieser Arbeit isoliert werden konnte, wird durch dieses Gen determiniert. Die überwiegende Mehrheit der analysierten VH-Regionen liegt in der Keimbahn-Konfiguration oder schwach mutiert vor. Auch vier der hier vorgestellten Antikörper liegen mit mehr als 99% Homologie in Keimbahn-Konfiguration vor. Dieses steht im Kontrast zu den in Antikörpern des peripheren Blutes gefundenen VH3-Genen, bei denen die Mehrzahl weniger als 94% Homologie zu ihrem Keimbahn-Gen zeigen und die somit eine affinitätsgetriebene Reifung durchlaufen haben (Brezinschek et al., 1995).

Eine restriktive Verwendung definierter Keimbahn-Gene ist ein mehrfach beschriebenes Phänomen bei der Bildung von Antikörpern gegen bakterielle Antigene. Gene der VH3- und VH4-Familien werden auch bei der spezifischen Immunreaktion verwendet. Newkirk *et al.* (1995) konnten durch Untersuchungen an monoklonalen Antikörpern zeigen, dass einige Gene der VH-Familien häufiger bei der Bildung von Immunglobulinen gegen pathogene Keime verwendet werden, als dieses bei der zufälligen Verwendung aller zur Verfügung stehender Elemente zu erwarten wäre. So haben Untersuchungen zur Immunität gegen *Haemophilus influenzae* gezeigt, dass die Gene der VH3- und VH4-Familien vorwiegend für die humorale Immunantwort gegen pathogene Keime Verwendung finden (Adderson et al., 1991; Silverman and Lucas, 1991). Bemerkenswert ist, dass Antikörper gegen *Haemophilus influenzae* Polysaccharide vorwiegend unter Verwendung eines spezifischen VH-Genes (IgHVH3-15) gebildet werden. Huang et al. (1992) zeigten zudem die Verwendung von Genen der VH3- und VH4-Familie bei anti-Virus Antikörpern.

Auch die Sequenzierung der VL-Regionen zeigte eine nicht zufällige Verwendung bestimmter Keimbahn-Gene. Der erste auffällige Aspekt ist die fast ausschließliche

Verwendung der λ -leichten Kette. Dieses Resultat weicht deutlich von der Verwendung der λ -leichten Kette im normalen B-Zell-Repertoire ab, bei dem nur 40% der leichten Ketten zum λ -Isotyp gehören. Die Verwendung bestimmter VL-Gene bei der Bildung pathogener Antikörper ist wenig untersucht, da man annimmt, dass die leichte Kette nur wenig zur Bindung des Antigens beiträgt und somit nur von geringerem Interesse ist. Jedoch wurde bei der rheumatoiden Arthritis und der chronischen lymphatischen Leukämie eine gehäufte Verwendung definierter VL-Gene gefunden (Ermel et al., 1994; Spatz et al., 1990).

Die Ergebnisse der genetischen Analysen der im Rahmen dieser Arbeit isolierten und weiterer in unserem Labor als tumorspezifisch identifizierter Antikörper sind zur Veranschaulichung in den Tabellen 25 und 26 zusammengefasst.

Tab. 25: Sequenzen der schweren Immunglobulin-Ketten der bisher aus Tumorpatienten isolierten tumorspezifischen IgM-Antikörper

Antikörper	VH-Familie	Keimbahn-Gen	Homologie [%]	R/S FR	R/S CDR
SC-1	VH3	DP-49, (IgHV3-30/3-30.5*01)	97	4/2	2/0
PAM-1	VH3	DP-49,(IgHV3-30/3-30.5*01)	100	0/0	0/0
CM-1	VH3	DP-49, (IgHV3-30/3-30.5*01)	100	0/0	0/0
SAM-3	VH3	DP-49 (IgHV3-30)	100	0/0	0/0
SAM-5	VH3	DP-49 (IgHV3-30)	99,3	0/0	0/2
SAM-4	VH3	DP-47 (IgHV3-23)	100	0/0	0/0
PM-2	VH3	DP-47, (IgHV3-23*01)	100	0/0	0/0
PM-1	VH3	DP-47, (IgHV3-23*01)	100	0/0	0/0
SAM-1	VH3	DP-42 (IgHV3-53)	99,6	0/0	0/1
LM-1	VH4	DP-65, (IgHV4-30.1/4-31*01)	99,6	1/0	0/0
CM-2	VH5	DP-73, (IgHV5-51*01)	97,2	2/1	3/2

Tab. 26: Sequenzen der leichten Immunglobulin-Ketten der bisher aus Tumorpatienten isolierten tumorspezifischen IgM-Antikörper

Antikörper	VL-Familie	Keimbahn-Gen	Homologie [%]	R/S FR	R/S CDR
SC-1	λ	DPL-23, (IgLV3-1*01)	96,8	3/2	3/0
SAM-1	λ	DPL-23, (IgLV3-1*01)	100	0/0	0/0
PAM-1	λ	LV318, (IgLV3-21*03)	98,7	3/0	0/1
PM-1	λ	(IgLV3-10*01)	99,0	2/1	0/0
CM-1	λ	(IgLV3-25*03)	99,3	1/1	0/0
SAM-4	λ	DPL-8, (IgLV1-40*01)	98,6	3/0	0/1
SAM-5	λ	DPL-5, (IgLV1-51*01)	94,8	6/3	4/2
CM-2	λ	DPL-11, (IgLV2-14*01)	97,2	0/2	4/2
PM-2	λ	(IgLV5-45*01)	98,2	3/2	0/0
SAM-3	κ	-	-	-	-

Auch diese IgM-Antikörper sind nicht oder nur wenig mutiert und gehören somit zur Klasse der nicht affinitätsgereiften, natürlichen Antikörper. Die zugehörigen Rezeptoren sind bis jetzt nur für die Antikörper SC-1 und PAM-1 identifiziert, die der anderen Antikörper werden zur Zeit näher charakterisiert. Bei den bisher isolierten Antikörpern ist auffällig, dass sowohl die schweren als auch die leichten Immunglobulin-Ketten der Antikörper von ganz bestimmten Keimbahn-Genen kodiert werden (Brändlein et al., in prep).

Bei den schweren Immunglobulin-Ketten zeigt sich, wie bereits erwähnt, eine auffällige Häufung der VH3- und VH4-Familie. Innerhalb der VH3-Familie zeigen sich vor allem DP49 und DP47 dominant. Eine Vielzahl der Antikörper weist keinerlei Mutation auf. Betrachtet man die Gesamtzahl der Mutationen der beiden Immunglobulin-Ketten, zeigen die Antikörper SAM-5, CM-2 und SC-1 im Vergleich mit den übrigen Antikörpern die meisten Mutationen.

Vergleicht man nun die Anzahl der Mutationen mit der Anzahl der spezifisch erkannten Tumorgewebe, also mit dem Grad der Antikörper-Reaktivität, tritt eine verblüffende Korrelation zu Tage. Je mehr ein Antikörper mutiert ist, desto weniger verschiedene Karzinomtypen waren in der immunhistochemischen Analyse positiv. Umgekehrt zeigten Antikörper mit keiner oder lediglich einer Mutation ein überaus breites Reaktionsspektrum

auf den untersuchten Karzinomen. Die Gesamtzahl der Mutationen sind offensichtlich reziprok mit dem Grad der Reaktivität der Antikörper korreliert (siehe Abb. 48). Dies deutet darauf hin, dass auch innerhalb der Keimbahn-kodierten Antikörper durch vereinzelte Mutationen eine höhere Variabilität erzeugt werden kann. Ähnlich wie bei der Affinitätsreifung der erworbenen Immunität, scheint sich auch hier die Spezifität mit der Anzahl der Mutationen zu erhöhen.

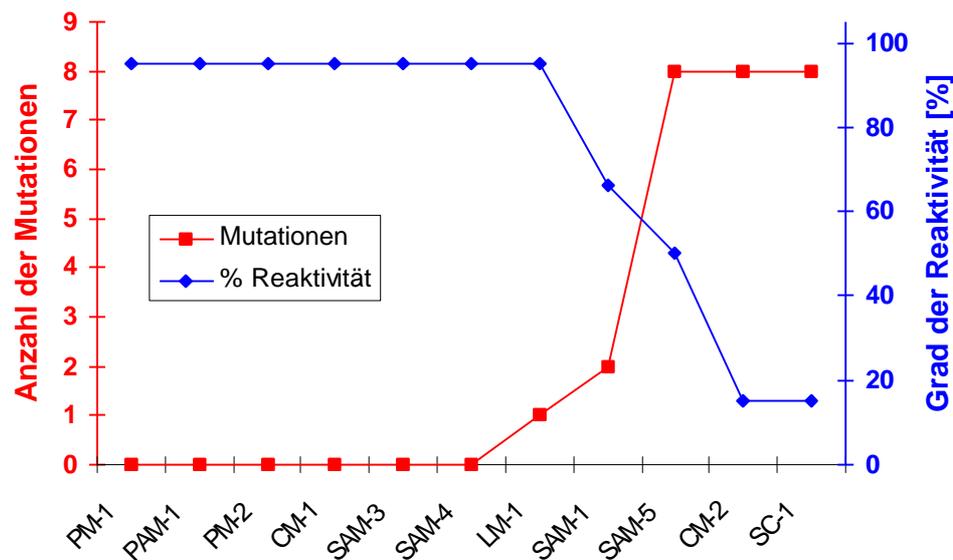


Abb. 48: Vergleich der Gesamtanzahl an Mutationen mit dem Grad an Reaktivität der IgM-Antikörper. Dargestellt sind auf der einen Seite die Anzahl der Mutationen in den Immunglobulinketten (rot). Auf der anderen Seite ist die Reaktivität der Antikörper mit Tumorgewebe in Prozent angegeben (blau). Die beiden Parameter sind reziprok korreliert.

4.5.2 IgM Funktion

Die Aufgabe des Immunsystems ist es infektiöse Partikel und transformierte Zellen schnell und sauber zu eliminieren, ohne dem Organismus durch Auslösung inflammatorischer Prozesse einen Schaden zuzufügen. Aufgrund ihrer einzigartigen pentameren Struktur gehören IgM-Antikörper zu den effektivsten Waffen des Immunsystems. Ein einzelner IgM-Antikörper reicht aus um eine Zielzelle zu beseitigen, was allein durch die Möglichkeit der Kreuzvernetzung gewährleistet wird.

Mit Hilfe funktioneller zellbiologischer Tests wurde der Einfluss der im Rahmen dieser Arbeit isolierten IgM-Antikörper auf das Wachstum verschiedener Karzinomzelllinien *in vitro* charakterisiert. Mit Hilfe von Proliferationstests (MTT-Test) und Apoptose-Tests

(Cell Death Detection ELISA^{PLUS}) konnte eindeutig nachgewiesen werden, dass alle untersuchten Antikörper nicht nur die Proliferation hemmen, sondern darüber hinaus eine Apoptose-Induktion auf die Tumorzellen ausüben (Brändlein et al., 2002). Diese funktionelle Aktivität der humanen IgM-Antikörper ist vor allem für einen potentiellen therapeutischen Einsatz der Antikörper von größtem Interesse.

Monoklonale Antikörper wirken über verschiedene Mechanismen auf ihre Zielzelle ein. So unterbricht beispielsweise der chimäre Antikörper Infliximab (Remicade[®]) den entzündlichen Prozess bei der rheumatoiden Arthritis und bei Morbus Crohn, indem er sein Zielantigen, den Botenstoff TNF α , blockiert (Markham and Lamb, 2000). Ebenso wirkt der Antikörper Abciximab (ReoPro[®]), der durch Blockade des thrombozytären GPIIb/IIIa-Rezeptors die Entstehung von Thromben verhindert (Borchmann et al., 2001).

Daneben können monoklonale Antikörper sowohl über die Fc-Teil-vermittelte Aktivierung des Komplementsystems (CDC, complement dependent cytotoxicity) als auch durch Auslösung einer sekundären zellulären Immunreaktion (ADCC, antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity) indirekt zytotoxisch auf die antigentragende Zelle einwirken (z.B. Alemtuzumab, Rituximab, Trastuzumab)(Goodman et al., 1990; Valerius et al., 1997).

Eine andere Therapiestrategie mit Antikörpern besteht in der Konjugation monoklonaler Antikörper mit Radioisotopen (Griesinger et al., 2001), Immunotoxinen (Hertler and Frankel, 1989) oder Zytostatika, wodurch ein zielgenauer Angriff des Tumorgewebes bei gleichzeitig geringer systemischer Toxizität möglich wird (Trail and Bianchi, 1999). So wurde Anfang 2002 der chimäre ⁹⁰Yttrium-gekoppelte Antikörper Zevalin[®] (Ibritumomab-tituxetan) von der US FDA zur Behandlung von Non-Hodgkin-Lymphomen (NHL) zugelassen (Gura, 2002). Weitere Antikörper befinden sich im Zulassungsverfahren wie zum Beispiel Bexxar[®] (Tositumomab, ¹³¹Iodine-anti-CD20 mouse mAb), welcher erfolgreich die Phase-III der klinischen Studien zur Behandlung von NHL überstanden hat (Carter, 2001). Mit Mylotarg[®] (Gemtuzumab-Zogamicin) steht bereits ein Zytostatika-immunkonjugat für die Therapie der akuten myeloischen Leukämie zur Verfügung (Bernstein, 2000).

Weiterhin sind Mechanismen beschrieben, bei denen Antikörper durch direkte Bindung an membranständige Rezeptoren eine intrazelluläre Signalkaskade induzieren, die schließlich zum apoptotischen Zelltod führt (Vollmers et al.1989; Vollmers et al., 1995; Vollmers et al., 1998a und b; Hensel et al., 1999a; Hensel et al., 2001b). Eine Antikörper-vermittelte Induktion von Apoptose wurde für den in der Einleitung beschriebenen humanen Antikörper SC-1 gezeigt, der an eine neue Variante des CD55/DAF (decay accelerating

factor) bindet (Hensel, 1999a; Hensel 2001b). Der CD55/SC-1 Apoptoserezeptor ist spezifisch auf Magenkarzinomzellen überexprimiert. Der IgM-Antikörper SC-1 bindet an den Rezeptor und induziert *in vivo* und *in vitro* Apoptose von Magenkarzinomzellen (Vollmers et al., 1989; Vollmers et al., 1995; Vollmers et al., 1997; Vollmers et al., 1998a und b; Hensel et al., 1999a; Hensel et al., 2001b; Hermann et al., 2001; Illert et al., in prep.). Die Antikörper Rituximab und Trastuzumab scheinen über einen ähnlichen Mechanismus in die Regulation des Zellzyklus einzugreifen (Borchmann et al., 2001; Glennie and Johnson, 2000).

Auch die in dieser Arbeit charakterisierten Antikörper induzieren wie bereits erwähnt spezifisch Apoptose, nachdem sie an Tumorzellen gebunden haben. Die Apoptose bezeichnet den physiologischen Tod einer Zelle als unmittelbares Resultat eines zelleigenen Selbstzerstörungsprozesses. Mit Hilfe dieses Vorgangs können nicht mehr benötigte, defekte oder prä-maligne Zellen aus dem Organismus entfernt werden. Auf diese Weise wird das Gleichgewicht zwischen Zellneubildung und Zelluntergang gewahrt (Kerr et al., 1972). Die äußerst komplexen intrazellulären Vorgänge der Apoptose enden programmgemäß im Abbau der Zellstruktur. Spezielle Proteasen, die Caspasen, zerlegen die Proteine der Zelle, Endonukleasen fragmentieren die Nukleinsäuren. Das Ergebnis sind Membranvesikel, sog. „apoptotic bodies“, welche anschließend in das Drüsenlumen abgegeben oder von umliegenden oder infiltrierenden Zellen (z.B. Makrophagen) phagozytiert (Riede und Schaefer, 1995) werden. Die Zellen werden somit rückstandslos und ohne begleitende inflammatorische Prozesse vom Organismus „recycelt“. Damit stellt die Beseitigung von Tumorzellen durch apoptotische Prozesse die ideale, weil schonendste Therapieform dar und rückt immer mehr in den Mittelpunkt des Interesses der Krebstherapie. Da neoplastische Zellen jedoch häufig aufgrund genetischer Alterationen auf die bekannten Apoptosemechanismen nicht mehr ansprechen, wird nach Möglichkeiten gesucht, solche entartete Zellen mit Hilfe eines externen apoptotischen Signals gezielt angreifen zu können. Zwar konnte *in vitro* mit verschiedenen Liganden und monoklonalen Antikörpern gegen den Fas (APO-1/CD95) Rezeptor Apoptose auf Tumorzelllinien induziert werden (Suda and Nagata, 1994; Trauth et al., 1989), diese Antikörper eignen sich jedoch nicht für die Anwendung als Immuntherapeutika, da ihr Antigen auch von einer Vielzahl nicht neoplastischer Zellen exprimiert wird (Leithauser et al., 1993) und zudem bei Experimenten *in vivo* toxische Kreuzreaktionen mit Lebergewebe beobachtet wurden (Ogasawara et al., 1993; Rensing-Ehl et al., 1995).

Der humane Antikörper SC-1 dagegen hat bereits in klinischen Studien seine gute Verträglichkeit bewiesen und stellt ein überaus potentes adjuvantes Immuntherapeutikum für die Behandlung von Magenkarzinomen dar (Vollmers 1998a und b, Hensel et al., 1999a; Hensel 2001b; Illert et al., in prep.). Die bisherigen Ergebnisse der klinischen Studien mit SC-1 zeigen, dass es möglich ist die aus Tumorpatienten isolierten Antikörper risikoarm immuntherapeutisch einzusetzen, ohne dadurch die klassische Tumorthherapie zu beeinträchtigen. Im Hinblick auf diese Ergebnisse lässt der Nachweis der Apoptose-induzierenden Aktivität der Antikörper LM-1, PM-1, PM-2, CM-1 und CM-2 darauf hoffen, dass diese Antikörper ebenfalls in der Tumorthherapie Verwendung finden werden. Um aufzudecken über welchen Mechanismus die Antikörper zum Zelltod führen, sind weitere funktionelle, molekularbiologische sowie biochemische Untersuchungen notwendig. Insbesondere die Isolierung und Charakterisierung der spezifischen Antigene könnte zur Klärung diese Frage einen wesentlichen Beitrag leisten.

Erste Western-Blot Analysen haben eine spezifische Bindung der Antikörper an verschiedene Membranproteine von Karzinomzelllinien gezeigt (Brändlein et al., 2002). Diese Befunde geben einen ersten Hinweis auf die Antigene, welche durch die tumorspezifischen Antikörper LM-1, PM-1, PM-2, CM-1 und CM-2 gebunden werden. Da die Versuche ausschließlich mit Proteinen aus den Membranen von Tumorzelllinien durchgeführt wurden, sprechen die Ergebnisse dafür, dass es sich bei den Antigenen um membranständige Rezeptoren handelt. In dieser Arbeit wurden für jeden Antikörper Tumorzelllinien verwendet, welche dem erkrankten Organ der Lymphozytenspender am besten entsprachen. So wurde beispielsweise für die Western-Blot Analyse der Antikörper PM-1 und PM-2 die Membranproteine aus einer Pankreaskarzinom-Zelllinien isoliert. Das relativ breite Verteilungsmuster der Antikörper in den immunhistochemischen Analysen, mit Ausnahme von CM-2, zeigt jedoch, dass die Antigene der Antikörper auch auf vielen Zellen anderer Tumoren exprimiert werden. Da sich jedoch keine Färbungen mit normalen Geweben aufwiesen, handelt es sich deshalb wahrscheinlich um Membranrezeptoren, welche entweder nur auf Tumoren exprimiert werden oder zumindest in Tumorzellen stark überexprimiert sind.

4.5.3 IgM Epitope

Wie bereits bekannt und in der Einleitung beschrieben handelt es sich sowohl bei dem CFR-1/PAM-1 Rezeptor als auch bei dem DAF/SC-1 Rezeptor um Glykoproteine. Somit stellte sich auch im Hinblick auf die neu isolierten Antikörper die Frage, ob die Glykosylierung der Antigene einen Einfluss auf die Bindung der Antikörper hat.

Dieses wurde durch Behandlung von Zytospins mit O- und N-Glykosidasen und anschließender immunhistochemischer Färbung mit den verschiedenen Antikörpern untersucht. Da für die Antikörper CM-2 und PM-1 anhand dieser Methode keine eindeutigen Aussagen getroffen werden konnten, wurden zusätzlich Membranproteine von Tumorzellen mit den Glykosidasen verdaut und anschließend einer Western-Blot Analyse unterzogen. Die deutliche Abnahme der Reaktion der Antikörper LM-1, PM-1, PM-2 und CM-1 mit N-Glykosidase bzw. O-Glykosidase behandelten Zellen weist darauf hin, dass die Antikörper an eine Zuckerkette der Antigene binden oder solche Carbohydrate zumindest entscheidend in die Bindung involviert sind. Diese Ergebnisse nehmen Einfluss auf die weiteren Untersuchungen, da z.B. Versuche mit rekombinanten Proteinen nicht durchgeführt werden können. Es ist davon auszugehen, dass solche Proteine, auch wenn sie in eukaryotischen Zellen exprimiert werden, nicht die gleichen Eigenschaften aufweisen werden, da in den Tumoren eine veränderte Glykosylierung durchgeführt wird. Dieses konnte z.B. für Tumore des Darms gezeigt werden (Bresalier et al., 1996; Ho et al., 1995). Es gibt mehrere Beispiele für die entscheidende Rolle, welche Glykoproteine bei der Immunreaktion von Tumorpatienten spielen können. Eines dieser Beispiele ist die H^+/K^+ ATPase, eine Protonenpumpe, die den Magen ansäuert und in den Parietalzellen lokalisiert ist. Verschiedene Gruppen konnten aus Gastritis-Patienten Antikörper isolieren, die mit der β -Untereinheit dieses Proteins reagieren (Karlsson et al., 1988). Detailliertere Untersuchungen zeigten, dass die Oligosaccharidkette der β -Untereinheit maßgeblich an der Bindung der Antikörper beteiligt ist (Ma et al., 1990; Toh et al., 1990). Die Oligosaccharidseitenkette der β -Untereinheit zeigt strukturelle Homologien (Callaghan et al., 1990) zu den Lewis- Blutgruppenantigenen. Ein weiteres Beispiel ist das pFV, ein Superantigen des Intestinaltraktes. Ebenso wie CFR-1 ist pFV ein Sialoglykoprotein und bindet an Antikörper, deren schwere Kette durch ein Gen der VH3-Familie gebildet wird (Silverman et al., 1995). Eine weiterführende Untersuchung des Einflusses der Glykosylierung auf die Bindung der beschriebenen Antikörper an ihre Antigene wird einen Einblick in die Immunität von Karzinompatienten liefern. Ein verändertes

Glykosylierungsmuster bestimmter Proteine ist ein typisches Merkmal transformierter Zellen (Egea et al., 1993; Hanisch et al., 1996; Turner, 1992).

Eine weiterführende Charakterisierung der Antigene der Antikörper LM-1, PM-1, PM-2, CM-1 und CM-2, die Aufreinigung ihrer Antigene, sowie die Sequenzierung dieser Proteine, wird zur Zeit in unserer Arbeitsgruppe im Rahmen einer anderen Dissertation durchgeführt

4.6 IgM-Antikörper in gesunden Probanden

Die Ergebnisse der letzten Jahre sprechen dafür, dass die Immunität gegen aberrante Zellen von einem Set an natürlichen IgM-Antikörpern bewerkstelligt werden, welche der angeborenen Immunität des Menschen entstammen. Aus diesem Grund stellt sich die naheliegende Frage nach der Existenz solcher Antikörper in gesunden Menschen.

Um diese zusätzlichen Daten zur natürlichen Immunität gegen entartete Zellen zu erhalten sollten Antikörper aus Milzzellen von Probanden isoliert werden, welche nicht an einem Tumorleiden erkrankt waren. In den letzten Jahren konnte solches lymphatische Material von Patienten im Pathologischen Institut gesammelt werden. Mit Hilfe der humanen Hybridoma Technologie sollten Lymphozyten aus normalen Milzen mit einem Heteromyelom fusioniert werden und die resultierenden Antikörper und deren Rezeptoren immunologisch, genetisch und molekularbiologisch charakterisiert werden. Die erhaltenen Antikörper sollten mit den Antikörpern, die aus Tumorpatienten isoliert wurden, verglichen werden.

Es ist gelungen mehrere tumorspezifische Antikörper zu isolieren und näher zu charakterisieren. Auch diese Antikörper sind alle vom IgM-Isotyp und weisen keinerlei Reaktionen mit normalen Geweben auf. Eine nähere Analyse zeigte, dass auch diese tumorspezifischen IgM-Antikörper aus gesunden Probanden ebenfalls nicht oder nur wenig mutiert sind und demnach zur Klasse der nicht affinitätsgereiften, natürlichen Antikörper gehören. Es werden die gleichen schweren und leichten Immunglobulin-Ketten verwendet wie bei Antikörpern aus Tumorpatienten. Der Antikörper N-1 wird durch das gleiche unmutierte Gen der VH3-Familie determiniert wie die Antikörper PM-1 und PM-2. Nur die verwendeten D- und J-Segmente unterscheiden sich. Auch die gering mutierte leichte κ -Immunglobulin-Kette des Antikörpers N-1 ist der von PM-1 homolog. Es wird jedoch wiederum ein unterschiedliches J-Segment verwendet. Darüber hinaus konnte gezeigt

werden, dass die tumorspezifischen Antikörper aus gesunden Probanden *in vitro* Apoptose von Tumorzellen induzieren. Das bedeutet, dass sich auch in gesunden Menschen dieselbe Art tumorreaktiver Antikörper finden lässt wie in Karzinompatienten. Diese Ergebnisse erhärten darüber hinaus die Beobachtung, dass die Tumorreaktivität der Antikörper nicht das Ergebnis der erworbenen Immunität ist, sondern vielmehr der natürlichen angeborenen Immunität zuzuordnen ist.

4.7 Résumé

Die in dieser Arbeit sowie die über die letzten Jahre erhaltenen Ergebnisse über Tumormunität von Patienten und Gesunden zeigen, dass sich die humorale Immunität ausschließlich auf natürliche IgM-Antikörper beschränkt. Es konnten dagegen weder tumor-spezifische IgG- noch IgA-Antikörper gefunden werden. Die isolierten IgM-Antikörper gehören zu den natürlichen Antikörpern und weisen deren typische Eigenschaften wie beispielsweise Keimbahn-Kodierung, das Auftreten von Kreuzreaktionen, eine geringe Affinität und die Erkennung von Carbohydraten auf (Hensel et al., 1999a und b; Hensel et al., 2001a)

Die in dieser Arbeit gezeigten Ergebnisse weisen verblüffende Parallelen zur bakteriellen Abwehr auf. Aus diesem Grund liegt die Vermutung nahe, dass möglicherweise die gleichen Erkennungsmuster vorliegen wie bei der Erkennung von bakteriellen Antigenen. Die gefundenen Parallelen zwischen der Abwehr von pathogenen Keimen und entarteten Zellen zeigen, dass die gleiche Art von natürlichen IgM-Antikörpern an beiden Prozessen beteiligt ist. Die Existenz natürlicher tumorspezifischer IgM-Antikörper in erkrankten sowie in gesunden Menschen, welche aberante Zellen durch apoptotische Prozesse zu eliminieren vermögen, liefern höchstwahrscheinlich die Antwort auf die zu Beginn gestellte Frage, warum ein Organismus nicht von malignen Zellen überschwemmt wird. Die natürliche angeborene Immunität des Menschen und nicht die erworbene Immunität ist dafür verantwortlich, dass die Manifestation von entarteten Zellen die Ausnahme und nicht die Regel bleibt.

5 Zusammenfassung

Die Entstehung maligner Zellen durch irreversible genetische Veränderungen ist ein allgegenwärtiger Prozess im menschlichen Organismus. Allein die spontane Mutationsrate genügt um in einem Organismus permanent transformierte Zellen entstehen zu lassen, welche den Körper in kürzester Zeit überschwemmen würden. Auch wenn bestimmte genetische Schäden frühzeitig durch Reparaturmechanismen beseitigt werden und sich nicht jede transformierte Zelle in einem Tumor manifestiert, so ist die eigentliche Frage nicht, warum Krebs entsteht, sondern warum er bei der hohen Mutationsrate so selten auftritt.

Verantwortlich für die frühe Erkennung und Beseitigung transformierter Zellen ist das körpereigene Immunsystem, das in der Lage ist die meisten aberranten Zellen zu entfernen, sodass der manifeste Tumor die Ausnahme und nicht die Regel ist. Der menschliche Organismus verfügt über ein angeborenes und ein erworbenes Immunsystem. Bis heute ist nicht eindeutig geklärt, ob maligne Zellen mit ihren veränderten Oberflächenstrukturen erst eine Immunantwort induzieren müssen oder ob, wie bei der Abwehr infektiöser Partikel, die angeborene Immunität für die Beseitigung von Tumorzellen verantwortlich ist.

Die in dieser Arbeit verwendete humane Hybridoma Technologie (Immortalisierung menschlicher Lymphozyten und Isolierung monoklonaler Antikörper) bietet die einzigartige Möglichkeit, sowohl aus an Krebs erkrankten Patienten als auch aus gesunden Probanden tumorspezifische Antikörper zu isolieren und durch deren genauere Charakterisierung Einblicke in die humorale Immunität gegen maligne Zellen zu erhalten.

In der vorliegenden Arbeit werden fünf humane monoklonale Antikörper beschrieben, die aus verschiedenen Tumorpatienten gewonnen wurden, sowie zwei Antikörper, die aus gesunden Probanden isoliert werden konnten. In allen Fällen erwiesen sich die Antikörper als tumorspezifisch, d.h. sie reagieren nicht mit gesundem Gewebe und sind demnach keine Autoantikörper. Es handelt sich weiterhin in allen Fällen um Antikörper des IgM-Isotyps; es konnten keinen Antikörper anderer Ig-Klassen isoliert werden. Genetische Analysen ergaben, dass alle isolierten Antikörper gering oder gar nicht mutiert waren, was bedeutet, dass sie nicht durch Stimulation affinitätsgereift sind. Zudem konnte demonstriert werden, dass alle Antikörper Apoptose von Tumorzellen induzieren und dass sie an eine Zuckerkette ihrer Antigene binden oder solche Carbohydrate zumindest entscheidend in die Bindung involviert sind. Die Eigenschaften der in dieser Arbeit beschriebenen Antikörper wurden mit anderen bereits etablierten IgM-Antikörpern verglichen. Hierbei

stellte sich heraus, dass alle Antikörper, welche sich als tumorspezifisch erwiesen, ähnliche Eigenschaften zeigen. Interessant ist zudem die Beobachtung, dass die Kreuzreaktion der Antikörper, also ihre Reaktion mit anderen Tumorgeweben, reziprok mit dem Mutationsgrad korreliert ist. Je mehr Mutationen ein Antikörper aufweist, desto eingeschränkter und spezifischer sind demnach seine Reaktionen mit anderen Tumoren.

Dies deutet darauf hin, dass auch innerhalb der Keimbahn-kodierten Antikörper durch vereinzelte Mutationen eine höhere Variabilität erzeugt werden kann. Ähnlich wie bei der Affinitätsreifung der erworbenen Immunität scheint sich auch hier die Spezifität mit der Anzahl der Mutationen zu erhöhen.

Zusammenfassend weisen die erhaltenen Ergebnisse darauf hin, dass zumindest die humorale Immunität gegen maligne Zellen das Resultat der angeborenen Immunität ist und nicht von Tumorzellen induziert wird. Dies bedeutet zudem, dass Moleküle wie natürliche Antikörper in der Immunität eine viel größere Rolle spielen als bisher angenommen. Ähnliche Ergebnisse wurden bereits bei der Untersuchung der Immunität gegen bakterielle Antigene erzielt, sodass hier vermutet werden kann, dass die gleichen Mechanismen zugrunde liegen wie bei der Abwehr transformierter Zellen. Darüber hinaus wird die Frage beantwortet, warum ein manifester Tumor eine Ausnahme bleibt. Die angeborene, primäre Immunität verfügt über ein existierendes Repertoire an Rezeptoren, welche eine ausreichende Variabilität aufweisen, und muss daher nicht erst über ein komplexes System von Erkennung und Stimulation, wie die adaptierte Immunität, induziert werden. Dieser logistische Vorsprung der natürlichen Immunität garantiert eine permanente Überwachung und eine schnelle Reaktion gegenüber veränderten Zellen und fremden Partikeln.

6 Summary

The formation of malignant cells through irreversible genetic alterations is a chronic process in a human organism. The spontaneous mutation rate is high enough to let transformed cells arise permanently in an organism and to flood the body with these cells in a short period of time. Although specific genetic damages were eliminated very early by repair mechanisms and not every transformed cell became a manifest tumour, the major question to be answered is not why cancer arises but why it occurs so infrequently despite of the high mutation rate.

The immune system is responsible for the early detection and elimination of transformed cells. It is able to remove most of the transformed cells so that tumour formation is the exception but not the rule. The immune system of the human organism consists of an innate and an acquired system.

Until the present time it is not explained definitely, whether malignant cells with their altered surface structure have to induce an immune answer or if the innate immunity is responsible for the elimination of tumour cells like for infectious particles.

In this dissertation the human hybridoma technology (immortalisation of human lymphocytes and isolation of human monoclonal antibodies) was used to investigate this question. This technique offers the unique possibility to isolate tumour-specific antibodies from cancer patients as well as from healthy persons and to attain additionally insights into the humoral immunity against malignant cells.

Five human monoclonal antibodies were described which were isolated from different cancer patients and in addition two antibodies obtained from healthy donors. In all of the cases the antibodies prove to be tumour-specific which means they do not react with healthy tissues and are according to this no auto-antibodies. All of them are IgM antibodies, no tumour-specific IgA or IgG antibody was detectable. Genetic analysis show that all isolated antibodies were only slightly mutated or not mutated at all, which means that they were not affinity-maturated due to antigen stimulation. Furthermore it was possible to demonstrate that all isolated tumour-specific IgM antibodies induce apoptosis in tumour cells. Another result indicates that carbohydrates are involved in the binding of the antibodies to their corresponding antigen. The characteristics of the antibodies were compared with other IgM antibodies which were already established in our lab. Here all antibodies which prove to be tumour-specific show similar characteristics. Interestingly the amount of cross reactivity with other tumour tissues correlates reciprocally with the degree of mutations. The more mutations an antibody displays the more reduced are the reactions with other tumour tissues. This indicates that, similar to the

affinity-maturation of adapted immunity, an increase of specificity and most likely also variability of germ-line coded antibodies can be generated by few mutations.

Our observations indicate that the humoral immunity against malignant cells is the result of the innate immunity. This means moreover that molecules like natural antibodies play a much more important role in immunity than assumed so far. Similar results were obtained already with analysis of immunity against bacterial antigens. This leads to the assumption that here the same mechanisms are involved like in the defence against transformed cells. Moreover the question could be answered why a manifest tumour remains an exception. The innate, primary immunity has an existing repertoire of receptors which are variable enough so that a complex system of recognition and stimulation like in the acquired immunity does not have to be induced. This logistic advantage of the natural immunity guarantees a permanent control and a fast reaction towards altered cells and foreign particles.

7 Literaturverzeichnis

7.1 Verwendete Literatur

- Abe, N., Watanabe, T., Toda, H., Machida, H., Suzuki, K., Masaki, T., Mori, T., Sugiyama, M., Atomi, Y., and Nakaya, Y. (2001). Prognostic significance of carcinoembryonic antigen levels in peritoneal washes in patients with gastric cancer. *Am J Surg* 181, 356-361.
- Adams, G.P. and Schier, R. (1999). Generating improved single-chain Fv molecules for tumor targeting. *J Immunol Methods* 231, 249-260.
- Adderson, E.E., Shackelford, P.G., Quinn, A., and Carroll, W.L. (1991). Restricted Ig H chain V gene usage in the human antibody response to *Haemophilus influenzae* type b capsular polysaccharide. *J. Immunol.* 147, 1667-1674.
- Adjei, A.A. (2001). Ras signaling pathway proteins as therapeutic targets. *Curr Pharm Des* 7, 1581-1594.
- Alberts, B., Bray, D., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., Watson, J.D. (1994). Watson, J. D., Cancer. In: Robertson, M., Adams, R., Cobert, S.M., Goertzen, D. (eds.), *Molecular biology of the cell*, third edition ed., pp. 1255-1291. New York: Garland publishing, Inc..
- Amakata, Y., Fujiyama, Y., Andoh, A., Hodohara, K., and Bamba, T. (2001). Mechanism of NK cell activation induced by coculture with dendritic cells derived from peripheral blood monocytes. *Clin Exp Immunol* 124, 214-222.
- Arends, M.J., Buckley, C.H., and Wells, M. (1998). Aetiology, pathogenesis, and pathology of cervical neoplasia. *J Clin Pathol* 51, 96-103.
- Arnold, L.W., Grdina, T.A., Whitmore, A.C., and Haughton, G. (1988). Ig isotype switching in B lymphocytes. Isolation and characterization of clonal variants of the murine Ly-1+ B cell lymphoma, CH12, expressing isotypes other than IgM. *J Immunol* 140, 4355-4363.
- Balducci, L. and Beghe', C. (2001). Cancer and age in the USA. *Crit Rev Oncol Hematol* 37, 137-145.
- Balzar, M., Winter, M.J., de Boer, C.J., and Litvinov, S.V. (1999). The biology of the 17-1A antigen (Ep-CAM). *J Mol Med* 77, 699-712.
- Berczi, I., Bertok, L., and Chow, D.A. (2000). Natural immunity and neuroimmune host defense. *Ann N Y Acad Sci* 917, 248-257.
- Bernstein, I.D. (2000). Monoclonal antibodies to the myeloid stem cells: therapeutic implications of CMA-676, a humanized anti-CD33 antibody calicheamicin conjugate. *Leukemia* 14, 474-475.
- Birnboim, H.C. and Doly, j. (1979). A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic.Acids.Res.* 7, 1513-1523.
- Boel, E., Verlaan, S., Poppelier, M.J., Westerdal, N.A., Van Strijp, J.A., and Logtenberg, T. (2000). Functional human monoclonal antibodies of all isotypes constructed from phage display library-derived single-chain Fv antibody fragments. *J Immunol Methods* 239, 153-166.
- Boes, M. (2000). Role of natural and immune IgM antibodies in immune responses. *Mol Immunol* 37, 1141-1149.
- Bohn, J. (1999). Are natural antibodies involved in tumour defence? *Immunol Lett* 69, 317-320.

- Borchmann, P., Riethmüller, G., and Engert, A. (2001). [Monoclonal antibodies: development and clinical prospects]. *Internist (Berl)* 42, 803-4, 807-814.
- Bokemeyer, C., Hartmann, J.T., and Kanz, L. (1997). [Current aspects of adjuvant and palliative chemotherapy in colorectal carcinoma]. *Schweiz Rundsch Med Prax* 86, 1510-1516.
- Brändlein, S., Lorenz, J., Ruoff, N., Hensel, F., Beyer, I., Müller, J., Neukam, K., Eck, M., Müller-Hermelink, H.K., Vollmers, H.P. (2002). Human monoclonal IgM antibodies with apoptotic activity isolated from cancer patients. *Hum. Antibodies* 11 (4), 107-119.
- Brändlein, S., Beyer, I., Eck, M., Bernhardt, W., Hensel, F., Müller-Hermelink, H.K., Vollmers, H.P. (2003). CFR-1, a new marker for precancerous epithelial lesions defined by the human monoclonal antibody PAM-1. *Cancer Res* 63, 2052-2061.
- Bradford, M.M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal.Biochem.* 72, 248-254.
- Breedveld, F.C. (2000). Therapeutic monoclonal antibodies. *Lancet* 355, 735-740.
- Bresalier, R.S., Ho, S.B., Schoeppner, H.L., Kim, Y.S., Sleisenger, M.H., Brodt, P., and Byrd, J.C. (1996). Enhanced sialylation of mucin-associated carbohydrate structures in human colon cancer metastasis. *Gastroenterol.* 110, 1354-1367.
- Brezinschek, H.P., Brezinschek, R.I., and Lipsky, P.E. (1995). Analysis of the heavy chain repertoire of human peripheral B cells using single-cell polymerase chain reaction. *J.Immunol.* 155, 190-202.
- Brown, D.C. and Gatter, K.C. (2002). Ki67 protein: the immaculate deception? *Histopathology* 40, 2-11.
- Burastero, S.E., Casali, P., Wilder, R.L., and Notkins, A.L. (1988). Monoreactive high affinity and polyreactive low affinity rheumatoid factors are produced by CD5+ B cells from patients with rheumatoid arthritis. *J Exp Med* 168, 1979-1992.
- Burris, H.A. 3rd (2000). Docetaxel (Taxotere) in HER-2-positive patients and in combination with trastuzumab (Herceptin). *Semin Oncol* 27, 19-23.
- Burrus, L.W., Zuber, M.E., Lueddecke, B.A., and Olwin, B.B. (1992). Identification of a cysteine-rich receptor for fibroblast growth factors. *Mol.Cell Biol.* 12, 5600-5609.
- Busam, K.J. and Jungbluth, A.A. (1999). Melan-A, a new melanocytic differentiation marker. *Adv Anat Pathol* 6, 12-18.
- Cadwell, C. and Zambetti, G.P. (2001). The effects of wild-type p53 tumor suppressor activity and mutant p53 gain-of-function on cell growth. *Gene* 277, 15-30.
- Caligaris-Cappio, F., Gobbi, M., Bofill, M., and Janossy, G. (1982). Infrequent normal B lymphocytes express features of B-chronic lymphocytic leukemia. *J Exp Med* 155, 623-628.
- Callaghan, J.M., Toh, B.H., Pettit, J.M., Humphris, D.C., and Gleeson, P.A. (1990). Poly-N-acetyllactosamin-specific tomato lectin interacts with gastric parietal cells. Identification of a tomato-lectin binding 60-90x10³ Mr membrane glycoprotein. *J.Cell Sci.* 95, 563-576.
- Canizares, F., Sola, J., Perez, M., Tovar, I., De Las Heras, M., Salinas, J., Penafiel, R., and Martinez, P. (2001). Preoperative values of CA 15-3 and CEA as prognostic factors in breast cancer: a multivariate analysis. *Tumour Biol* 22, 273-281.
- Carmichael, J., DeGraff, W.D., Gazdar, A.F., Minna, J.D., and Mitchell, J.B. (1987). Evaluation of a tetrazolium-based semiautomated colorimetric assay: assessment of chemosensitivity testing. *Cancer Res.* 47, 936-942.
- Carson, D.A. and Freemark, B.D. (1986). Human lymphocyte hybridomas and monoclonal antibodies. *Adv Immunol* 38, 275-311.

- Carter, P. (2001). Improving the efficacy of antibody-based cancer therapies. *Nature Rev Cancer* 1, 118-129.
- Carter, P., Presta, L., Gorman, C.M., Ridgway, J.B., Henner, D., Wong, W.L., Rowland, A.M., Kotts, C., Carver, M.E., and Shepard, H.M. (1992). Humanization of an anti-p185HER2 antibody for human cancer therapy. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89, 4285-4289.
- Casaccia-Bonofil, P., Gu, C., Khursigara, G., and Chao, M.V. (1999). p75 neurotrophin receptor as a modulator of survival and death decisions. *Microsc Res Tech* 45, 217-224.
- Casali, P. and Notkins, A.L. (1989). CD5+ B lymphocytes, polyreactive antibodies and the human B-cell repertoire. *Immunol Today* 10, 364-368.
- Cash, E., Charreire, J., and Rott, O. (1996). B-cell activation by superstimulatory influenza virus hemagglutinin: a pathogenesis for autoimmunity? *Immunol Rev* 152, 67-88.
- Castelli, C., Rivoltini, L., Andreola, G., Carrabba, M., Renkvist, N., and Parmiani, G. (2000). T-cell recognition of melanoma-associated antigens. *J Cell Physiol* 182, 323-331.
- Chomczynski, P. and Sacchi, N. (1987). Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal.Biochem.* 162, 156-159.
- Chowdhury, P.S., Viner, J.L., Beers, R., and Pastan, I. (1998). Isolation of a high-affinity stable single-chain Fv specific for mesothelin from DNA-immunized mice by phage display and construction of a recombinant immunotoxin with anti-tumor activity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 669-674.
- Cedar, H. and Bergman, Y. (1999). Developmental regulation of immune system gene rearrangement. *Curr Opin Immunol* 11, 64-69.
- Clarke, S.H. and Arnold, L.W. (1998). B-1 cell development: evidence for an uncommitted immunoglobulin (Ig)M+ B cell precursor in B-1 cell differentiation. *J Exp Med* 187, 1325-1334.
- Clark, M. (2000). Chimeric and humanised--misunderstood. *Lancet* 355, 1557.
- Clynes, R.A., Towers, T.L., Presta, L.G., and Ravetch, J.V. (2000). Inhibitory Fc receptors modulate in vivo cytotoxicity against tumor targets. *Nat Med* 6, 443-446.
- Cohen, H.J. (1994). Biology of aging as related to cancer. *Cancer* 74, 2092-2100.
- Cohen, S.M. and Ellwein, L.B. (1991). Genetic errors, cell proliferation, and carcinogenesis. *Cancer Res* 51, 6493-6505.
- Colby, T.V., Wistuba, I.I., and Gazdar, A. (1998). Precursors to pulmonary neoplasia. *Adv Anat Pathol* 5, 205-215.
- Colucci, F., Di Santo, J.P., and Leibson, P.J. (2002). Natural killer cell activation in mice and men: different triggers for similar weapons? *Nat Immunol* 3, 807-813.
- Constantinescu, A. and Schlissel, M.S. (1997). Changes in locus-specific V(D)J recombinase activity induced by immunoglobulin gene products during B cell development. *J Exp Med* 185, 609-620.
- Cooper, E.L., Kauschke, E., and Cossarizza, A. (2002). Digging for innate immunity since Darwin and Metchnikoff. *Bioessays* 24, 319-333.
- Correa, P. (1992). Human gastric carcinogenesis: a multistep and multifactorial process--First American Cancer Society Award Lecture on Cancer Epidemiology and Prevention. *Cancer Res.* 52, 6735-6740.
- Cragg, M.S., French, R.R., and Glennie, M.J. (1999). Signaling antibodies in cancer therapy. *Curr Opin Immunol* 11, 541-547.

- Crnogorac-Jurcevic, T., Efthimiou, E., Capelli, P., Blaveri, E., Baron, A., Terris, B., Jones, M., Tyson, K., Bassi, C., Scarpa, A., and Lemoine, N.R. (2001). Gene expression profiles of pancreatic cancer and stromal desmoplasia. *Oncogene* 20, 7437-7446.
- Cummings, O.W. (2000). Pathology of the adenoma-carcinoma sequence: from aberrant crypt focus to invasive carcinoma. *Semin Gastrointest Dis* 11, 229-237.
- Czuczman, M.S. (1999). CHOP plus rituximab chemoimmunotherapy of indolent B-cell lymphoma. *Semin Oncol* 26, 88-96.
- Dauphinee, M., Tovar, Z., and Talal, N. (1988). B cells expressing CD5 are increased in Sjogren's syndrome. *Arthritis Rheum* 31, 642-647.
- Davis, C.G., Gallo, M.L., and Corvalan, J.R. (1999). Transgenic mice as a source of fully human antibodies for the treatment of cancer. *Cancer Metastasis Rev* 18, 421-425.
- Davis, L.S., Patel, S.S., Atkinson, J.P., and Lipsky, P.E. (1988). Decay-accelerating factor functions as a signal transducing molecule for human T cells. *J.Immunol.* 141, 2246-2252.
- Deppert, W., Gohler, T., Koga, H., and Kim, E. (2000). Mutant p53: "gain of function" through perturbation of nuclear structure and function? *J Cell Biochem Suppl* 35, 115-122.
- Desai, S.A., Wang, X., Noronha, E.J., Kageshita, T., and Ferrone, S. (1998). Characterization of human anti-high molecular weight-melanoma-associated antigen single-chain Fv fragments isolated from a phage display antibody library. *Cancer Res* 58, 2417-2425.
- Dickman, S. (1998). Antibodies stage a comeback in cancer treatment. *Science* 280, 1196-1197.
- Ditzel, H.J. (2000). Human antibodies in cancer and autoimmune disease. *Immunol Res* 21, 185-193.
- Drewe, E. and Powell, R.J. (2002). Clinically useful monoclonal antibodies in treatment. *J Clin Pathol* 55, 81-85.
- Du Pasquier, L. (2001). The immune system of invertebrates and vertebrates. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol* 129, 1-15.
- Dumont, F.J. (2002). CAMPATH (alemtuzumab) for the treatment of chronic lymphocytic leukemia and beyond. *Expert Rev Anticancer Ther* 2, 23-35.
- Dunbar, B.S. and Skinner, S.M. (1990). Preparation of monoclonal antibodies. *Methods Enzymol* 182, 670-679.
- Dworakowska, D., Gozdz, S., Jassem, E., Badzio, A., Kobierska, G., Urbaniak, A., Skokowski, J., Damps, I., and Jassem, J. (2002). Prognostic relevance of proliferating cell nuclear antigen and p53 expression in non-small cell lung cancer. *Lung Cancer* 35, 35-41.
- Dyer, M.J. (1999). The role of CAMPATH-1 antibodies in the treatment of lymphoid malignancies. *Semin Oncol* 26, 52-57.
- Egea, G., Franci, C., Gambus, G., Lesuffleur, T., Zweibaum, A., and Real, F.X. (1993). cis-Golgi resident proteins and O-glycans are abnormally compartmentalized in the RER of colon cancer cells. *J.Cell Sci.* 105, 819-830.
- Ehrlich, Paul. (1900). The general significance of the side-chain theory, and its importance in biology and therapy..
- Endl, E. and Gerdes, J. (2000). The Ki-67 protein: fascinating forms and an unknown function. *Exp Cell Res* 257, 231-237.

- Ermel, R.W., Kenny, T.P., Wong, A., Solomon, A., Chen, P.P., and Robbins, D.L. (1994). Preferential utilization of a novel V lambda 3 gene in monoclonal rheumatoid factors derived from the synovial cells of rheumatoid arthritis patients. *Arthritis.Rheum.* 37, 860-868.
- Fahraeus, R., Fischer, P., Krausz, E., and Lane, D.P. (1999). New approaches to cancer therapies. *J Pathol* 187, 138-146.
- Faller, G., Vollmers, H.P., Weiglein, I., Marx, A., Zink, C., Pfaff, M., and Müller-Hermelink, H.K. (1990). HAB-1, a new heteromyeloma for continuous production of human monoclonal antibodies. *Br.J.Cancer* 62, 595-598.
- Fearon, D.T. and Locksley, R.M. (1996). The instructive role of innate immunity in the acquired immune response. *Science* 272, 50-53.
- Fearon, E.R. and Vogelstein, B. (1990). A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell* 61, 759-767.
- Feeney, A.J. (1990). Lack of N regions in fetal and neonatal mouse immunoglobulin V-D-J junctional sequences. *J Exp Med* 172, 1377-1390.
- Ferrarini, M., Ferrero, E., Dagna, L., Poggi, A., and Zocchi, M.R. (2002). Human gammadelta T cells: a nonredundant system in the immune-surveillance against cancer. *Trends Immunol* 23, 14-18.
- Fisk, B., Blevins, T.L., Wharton, J.T., and Ioannides, C.G. (1995). Identification of an immunodominant peptide of HER-2/neu protooncogene recognized by ovarian tumor-specific cytotoxic T lymphocyte lines. *J Exp Med* 181, 2109-2117.
- Fong, L. and Engleman, E.G. (2000). Dendritic cells in cancer immunotherapy. *Annu Rev Immunol* 18, 245-273.
- Forster, I., Gu, H., Muller, W., Schmitt, M., Tarlinton, D., and Rajewsky, K. (1991). CD5 B cells in the mouse. *Curr Top Microbiol Immunol* 173, 247-251.
- Forster, I., Gu, H., and Rajewsky, K. (1988). Germline antibody V regions as determinants of clonal persistence and malignant growth in the B cell compartment. *EMBO J* 7, 3693-3703.
- Forster, I. and Rajewsky, K. (1987). Expansion and functional activity of Ly-1+ B cells upon transfer of peritoneal cells into allotype-congenic, newborn mice. *Eur J Immunol* 17, 521-528.
- Franklin, W.A. (2000). Pathology of lung cancer. *J Thorac Imaging* 15, 3-12.
- Furukawa, K., Yamaguchi, H., Oettgen, H.F., Old, L.J., and Lloyd, K.O. (1989). Two human monoclonal antibodies reacting with the major gangliosides of human melanomas and comparison with corresponding mouse monoclonal antibodies. *Cancer Res* 49, 191-196.
- Gay, N.J. and Keith, F.J. (1991). Drosophila Toll and IL-1 receptor. *Nature* 351, 355-356.
- Gellert, M. (1997). Recent advances in understanding V(D)J recombination. *Adv Immunol* 64, 39-64.
- Gillespie, J.R. and Uversky, V.N. (2000). Structure and function of alpha-fetoprotein: a biophysical overview. *Biochim Biophys Acta* 1480, 41-56.
- Glassy, M.C. (1987). immortalization of human lymphocytes from a tumor-involved lymph node. *Cancer Res* 47, 5181-5188.
- Glassy, M.C. and Dillman, R.O. (1988). Molecular biotherapy with human monoclonal antibodies. *Mol Biother* 1, 7-13.
- Glennie, M.J. and Johnson, P.W. (2000). Clinical trials of antibody therapy. *Immunol Today* 21, 403-410.
- Goldenberg, M.M. (1999). Trastuzumab, a recombinant DNA-derived humanized monoclonal antibody, a novel agent for the treatment of metastatic breast cancer. *Clin Ther* 21, 309-318.

- Gonatas, J.O., Chen, Y.J., Stieber, A., Mourelatos, Z., and Gonatas, N.K. (1998). Truncations of the c-terminal cytoplasmatic domain of MG160, a medial Golgi sialoprotein, result in its partial transport to the plasma membrane and filopodia. *J.Cell Sci.* *111*, 249-260.
- Gonatas, J.O., Mezitis, S.G., Stieber, A., Fleischer, B., and Gonatas, N.K. (1989). MG-160. A novel sialoglycoprotein of the medial cisternae of the Golgi apparatus. *J.Biol.Chem.* *264*, 646-653.
- Goodman, G.E., Hellstrom, I., Brodzinsky, L., Nicaise, C., Kulander, B., Hummel, D., and Hellstrom, K.E. (1990). Phase I trial of murine monoclonal antibody L6 in breast, colon, ovarian, and lung cancer. *J Clin Oncol* *8*, 1083-1092.
- Gorter, A., Blok, V.T., Haasnoot, W.H., Ensink, N.G., Daha, M.R., and Fleuren, G.J. (1996). Expression of CD46, CD55, and CD59 on renal tumor cell lines and their role in preventing complement-mediated tumor cell lysis. *Lab.Invest.* *74*, 1039-1049.
- Green, L.L. (1999). 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* *231*, 11-23.
- Griesinger, F., Trumper, L., and Becker, W. (2001). [Radioimmunoconjugates: therapy of non-Hodgkin lymphomas and colorectal carcinomas]. *Internist (Berl)* *42*, 860-4, 866-873.
- Griffiths, A.D. and Duncan, A.R. (1998). Strategies for selection of antibodies by phage display. *Curr Opin Biotechnol* *9*, 102-108.
- Grillo-Lopez, A.J., White, C.A., Dallaire, B.K., Varns, C.L., Shen, C.D., Wei, A., Leonard, J.E., McClure, A., Weaver, R., Cairelli, S., and Rosenberg, J. (2000). Rituximab: the first monoclonal antibody approved for the treatment of lymphoma. *Curr Pharm Biotechnol* *1*, 1-9.
- Gu, H., Forster, I., and Rajewsky, K. (1990). Sequence homologies, N sequence insertion and JH gene utilization in VHDJH joining: implications for the joining mechanism and the ontogenetic timing of Ly1 B cell and B-CLL progenitor generation. *EMBO J* *9*, 2133-2140.
- Gura, T. (2002). Therapeutic antibodies: magic bullets hit the target. *Nature* *417*, 584-586.
- Haggitt, R.C. (1994). Barrett's esophagus, dysplasia, and adenocarcinoma. *Hum Pathol* *25*, 982-993.
- Hamilton, A.M., Lehuen, A., and Kearney, J.F. (1994). Immunofluorescence analysis of B-1 cell ontogeny in the mouse. *Int Immunol* *6*, 355-361.
- Hale, G., Dyer, M.J., Clark, M.R., Phillips, J.M., Marcus, R., Riechmann, L., Winter, G., and Waldmann, H. (1988). Remission induction in non-Hodgkin lymphoma with reshaped human monoclonal antibody CAMPATH-1H. *Lancet* *2*, 1394-1399.
- Hale, G., Xia, M.Q., Tighe, H.P., Dyer, M.J., and Waldmann, H. (1990). The CAMPATH-1 antigen (CDw52). *Tissue Antigens* *35*, 118-127.
- Hall, S.S. (1995). Monoclonal antibodies at age 20: promise at last? *Science* *270*, 915-916.
- Hanisch, F.G., Stadie, T.R., Deutzmann, F., and Peter Katalinic, J. (1996). MUC1 glycoforms in breast cancer-cell line T47D as a model for carcinoma-associated alterations of O-glycosylation. *Eur.J.Biochem.* *236*, 318-327.
- Hardy, R.R. (1992). Variable gene usage, physiology and development of Ly-1+ (CD5+) B cells. *Curr Opin Immunol* *4*, 181-185.
- Hardy, R.R. and Hayakawa, K. (1994). CD5 B cells, a fetal B cell lineage. *Adv Immunol* *55*, 297-339.
- Hashimoto, C., Hudson, K.L., and Anderson, K.V. (1988). The Toll gene of *Drosophila*, required for dorsal-ventral embryonic polarity, appears to encode a transmembrane protein. *Cell* *52*, 269-279.

- Haughton, G., Arnold, L.W., Whitmore, A.C., and Clarke, S.H. (1993). B-1 cells are made, not born. *Immunol.Today* 14, 84-87.
- Hayakawa, K. and Hardy, R.R. (2000). Development and function of B-1 cells. *Curr Opin Immunol* 12, 346-353.
- Hayakawa, K., Hardy, R.R., Herzenberg, L.A., and Herzenberg, L.A. (1985). Progenitors for Ly-1 B cells are distinct from progenitors for other B cells. *J Exp Med* 161, 1554-1568.
- Hayakawa, K., Hardy, R.R., Parks, D.R., and Herzenberg, L.A. (1983). The "Ly-1 B" cell subpopulation in normal immunodeficient, and autoimmune mice. *J Exp Med* 157, 202-218.
- Held-Warmkessel, J. (1998). Colon cancer. Prevention and detection strategies. *Adv Nurse Pract* 6, 42-45.
- Henderikx, P., Kandilogiannaki, M., Petrarca, C., von Mensdorff-Pouilly, S., Hilgers, J.H., Krambovitis, E., Arends, J.W., and Hoogenboom, H.R. (1998). Human single-chain Fv antibodies to MUC1 core peptide selected from phage display libraries recognize unique epitopes and predominantly bind adenocarcinoma. *Cancer Res* 58, 4324-4332.
- Hennemann, B., Beckmann, G., Eichelmann, A., Rehm, A., and Andreesen, R. (1998). Phase I trial of adoptive immunotherapy of cancer patients using monocyte-derived macrophages activated with interferon gamma and lipopolysaccharide. *Cancer Immunol Immunother* 45, 250-256.
- Hensel, F., Brandlein, S., Eck, M., Schmidt, K., Krenn, V., Kloetzer, A., Bachi, A., Mann, M., Müller-Hermelink, H.K., and Vollmers, H.P. (2001a). A novel proliferation-associated variant of CFR-1 defined by a human monoclonal antibody. *Lab Invest* 81, 1097-1108.
- Hensel, F., Hermann, R., Brandlein, S., Krenn, V., Schmausser, B., Geis, S., Müller-Hermelink, H.K., and Vollmers, H.P. (2001b). Regulation of the New Coexpressed CD55 (Decay-Accelerating Factor) Receptor on Stomach Carcinoma Cells Involved in Antibody SC-1-Induced Apoptosis. *Lab Invest* 81, 1553-1563.
- Hensel, F., Hermann, R., Schubert, C., Abé, N., Schmidt, K., Franke, A., Shevchenko, A., Mann, M., Müller-Hermelink, H.K., and Vollmers, H.P. (1999a). Characterisation of glycosylphosphatidylinositol-linked molecule CD55/Decay-accelerating factor as the receptor for antibody SC-1-induced apoptosis. *Cancer Res.* 59, 5299-5306.
- Hensel, F., Knörr, C., Hermann, R., Krenn, V., Müller-Hermelink, H.K., and Vollmers, H.P. (1999b). Mitogenic autoantibodies in *Helicobacter pylori*-associated stomach cancerogenesis. *Int.J.Cancer* 81, 229-235.
- Hermann, R., Hensel, F., Müller, E.C., Keppler, M., Souto-Carneiro, M., Brandlein, S., Müller-Hermelink, H.K., and Vollmers, H.P. (2001). Deactivation of regulatory proteins hnRNP A1 and A2 during SC-1 induced apoptosis. *Hum Antibodies* 10, 83-90.
- Hertler, A.A. and Frankel, A.E. (1989). Immunotoxins: a clinical review of their use in the treatment of malignancies. *J Clin Oncol* 7, 1932-1942.
- Herzenberg, L.A. (2000). B-1 cells: the lineage question revisited. *Immunol Rev* 175, 9-22.
- Ho, S.B., Shekels, L.L., Toribara, N.W., Kim, Y.S., Lyftogt, C., Cherwitz, D.L., and Niehans, G.A. (1995). Mucin gene expression in normal, preneoplastic, and neoplastic human gastric epithelium. *Cancer Res* 55, 2681-2690.
- Hoffmann, J.A. and Reichhart, J.M. (2002). *Drosophila* innate immunity: an evolutionary perspective. *Nat Immunol* 3, 121-126.
- Horton, R.M., Hunt, H.D., Ho, S.N., Pullen, J.K., and Pease, L.R. (1989). Engineering hybrid genes without the use of restriction enzymes: gene splicing by overlap extension. *Gene* 77, 61-68.

- Horton, K.M., Abrams, R.A., and Fishman, E.K. (2000). Spiral CT of colon cancer: imaging features and role in management. *Radiographics* 20, 419-430.
- Houghton, A.N. and Scheinberg, D.A. (2000). Monoclonal antibody therapies-a 'constant' threat to cancer. *Nat Med* 6, 373-374.
- Huang, D.F., Olee, T., Masuho, Y., Matsumoto, Y., Carson, D.A., and Chen, P.P. (1992). 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.* 90, 2197-2208.
- Ishida, H., Hastings, R., Kearney, J., and Howard, M. (1992). Continuous anti-interleukin 10 antibody administration depletes mice of Ly-1 B cells but not conventional B cells. *J Exp Med* 175, 1213-1220.
- James, K. and Bell, G.T. (1987). Human monoclonal antibody production: Current status and future prospects. *J.Immunol.Methods* 100, 5-40.
- Janeway, C.A. Jr (1989). Approaching the asymptote? Evolution and revolution in immunology. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 54 Pt 1, 1-13.
- Janeway, C.A. Jr and Medzhitov, R. (2002). Innate immune recognition. *Annu Rev Immunol* 20, 197-216.
- Jost, M., Kari, C., and Rodeck, U. (2000). The EGF receptor - an essential regulator of multiple epidermal functions. *Eur J Dermatol* 10, 505-510.
- Kallioniemi, O.P., Holli, K., Visakorpi, T., Koivula, T., Helin, H.H., and Isola, J.J. (1991). Association of c-erbB-2 protein over-expression with high rate of cell proliferation, increased risk of visceral metastasis and poor long-term survival in breast cancer. *Int J Cancer* 49, 650-655.
- Kan-Mitchell, J., Imam, A., Kempf, R.A., Taylor, C.R., and Mitchell, M.S. (1986). Human monoclonal antibodies directed against melanoma tumor-associated antigens. *Cancer Res* 46, 2490-2496.
- Kaptain, S., Tan, L.K., and Chen, B. (2001). Her-2/neu and breast cancer. *Diagn Mol Pathol* 10, 139-152.
- Karlsson, F.A., Burman, L., Löf, L., and Mardh, S. (1988). Major parietal cell antigen in autoimmune gastritis with pernicious anaemia is the acid-producing H⁺/K⁺-adenosine triphosphatase of the stomach. *J.Clin.Invest.* 81, 475-479.
- Kay, M.A., Liu, D., and Hoogerbrugge, P.M. (1997). Gene therapy. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94, 12744-12746.
- Kerkhoff, E. and Rapp, U.R. (2001). The Ras-Raf relationship: an unfinished puzzle. *Adv Enzyme Regul* 41, 261-267.
- Kerr, J.F., Wyllie, A.H., and Currie, A.R. (1972). Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br.J.Cancer* 26, 239-257.
- Kimbrell, D.A. and Beutler, B. (2001). The evolution and genetics of innate immunity. *Nat Rev Genet* 2, 256-267.
- Kipps, T.J. (1989). The CD5 B cell. *Adv Immunol* 47, 117-185.
- Kirkwood, J.M., Mascari, R.A., Edington, H.D., Rabkin, M.S., Day, R.S., Whiteside, T.L., Vlock, D.R., and Shipe-Spotloe, J.M. (2000). Analysis of therapeutic and immunologic effects of R(24) anti-GD3 monoclonal antibody in 37 patients with metastatic melanoma. *Cancer* 88, 2693-2702.
- Kirschbaum, M.H. and Yarden, Y. (2000). The ErbB/HER family of receptor tyrosine kinases: A potential target for chemoprevention of epithelial neoplasms. *J Cell Biochem Suppl* 34, 52-60.
- Klinman, D.M. and Holmes, K.L. (1990). Differences in the repertoire expressed by peritoneal and splenic Ly-1 (CD5)+ B cells. *J Immunol* 144, 4520-4525.

- Kohler, G. and Milstein, C. (1975). Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature* 256, 495-497.
- Kong, Y., Li, R., and Ladisch, S. (1998). Natural forms of shed tumor gangliosides. *Biochim Biophys Acta* 1394, 43-56.
- Krieg, A.M. (1996). An innate immune defense mechanism based on the recognition of CpG motifs in microbial DNA. *J Lab Clin Med* 128, 128-133.
- Kroese, F.G., Ammerlaan, W.A., and Kantor, A.B. (1993). Evidence that intestinal IgA plasma cells in mu, kappa transgenic mice are derived from B-1 (Ly-1 B) cells. *Int Immunol* 5, 1317-1327.
- Kronenberg, M. and Gapin, L. (2002). The unconventional lifestyle of NKT cells. *Nat Rev Immunol* 2, 557-568.
- Kronborg, O. (2002). Colon polyps and cancer. *Endoscopy* 34, 69-72.
- Küppers, R., Zhao, M., Rajewsky, K., and Hansmann, M.L. (1993). Detection of clonal B cell populations in paraffin-embedded tissues by polymerase chain reaction. *Am.J.Pathol.* 143, 230-239.
- Kuppen, P.J., Gorter, A., Hagens, M., Jonges, L.E., Giezeman-Smits, K.M., Nagelkerke, J.F., Fleuren, G., and van de Velde, C.J. (2001). Role of NK cells in adoptive immunotherapy of metastatic colorectal cancer in a syngeneic rat model. *Immunol Rev* 184, 236-243.
- Kugler, A., Stuhler, G., Walden, P., Zoller, G., Zobywalski, A., Brossart, P., Trefzer, U., Ullrich, S., Müller, C.A., Becker, V., Gross, A.J., Hemmerlein, B., Kanz, L., Müller, G.A., and Ringert, R.H. (2000). Regression of human metastatic renal cell carcinoma after vaccination with tumor cell-dendritic cell hybrids. *Nat Med* 6, 332-326.
- Kuraya, M. and Fujita, T. (1998). Signal transduction via a protein associated with a glycosylphosphatidylinositol-anchored protein, decay-accelerating factor (DAF/CD55). *Int Immunol* 10, 473-480.
- Kuttner-Kondo, L., Medof, M.E., Brodbeck, W., and Shoham, M. (1996). Molecular modeling and mechanism of action of human decay-accelerating factor. *Protein Eng.* 9, 1143-1149.
- Laemmli, U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of the bacteriophage T4. *nature* 227, 680-685.
- Lalor, P.A., Stall, A.M., Adams, S., and Herzenberg, L.A. (1989). Permanent alteration of the murine Ly-1 B repertoire due to selective depletion of Ly-1 B cells in neonatal animals. *Eur J Immunol* 19, 501-506.
- Lam, K.P. and Rajewsky, K. (1999). B cell antigen receptor specificity and surface density together determine B-1 versus B-2 cell development. *J Exp Med* 190, 471-477.
- Lamers, C.H., Gratama, J.W., Warnaar, S.O., Stoter, G., and Bolhuis, R.L. (1995). Inhibition of bispecific monoclonal antibody (bsAb)-targeted cytotoxicity by human anti-mouse antibodies in ovarian carcinoma patients treated with bsAb-targeted activated T-lymphocytes. *Int J Cancer* 60, 450-457.
- Larrick, J.W. and Bourla, J.M. (1986). Prospects for the therapeutic use of human monoclonal antibodies. *J Biol Response Mod* 5, 379-393.
- Leithauser, F., Dhein, J., Mechtersheimer, G., Koretz, K., Bruderlein, S., Henne, C., Schmidt, A., Debatin, K.M., Krammer, P.H., and Moller, P. (1993). Constitutive and induced expression of APO-1, a new member of the nerve growth factor/tumor necrosis factor receptor superfamily, in normal and neoplastic cells. *Lab Invest* 69, 415-29.
- Lewis, S.M. (1994). The mechanism of V(D)J joining: lessons from molecular, immunological, and comparative analyses. *Adv Immunol* 56, 27-150.

- Litman, G.W., Rast, J.P., Shablott, M.J., Haire, R.N., Hulst, M., Roess, W., Litman, R.T., Hinds-Frey, K.R., Zilch, A., and Amemiya, C.T. (1993). Phylogenetic diversification of immunoglobulin genes and the antibody repertoire. *Mol Biol Evol* 10, 60-72.
- Little, M., Welschof, M., Braunagel, M., Hermes, I., Christ, C., Keller, A., Rohrbach, P., Kurschner, T., Schmidt, S., Kleist, C., and Terness, P. (1999). Generation of a large complex antibody library from multiple donors. *J Immunol Methods* 231, 3-9.
- Littlefield, J.W. (1966). The use of drug-resistant markers to study the hybridization of mouse fibroblasts. *Exp Cell Res* 41, 190-196.
- Littlefield, J. (1964). Selection of hybrids from matings of fibroblasts in vitro and their presumed recombinants. *Science* 145, 709-711.(Abstract)
- Litvinov, S.V., Velders, M.P., Bakker, H.A., Fleuren, G.J., and Warnaar, S.O. (1994). Ep-CAM: a human epithelial antigen is a homophilic cell-cell adhesion molecule. *J Cell Biol* 125, 437-446.
- Livingston, P. (1998). Ganglioside vaccines with emphasis on GM2. *Semin Oncol* 25, 636-645.
- Lo-Man, R., Vichier-Guerre, S., Bay, S., Deriaud, E., Cantacuzene, D., and Leclerc, C. (2001). Anti-tumor immunity provided by a synthetic multiple antigenic glycopeptide displaying a tri-Tn glycotope. *J Immunol* 166, 2849-2854.
- LoBuglio, A.F., Wheeler, R.H., Trang, J., Haynes, A., Rogers, K., Harvey, E.B., Sun, L., Ghrayeb, J., and Khazaeli, M.B. (1989). Mouse/human chimeric monoclonal antibody in man: kinetics and immune response. *Proc Natl Acad Sci U S A* 86, 4220-4224.
- Lode, H.N. and Reisfeld, R.A. (2000). Targeted cytokines for cancer immunotherapy. *Immunol Res* 21, 279-288.
- Lowy, D.R., Kirnbauer, R., and Schiller, J.T. (1994). Genital human papillomavirus infection. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91, 2436-2440.
- Ma, J.Y., Borch, K., and Mardh, S. (1990). Human gastric H,K-adenosine triphosphatase β -subunit is a major autoantigen in the atrophic corpus gastritis. Expression of the recombinant human glycoprotein in insect cells. *Scand.J.Gastroenterol.* 29, 790-794.
- Maeurer, M.J., Storkus, W.J., Kirkwood, J.M., and Lotze, M.T. (1996). New treatment options for patients with melanoma: review of melanoma-derived T-cell epitope-based peptide vaccines. *Melanoma Res* 6, 11-24.
- Magor, B.G. and Magor, K.E. (2001). Evolution of effectors and receptors of innate immunity. *Dev Comp Immunol* 25, 651-682.
- Maloney, D.G. (1999). Antibody therapy has arrived. Now where does it fit? *Ann Oncol* 10, 619-621.
- Maloney, D.G., Grillo-Lopez, A.J., Bodkin, D.J., White, C.A., Liles, T.M., Royston, I., Varns, C., Rosenberg, J., and Levy, R. (1997). IDEC-C2B8: results of a phase I multiple-dose trial in patients with relapsed non-Hodgkin's lymphoma. *J Clin Oncol* 15, 3266-3274.
- Mantovani, L., Wilder, R.L., and Casali, P. (1993). Human rheumatoid B-1a (CD5+ B) cells make somatically hypermutated high affinity IgM rheumatoid factors. *J Immunol* 151, 473-488.
- Mao, S., Gao, C., Lo, C.H., Wirsching, P., Wong, C.H., and Janda, K.D. (1999). Phage-display library selection of high-affinity human single-chain antibodies to tumor-associated carbohydrate antigens sialyl Lewisx and Lewisx. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 6953-6958.
- Markham, A. and Lamb, H.M. (2000). Infliximab: a review of its use in the management of rheumatoid arthritis. *Drugs* 59, 1341-1359.

- Marks, J.D., Hoogenboom, H.R., Bonnert, T.P., McCafferty, J., Griffiths, A.D., and Winter, G. (1991). Bypassing Immunisation. *J.Mol.Biol.* 222, 581-597.
- Martin, F. and Kearney, J.F. (2001). B1 cells: similarities and differences with other B cell subsets. *Curr Opin Immunol* 13, 195-201.
- Matsuda, F., Ishii, K., Bourvagnet, P., Kuma, K., Hayashida, H., Miyata, T., and Honjo, T. (1998). The complete nucleotide sequence of the human immunoglobulin heavy chain variable region locus. *J Exp Med* 188, 2151-2162.
- Matzku, S. (1996). Monoclonal antibodies in tumor therapy. *Recent Results Cancer Res* 141, 1-8.
- McCafferty, J., Griffiths, A.D., Winter, G., and Chiswell, D.J. (1990). Phage antibodies: filamentous phage displaying antibody variable domains. *Nature* 348, 552-554.
- McKeage, K. and Perry, C.M. (2002). Trastuzumab: a review of its use in the treatment of metastatic breast cancer overexpressing HER2. *Drugs* 62, 209-243.
- McLaughlin, P., White, C.A., Grillo-Lopez, A.J., and Maloney, D.G. (1998). Clinical status and optimal use of rituximab for B-cell lymphomas. *Oncology (Huntingt)* 12, 1763-9; discussion 1769-70, 1775-1777.
- McMahon, M. and Woods, D. (2001). Regulation of the p53 pathway by Ras, the plot thickens. *Biochim Biophys Acta* 1471, 63-71.
- McNeil, C. (1995). Monoclonal antibodies progress to the next generation. *J Natl Cancer Inst* 87, 1738-1739.
- Means, T.K., Golenbock, D.T., and Fenton, M.J. (2000). The biology of Toll-like receptors. *Cytokine Growth Factor Rev* 11, 219-232.
- Medzhitov, R. (2001). Toll-like receptors and innate immunity. *Nature Rev Immunol* 1, 135-145.
- Medzhitov, R. and Janeway, C.A. Jr (1997). Innate immunity: impact on the adaptive immune response. *Curr Opin Immunol* 9, 4-9.
- Medzhitov, R. and Janeway, C. Jr (2000). The Toll receptor family and microbial recognition. *Trends Microbiol* 8, 452-456.
- Medzhitov, R., Preston-Hurlburt, P., and Janeway, C.A. Jr (1997). A human homologue of the Drosophila Toll protein signals activation of adaptive immunity. *Nature* 388, 394-397.
- Mendelsohn, J. (1997). Epidermal growth factor receptor inhibition by a monoclonal antibody as anticancer therapy. *Clin Cancer Res* 3, 2703-2707.
- Mendelsohn, J. and Baselga, J. (2000). The EGF receptor family as targets for cancer therapy. *Oncogene* 19, 6550-6565.
- Mezger, J., Locherbach, U., Hagenhoff, B., Funken, O., Gallkowski, U., Hahn, C., Pfeifer, U., and Sauerbruch, T. (1997). [Symptoms, tumor stage and primary treatment in patients with colorectal carcinoma]. *Dtsch Med Wochenschr* 122, 703-708.
- Mitooka, H. (2000). Flat neoplasms in the adenoma-carcinoma sequence in Japan. *Semin Gastrointest Dis* 11, 238-247.
- Mizejewski, G.J. (2001). Alpha-fetoprotein structure and function: relevance to isoforms, epitopes, and conformational variants. *Exp Biol Med (Maywood)* 226, 377-408.
- Mizuno, N., Kato, Y., Izumi, Y., Irimura, T., and Sugiyama, Y. (1998). Importance of hepatic first-pass removal in metastasis of colon carcinoma cells. *J Hepatol* 28, 865-877.

- Moller, G. (1999). Receptors for innate pathogen defence in insects are normal activation receptors for specific immune responses in mammals. *Scand J Immunol* 50, 341-347.
- Moretta, L., Biassoni, R., Bottino, C., Mingari, M.C., and Moretta, A. (2002a). Natural killer cells: a mystery no more. *Scand J Immunol* 55, 229-232.
- Moretta, L., Bottino, C., Pende, D., Mingari, M.C., Biassoni, R., and Moretta, A. (2002b). Human natural killer cells: their origin, receptors and function. *Eur J Immunol* 32, 1205-1211.
- Mosmann, T. (1983). Rapid calorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxic assays. *J.Immunol.Methods* 65, 55-63.
- Mulcahy, M.F. and Benson, A.B. 3rd (1999). The role of carcinoembryonic antigen monitoring in management of colorectal cancer. *Curr Oncol Rep* 1, 168-172.
- Muthuswamy, S.K., Li, D., Lelievre, S., Bissell, M.J., and Brugge, J.S. (2001). ErbB2, but not ErbB1, reinitiates proliferation and induces luminal repopulation in epithelial acini. *Nat Cell Biol* 3, 785-792.
- Muzio, M., Bosisio, D., Polentarutti, N., D'amico, G., Stoppacciaro, A., Mancinelli, R., van't Veer, C., Penton-Rol, G., Ruco, L.P., Allavena, P., and Mantovani, A. (2000). Differential expression and regulation of toll-like receptors (TLR) in human leukocytes: selective expression of TLR3 in dendritic cells. *J Immunol* 164, 5998-6004.
- Neuberger, M. and Bruggemann, M. (1997). Monoclonal antibodies. Mice perform a human repertoire. *Nature* 386, 25-26.
- Newkirk, M.M. and Rioux, J.D. (1995). Immunoglobulin gene usage in the human anti-pathogen response. *Infect.Agents.Dis.* 4, 153-160.
- Niehans, G.A., Cherwitz, D.L., Staley, N.A., Knapp, D.J., and Dalmasso, A.P. (1996). Human carcinomas variably express the complement inhibitory proteins CD46 (membrane cofactor protein), CD55 (decay-accelerating factor), and CD59 (protectin). *Am.J.Pathol.* 149, 129-142.
- Nezlin, R. (2001). Combinatorial events in generation of antibody diversity. *Comb Chem High Throughput Screen* 4, 377-383.
- Ogasawara, J., Watanabe-Fukunaga, R., Adachi, M., Matsuzawa, A., Kasugai, T., Kitamura, Y., Itoh, N., Suda, T., and Nagata, S. (1993). Lethal effect of the anti-Fas antibody in mice. *Nature* 364, 806-809.
- Ogata, H., Su, I., Miyake, K., Nagai, Y., Akashi, S., Mecklenbrauker, I., Rajewsky, K., Kimoto, M., and Tarakhovskiy, A. (2000). The toll-like receptor protein RP105 regulates lipopolysaccharide signaling in B cells. *J Exp Med* 192, 23-29.
- Okabe, S., Arai, T., Maruyama, S., Murase, N., Tsubaki, M., and Endo, M. (1998). A clinicopathological investigation on superficial early invasive carcinomas of the colon and rectum. *Surg Today* 28, 687-695.
- Olayioye, M.A., Neve, R.M., Lane, H.A., and Hynes, N.E. (2000). The ErbB signaling network: receptor heterodimerization in development and cancer. *EMBO J* 19, 3159-3167.
- Olsson, L. and Kaplan, H.S. (1980). Human-human hybridomas producing monoclonal antibodies of predefined antigenic specificity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 77, 5429-5431.
- Papavasiliou, F., Jankovic, M., Gong, S., and Nussenzweig, M.C. (1997). Control of immunoglobulin gene rearrangements in developing B cells. *Curr Opin Immunol* 9, 233-238.
- Pardoll, D.M. (2000). Therapeutic vaccination for cancer. *Clin Immunol* 95, 44-62.
- Parkin, J. and Cohen, B. (2001). An overview of the immune system. *Lancet* 357, 1777-1789.

- Parkin, D.M., Pisani, P., and Ferlay, J. (1999). Global cancer statistics. *CA Cancer J Clin* 49, 33-64.
- Parolini, I., Sargiacomo, M., Lisanti, M.P., and Peschle, C. (1996). Signal transduction and glycosphosphatidylinositol-linked proteins (lyn, lck, CD4, CD45, G proteins, and CD55) selectively localize in Triton-insoluble plasma membrane domains of human leukemic cell lines and normal granulocytes. *Blood* 87, 3783-3794.
- Paunesku, T., Mittal, S., Protic, M., Oryhon, J., Korolev, S.V., Joachimiak, A., and Woloschak, G.E. (2001). Proliferating cell nuclear antigen (PCNA): ringmaster of the genome. *Int J Radiat Biol* 77, 1007-1021.
- Pennell, C.A., Arnold, L.W., Haughton, G., and Clarke, S.H. (1988). Restricted Ig variable region gene expression among Ly-1+ B cell lymphomas. *J Immunol* 141, 2788-2796.
- Pfaff, M., O'Connor, R., Vollmers, H.P., and Muller-Hermelink, H.K. (1990). Human monoclonal antibody against a tissue polypeptide antigen-related protein from a patient with a signet-ring cell carcinoma of the stomach. *Cancer Res* 50, 5192-5198.
- Pierce, J.H., Arnstein, P., DiMarco, E., Artrip, J., Kraus, M.H., Lonardo, F., Di Fiore, P.P., and Aaronson, S.A. (1991). Oncogenic potential of erbB-2 in human mammary epithelial cells. *Oncogene* 6, 1189-1194.
- Plummer, M., Buiatti, E., Lopez, G., Peraza, S., Vivas, J., Oliver, W., and Munoz, N. (1997). Histological diagnosis of precancerous lesions of the stomach: a reliability study. *Int J Epidemiol* 26, 716-720.
- Qin, X.F., Schwers, S., Yu, W., Papavasiliou, F., Suh, H., Nussenzweig, A., Rajewsky, K., and Nussenzweig, M.C. (1999). Secondary V(D)J recombination in B-1 cells. *Nature* 397, 355-359.
- Rensing-Ehl, A., Frei, K., Flury, R., Matiba, B., Mariani, S.M., Weller, M., Aebischer, P., Krammer, P.H., and Fontana, A. (1995). Local Fas/APO-1 (CD95) ligand-mediated tumor cell killing in vivo. *Eur J Immunol* 25, 2253-2258.
- Reynolds, J.C., Del Vecchio, S., Sakahara, H., Lora, M.E., Carrasquillo, J.A., Neumann, R.D., and Larson, S.M. (1989). Anti-murine antibody response to mouse monoclonal antibodies: clinical findings and implications. *Int J Rad Appl Instrum B* 16, 121-125.
- Riede, U.K., and Schaefer, H.E. (Herausgeber) (1995). *Allgemeine und spezielle Pathologie*, 4., aktualisierte Auflage, Stuttgart, New York: Thieme Verlag.
- Riethdorf, L., Park, T.W., and Thomssen, C. (1999). [Diagnosis and therapy of cervical squamous epithelial carcinomas]. *Pathologie* 20, 42-49.
- Riethmuller, G., Holz, E., Schlimok, G., Schmiegel, W., Raab, R., Hoffken, K., Gruber, R., Funke, I., Pichlmaier, H., Hirche, H., Buggisch, P., Witte, J., and Pichlmayr, R. (1998). Monoclonal antibody therapy for resected Dukes' C colorectal cancer: seven-year outcome of a multicenter randomized trial. *J Clin Oncol* 16, 1788-1794.
- Riley, J.K. and Sliwkowski, M.X. (2000). CD20: a gene in search of a function. *Semin Oncol* 27, 17-24.
- Rinkevich, B. (1999). Invertebrates versus vertebrates innate immunity: In the light of evolution. *Scand J Immunol* 50, 456-460.
- Roth, J.A. and Cristiano, R.J. (1997). Gene therapy for cancer: what have we done and where are we going? *J Natl Cancer Inst* 89, 21-39.
- Rothenberg, E.V. (2000). Stepwise specification of lymphocyte developmental lineages. *Curr Opin Genet Dev* 10, 370-9.
- Rothstein, T.L. (2002). Cutting edge commentary: two B-1 or not to be one. *J Immunol* 168, 4257-4261.

- Rott, O. and Cash, E. (1994). Influenza virus hemagglutinin induces differentiation of mature resting B cells and growth arrest of immature WEHI-231 lymphoma cells. *J Immunol* 152, 5381-5391.
- Rowan, W., Tite, J., Topley, P., and Brett, S.J. (1998). Cross-linking of the CAMPATH-1 antigen (CD52) mediates growth inhibition in human B- and T-lymphoma cell lines, and subsequent emergence of CD52-deficient cells. *Immunology* 95, 427-436.
- Sadanaga, N., Nagashima, H., Mashino, K., Tahara, K., Yamaguchi, H., Ohta, M., Fujie, T., Tanaka, F., Inoue, H., Takesako, K., Akiyoshi, T., and Mori, M. (2001). Dendritic cell vaccination with MAGE peptide is a novel therapeutic approach for gastrointestinal carcinomas. *Clin Cancer Res* 7, 2277-2284.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F., and Maniatis, T. (1989). *Molecular cloning: a laboratory manual* (Cold Spring Harbor, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press).
- Sarup, J.C., Johnson, R.M., King, K.L., Fendly, B.M., Lipari, M.T., Napier, M.A., Ullrich, A., and Shepard, H.M. (1991). Characterization of an anti-p185HER2 monoclonal antibody that stimulates receptor function and inhibits tumor cell growth. *Growth Regul* 1, 72-82.
- Schatz, D.G., Oettinger, M.A., and Schlissel, M.S. (1992). V(D)J recombination: molecular biology and regulation. *Annu Rev Immunol* 10, 359-383.
- Scheiden, R., Sand, J., Pandin, M., Wagener, Y., and Capesius, C. (2000). Colorectal high-grade adenomas: incidence, localization and adenoma-adenocarcinoma ratio in a retrospective and comparative population-based study of 225 consecutive cases between 1988 and 1996. *Int J Colorectal Dis* 15, 29-34.
- Schier, R., Marks, J.D., Wolf, E.J., Apell, G., Wong, C., McCartney, J.E., Bookman, M.A., Huston, J.S., Houston, L.L., Weiner, L.M., and et, a.l. (1995). In vitro and in vivo characterization of a human anti-c-erbB-2 single-chain Fv isolated from a filamentous phage antibody library. *Immunotechnology* 1, 73-81.
- Schlom, J., Wunderlich, D., and Teramoto, Y.A. (1980). Generation of human monoclonal antibodies reactive with human mammary carcinoma cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 77, 6841-6845.
- Scholzen, T. and Gerdes, J. (2000). The Ki-67 protein: from the known and the unknown. *J Cell Physiol* 182, 311-22.
- Shak, S. (1999). Overview of the trastuzumab (Herceptin) anti-HER2 monoclonal antibody clinical program in HER2-overexpressing metastatic breast cancer. Herceptin Multinational Investigator Study Group. *Semin Oncol* 26, 71-77.
- Shan, D., Ledbetter, J.A., and Press, O.W. (1998). Apoptosis of malignant human B cells by ligation of CD20 with monoclonal antibodies. *Blood* 91, 1644-1652.
- Shinoura, N., Heffelfinger, S.C., Miller, M., Shamraj, O.I., Miura, N.H., Larson, J.J., DeTribolet, N., Warnick, R.E., Tew, J.J., and Menon, A.G. (1994). RNA expression of complement regulatory proteins in human brain tumors. *Cancer Lett* 86, 143-149.
- Shlomchik, M.J., Marshak-Rothstein, A., Wolfowicz, C.B., Rothstein, T.L., and Weigert, M.G. (1987). The role of clonal selection and somatic mutation in autoimmunity. *Nature* 328, 805-811.
- Sidman, C.L., Shultz, L.D., Hardy, R.R., Hayakawa, K., and Herzenberg, L.A. (1986). Production of immunoglobulin isotypes by Ly-1+ B cells in viable motheaten and normal mice. *Science* 232, 1423-1425.
- Sikora, K. (1984). The characterisation of gliomas using human monoclonal antibodies. Minireview on cancer research. *Exp Cell Biol* 52, 189-195.

- Silverman, G.J. and Lucas, A.H. (1991). 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.* 88, 911-920.
- Silverman, G.J., Roben, P., Bouvet, J.P., and Sasano, M. (1995). Superantigen properties of a human sialoprotein involved in gut-associated immunity. *J.Clin.Invest.* 96, 417-426.
- Slamon, D.J., Leyland-Jones, B., Shak, S., Fuchs, H., Paton, V., Bajamonde, A., Fleming, T., Eiermann, W., Wolter, J., Pegram, M., Baselga, J., and Norton, L. (2001). Use of chemotherapy plus a monoclonal antibody against HER2 for metastatic breast cancer that overexpresses HER2. *N Engl J Med* 344, 783-792.
- Smith, G.P. (1985). Filamentous fusion phage: novel expression vectors that display cloned antigens on the virion surface. *Science* 228, 1315-1317.
- Smith, P.K., Krohn, R.I., Hermanson, G.T., Mallia, A.K., Gartner, F.H., Provenzano, M.D., Fujimoto, E.K., Goeke, N.M., Olson, B.J., and Klenk, D.C. (1985). Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal Biochem* 150, 76-85.
- Soloski, M.J. (2001). Recognition of tumor cells by the innate immune system. *Curr Opin Immunol* 13, 154-162.
- Spatz, L.A., Wong, K.K., Williams, M., Desai, R., Golier, J., Berman, J.E., Alt, F.W., and Latov, N. (1990). 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.* 144, 2821-2828.
- Spechler, S.J. (1996). Barrett's esophagus. *Semin Gastrointest Dis* 7, 51-60.
- Spechler, S.J. (2001). Screening and surveillance for complications related to gastroesophageal reflux disease. *Am J Med* 111 Suppl 8A, 130-136.
- Steedmaier, M., Borges, E., Berger, J., Schwarz, H., and Vestweber, D. (1997). The E-selectin-ligand ESL-1 is located in the Golgi as well as on microvilli on the cell surface. *J.Cell Sci.* 110, 687-694.
- Steedmaier, M., Levinovitz, A., Isenmann, S., Borges, E., Lentner, M., Kocher, H.P., Kleuser, B., and Vestweber, D. (1995). The E-selectin-ligand ESL-1 is a variant of a receptor for fibroblast growth factor. *nature* 373, 615-620.
- Steinitz, M., Klein, G., Koskimies, S., and Makel, O. (1977). EB virus-induced B lymphocyte cell lines producing specific antibody. *Nature* 269, 420-422.
- Stieber, A., Mourelatos, Z., Chen, Y.J., Le Douarin, N., and Gonatas, N.K. (1995). 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.* 219, 562-570.
- Su, I. and Tarakhovsky, A. (2000). B-1 cells: orthodox or conformist? *Curr Opin Immunol* 12, 191-194.
- Suda, T. and Nagata, S. (1994). Purification and characterization of the Fas-ligand that induces apoptosis. *J.Exp.Med.* 179, 873-879.
- Tiwari, R.K., Borgen, P.I., Wong, G.Y., Cordon-Cardo, C., and Osborne, M.P. (1992). HER-2/neu amplification and overexpression in primary human breast cancer is associated with early metastasis. *Anticancer Res* 12, 419-425.
- Tjandra, J.J., Ramadi, L., and McKenzie, I.F. (1990). Development of human anti-murine antibody (HAMA) response in patients. *Immunol Cell Biol* 68 (Pt 6), 367-376.

- Toh, B.H., Gleeson, P.A., Simpson, R.J., Moritz, R.L., Callaghan, J.M., Goldkorn, I., Jones, C.M., Martinelli, T.M., Mu, F.T., Humphris, D.C., Pettitt, J.M., Mori, Y., Masuda, T., Sobieszczuk, P., Weinstock, J., Mantamadiotis, T., and Baldwin, G.S. (1990). The 60- to 90-kDa parietal cell autoantigen associated with autoimmune gastritis is a beta subunit of the gastric H⁺/K⁺- ATPase (proton pump). *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 87, 6418-6422.
- Tomizuka, K., Shinohara, T., Yoshida, H., Uejima, H., Ohguma, A., Tanaka, S., Sato, K., Oshimura, M., and Ishida, I. (2000). Double trans-chromosomal 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* 97, 722-727.
- Towbin, H., Staehelin, T., and Gordon, J. (1979). Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci U S A* 76, 4350-4354.
- Trail, P.A. and Bianchi, A.B. (1999). Monoclonal antibody drug conjugates in the treatment of cancer. *Curr Opin Immunol* 11, 584-588.
- Trauth, B.C., Klas, C., Peters, A.M., Matzku, S., Moller, P., Falk, W., Debatin, K.M., and Krammer, P.H. (1989). Monoclonal antibody-mediated tumor regression by induction of apoptosis. *Science* 245, 301-305.
- Trefzer, U., Weingart, G., Chen, Y., Herberth, G., Adrian, K., Winter, H., Audring, H., Guo, Y., Sterry, W., and Walden, P. (2000). Hybrid cell vaccination for cancer immune therapy: first clinical trial with metastatic melanoma. *Int J Cancer* 85, 618-626.
- Turner, G.A. (1992). N-glycosylation of serum proteins in disease and its investigation using lectins. *Clin.Chim.Acta* 208, 149-171.
- Valerius, T., Stockmeyer, B., van Spriël, A.B., Graziano, R.F., van den Herik-Oudijk, I.E., Repp, R., Deo, Y.M., Lund, J., Kalden, J.R., Gramatzki, M., and van de Winkel, J.G. (1997). FcalphaRI (CD89) as a novel trigger molecule for bispecific antibody therapy. *Blood* 90, 4485-4492.
- Van den Eynde, B.J. and Boon, T. (1997). Tumor antigens recognized by T lymphocytes. *Int J Clin Lab Res* 27, 81-86.
- van Diest, P.J., Brugal, G., and Baak, J.P. (1998). Proliferation markers in tumours: interpretation and clinical value. *J Clin Pathol* 51, 716-724.
- van Oijen, M.G., Medema, R.H., Slootweg, P.J., and Rijksen, G. (1998). Positivity of the proliferation marker Ki-67 in noncycling cells. *Am J Clin Pathol* 110, 24-31.
- Vaughan, T.J., Osbourn, J.K., and Tempest, P.R. (1998). Human antibodies by design. *Nat Biotechnol* 16, 535-539.
- Velders, M.P., Schreiber, H., and Kast, W.M. (1998). Active immunization against cancer cells: impediments and advances. *Semin Oncol* 25, 697-706.
- Vile, R. (2000). Cancer gene therapy--new approaches to tumour cell killing. *J Gene Med* 2, 141-143.
- Virji, M. (2001). CEA and innate immunity. *Trends Microbiol* 9, 258-259.
- Vollmers, H.P., Dämmrich, J., Hensel, F., Ribbert, H., Meyer-Bahlburg, A., Ufken-Gaul, T., v.Korff, M., and Müller-Hermelink, H.K. (1997). Differential expression of apoptosis receptors on diffuse and intestinal type stomach carcinoma. *Cancer* 79, 433-440.
- Vollmers, H.P., Dämmrich, J., Ribbert, H., Grassel, S., Debus, S., Heesemann, J., and Müller-Hermelink, H.K. (1994). Human monoclonal antibodies from stomach carcinoma patients react with *Helicobacter pylori* and stimulate stomach cancer cells *in vitro*. *Cancer* 74, 1525-1532.

- Vollmers, H.P., Dämmrich, J., Ribbert, H., Wozniak, E., and Müller-Hermelink, H.K. (1995). Apoptosis of stomach carcinoma cells induced by a human monoclonal antibody. *Cancer* 76, 550-558.
- Vollmers, H.P., Hensel, F., Hermann, R., Dämmrich, J., Wozniak, E., Gessner, P., Herrmann, B., Zimmermann, U., and Müller-Hermelink, H.K. (1998a). Tumor-specific apoptosis by the human monoclonal antibody SC-1: A new therapeutical approach for stomach cancer. *Oncology Reports* 5, 35-40.
- Vollmers, H.P., Zimmermann, U., Krenn, V., Timmermann, W., Illert, B., Hensel, F., Hermann, R., Thiede, A., Wilhelm, M., Rückle-Lanz, H., Reindl, L., and Müller-Hermelink, H.K. (1998b). Adjuvant therapy for gastric adenocarcinoma with the apoptosis-inducing human monoclonal antibody SC-1: first clinical and histopathological results. *Oncology Reports* 5, 549-552.
- Vollmers, H.P., O'Connor, R., Müller, J., Kirchner, T., and Müller-Hermelink, H.K. (1989). SC-1, a functional human monoclonal antibody against autologous stomach carcinoma cells. *Cancer Res.* 49, 2471-2476.
- Vollmers, H.P. and Brändlein, S. (2002). Nature's best weapons to fight cancer: Reloading human monoclonal IgM antibodies. *Human antibodies* 11(4), 131-142.
- von Mehren, M. and Weiner, L.M. (1996). Monoclonal antibody-based therapy. *Curr Opin Oncol* 8, 493-498.
- Vos, Q., Lees, A., Wu, Z.Q., Snapper, C.M., and Mond, J.J. (2000). B-cell activation by T-cell-independent type 2 antigens as an integral part of the humoral immune response to pathogenic microorganisms. *Immunol Rev* 176, 154-170.
- Vose, J.M., Link, B.K., Grossbard, M.L., Czuczman, M., Grillo-Lopez, A., Gilman, P., Lowe, A., Kunkel, L.A., and Fisher, R.I. (2001). Phase II study of rituximab in combination with chop chemotherapy in patients with previously untreated, aggressive non-Hodgkin's lymphoma. *J Clin Oncol* 19, 389-397.
- Warbrick, E. (2000). The puzzle of PCNA's many partners. *Bioessays* 22, 997-1006.
- Wehrmann, K. and Fruhmorgen, P. (2000). [Removing adenomas reduces colon carcinoma risk up to 90%. Effective cancer prevention with the endoscope]. *MMW Fortschr Med* 142, 26-29.
- Weinberg, R.A. (1996). How cancer arises. *Sci Am* 275, 62-70.
- Weiner, L.M. (1999). An overview of monoclonal antibody therapy of cancer. *Semin Oncol* 26, 41-50.
- Williams, M.J. (2001). Regulation of antibacterial and antifungal innate immunity in fruitflies and humans. *Adv Immunol* 79, 225-259.
- Wilmink, A.B. (1997). Overview of the epidemiology of colorectal cancer. *Dis Colon Rectum* 40, 483-493.
- Winter, G. and Harris, W.J. (1993). Humanized antibodies. *Immunol Today* 14, 243-246.
- Wittrup, K.D. (1999). Phage on display. *Trends Biotechnol* 17, 423-424.
- Wong, N.A., Mayer, N.J., MacKell, S., Gilmour, H.M., and Harrison, D.J. (2000). Immunohistochemical assessment of Ki67 and p53 expression assists the diagnosis and grading of ulcerative colitis-related dysplasia. *Histopathology* 37, 108-114.
- Wortis, H.H. (1992). Surface markers, heavy chain sequences and B cell lineages. *Int.Rev.Immunol.* 8, 235-246.
- Wortis, H.H. and Berland, R. (2001). Cutting edge commentary: origins of B-1 cells. *J Immunol* 166, 2163-2166.
- Wright, S.D. (1995). CD14 and innate recognition of bacteria. *J Immunol* 155, 6-8.

- Wuttke, N.J., Macardle, P.J., and Zola, H. (1997). Blood group antibodies are made by CD5+ and by CD5- B cells. *Immunol Cell Biol* 75, 478-483.
- Xia, M.Q., Hale, G., and Waldmann, H. (1993). Efficient complement-mediated lysis of cells containing the CAMPATH-1 (CDw52) antigen. *Mol Immunol* 30, 1089-1096.
- Yang, E. and Korsmeyer, S.J. (1996). Molecular thanatopsis: a discourse on the BCL2 family and cell death. *Blood* 88, 386-401.
- Yang, X.D., Jia, X.C., Corvalan, J.R., Wang, P., and Davis, C.G. (2001). Development of ABX-EGF, a fully human anti-EGF receptor monoclonal antibody, for cancer therapy. *Crit Rev Oncol Hematol* 38, 17-23.
- Zuber, M.E., Zhou, Z., Burrus, L.W., and Olwin, B.B. (1997). Cysteine-rich FGF receptor regulates intracellular FGF-1 and FGF- 2 levels. *J.Cell Physiol.* 170, 217-227.
- zur Hausen, H. (2000). Papillomaviruses causing cancer: evasion from host-cell control in early events in carcinogenesis. *J Natl Cancer Inst* 92, 690-698.

7.2 Veröffentlichungen Vorträge, Poster

7.2.1 Wissenschaftliche Veröffentlichungen

1. Lischke A., Moriggl R., **Brändlein S.**, Berchthold S., Kammer W., Sebald W., Groner B.,
Liu X., Henninghausen L., Friedrich K.
„The interleukin-4 receptor activates STAT5 by a mechanism that relies upon common gamma-chain.”
J. Biol. Chem. 20; 273(47): 31222-31229; Nov 1998.
2. Friedrich K., Kammer W., Erhardt I., **Brändlein S.**, Sebald W., Moriggl R.
„Activation of STAT5 by IL-4 relies on Janus kinase function but not on tyrosine phosphorylation, and can contribute to both cell proliferation and gene regulation.”
Int. Immunol.; 11(8): 1283-1294; Aug 1999.
3. Friedrich K., Kammer W., Erhardt I., **Brändlein S.**, Arnold S., Sebald W.
„The two subunits of the interleukin-4 receptor mediate independent and distinct patterns of ligand endocytosis.”
Eur. J. Biochem. 1; 265(1): 457-465; Oct 1999.
4. Hensel F., **Brändlein S.**, Eck M., Schmidt K., Krenn V., Kloetzer A., Bachi A., Mann M., Müller-Hermelink H.K., Vollmers H.P.
„A novel proliferation-associated variant of CFR-1 defined by a human monoclonal antibody.”
Lab. Invest. 81(8): 1097-1108; Aug 2001.
5. Herrmann R., Hensel F., Muller E.C., Keppler M., Souto-Carneiro M., **Brändlein S.**, Müller-Hermelink H.K., Vollmers H.P.
„Deactivation of regulatory proteins hnRNP A1 and A2 during SC-1 induced apoptosis.”
Hum. Antibodies 10(2): 83-90; 2001.

6. Hensel F., Hermann R., **Brändlein S.**, Krenn V., Schmauß B., Geis S., Müller-Hermelink H.K., Vollmers HP.
„Regulation of the new coexpressed CD55 (decay-accelerating factor) receptor on stomach carcinoma cells involved in antibody SC-1-induced apoptosis.”
Lab. Invest. 81(11):1553-1563; Nov 2001.

7. Gerhard N., Krenn V., Magalhaes R., Morawietz L., **Brändlein S.**, König A.
„IgVH-genes analysis from psoriatic arthritis shows involvement of antigen-activated synovial B-lymphocytes.“
Z. Rheumatol. 2002 Dec;61(6):718-27

8. **Brändlein S.**, Lorenz J., Ruoff N., Hensel F., Beyer I., Müller J., Neukam K., Eck M., Müller-Hermelink H.K., Vollmers H.P.
„Human monoclonal IgM antibodies with apoptotic activity isolated from cancer patients.”
Hum. Antibodies; 11(4):107-119, 2002.

9. Vollmers H.P. and **Brändlein S.**
„Nature’s best weapons to fight cancer: Reloading human monoclonal IgM antibodies.”
Hum. Antibodies; 11(4): 131-142, 2002.

10. **Brändlein S.**, Beyer I., Eck M., Bernhardt W., Hensel F., Müller-Hermelink H.K., Vollmers H.P.
„CFR-1, a new marker for precancerous epithelial lesions defined by the human monoclonal antibody PAM-1”
Cancer Res.; 63: 2052-2061, 2003.

11. Eck M., Schmauß B., Scheller K., **Brändlein S.**, Müller-Hermelink H.K.
„Pleiotropic effects of CXC chemokines in gastric carcinoma: Differences in CXCL8 and CXCL1 expression between diffuse and intestinal types of gastric carcinoma.”
Eingereicht bei J. Pathol.; 2002.

12. **Brändlein S.**, Pohle T., Ruoff N., Wozniak E., Müller-Hermelink H.K., Vollmers H.P.
“Immunity and Cancer: Specificity, Genetics, and Origin of Natural Tumor-Specific IgM Antibodies.” Eingereicht bei Cancer Res., 2003

7.2.2 Poster/Vorträge

1. Wietek S., Kammer W., Lischke A., Erhardt I., **Brändlein S.**, Friedrich K.
„Signal transduction of the interleukin-4 receptor complex studied by regulatable expression of dominant-negative modules of signal proteins“
Eur. J. Cell. Biol., 75, 48, 54; 1998.
2. Vollmers H.P., Hensel F., Hermann R., Schmauß B., **Brändlein S.**, Müller-Hermelink H.K.
„Immunotherapy for stomach carcinoma with the human monoclonal antibody SC-1. New data on CD55/SC-1 receptor signaling and apoptotic mechanisms“
Proceedings of the American Association for Cancer Research, 92nd Annual Meeting; Mar 2001.
3. Vollmers H.P., Hensel F., **Brändlein S.**, Eck M., Schmauß B., Timmermann W., Illert B., Thiede A., Müller-Hermelink H.K.
„Immunotherapy for stomach carcinoma with the apoptosis-inducing human monoclonal antibody SC-1.“
ECCO 11 The European Cancer Conference; Oct 2001.
4. Hensel F., **Brändlein S.**, Eck M., Krenn V., Kloetzer A., Bachi A., Mann M., Müller-Hermelink H.K., Vollmers H.P.
„A new variant of cystein-rich FGF receptor (CFR-1) as Target for mitotic antibody with possible diagnostic value in gastric cancer.“
ECCO 11 The European Cancer Conference; Oct 2001.

5. **Brändlein S.**, Hensel F., Lorenz J., Eck M., Illert B., Müller J., Müller-Hermelink H.K, Vollmers H.P.
„Five new human monoclonal IgM antibodies isolated from carcinoma patients as diagnostic and therapeutic tools.”
J. Cancer Res. Clin.Onc. 128 (Suppl.1): 143; Mar 2002.

6. Beyer I., Hensel F., **Brändlein S.**, Eck M., Müller-Hermelink H.K., Vollmers H.P.
„PAM-1 a new human monoclonal antibodies specific for precancerous and cancerous epithelial lesions.”
J. Cancer Res. Clin.Onc. 128 (Suppl.1): 143; Mar 2002.

7. Hensel F., Eck M., Beyer I., **Brändlein S.**, Krenn V., Müller-Hermelink H.K., Vollmers H.P.
„Eine neue Variante von CFR-1 als Rezeptor für einen mitotischen Antikörper mit diagnostischen Eigenschaften bei Magenkarzinom.“
Pathol. Res. Pract. 198(3): 199; Apr 2002.

8. **Brändlein S.**, Hensel F., Lorenz J., Eck M., Illert B., Müller J., Müller-Hermelink H.K, Vollmers H.P.
„Characterisation of five new fully human monoclonal IgM antibodies isolated from carcinoma patients.”
Proceedings of the American Association for Cancer Research, 93rd Annual Meeting; Apr 2002.

9. Vollmers H.P., Hensel F., Beyer I., **Brändlein S.**, Eck M., Müller-Hermelink H.K.
„PAM-1, A new human monoclonal antibody as diagnostic tool for precancerous and cancerous epithelial lesions”
Proceedings of the American Association for Cancer Research, 93rd Annual Meeting; Apr 2002.

10. **Brändlein S.**, Lorenz J., Hensel F., Eck M., Schmauß B., Müller J., Müller-Hermelink H.K., Vollmers H.P.
„New human monoclonal IgM antibodies from cancer patients with apoptotic activity.”
Hum. Antibodies 11(1,2): 4; Sep 2002.

11. Vollmers H.P., **Brändlein S.**, Hensel F., Beyer I., Eck M., Schmauß B., Müller-Hermelink H.K.
„PAM-1, A human monoclonal IgM antibody usefull for diagnosis and therapy of precancerous and cancerous epithelial lesions.”
Hum. Antibodies 11(1,2): 3; Sep 2002.

12. Vollmers H.P., Beyer I., **Brändlein S.**, Hensel F., Eck M., Schmauß B., Müller-Hermelink H.K.
„CFR-1, a new marker for precancerous epithelial lesions defined by the human monoclonal antibody PAM-1.”
Proceedings of the American Association for Cancer Research, Frontiers in Cancer Prevention Research; Oct 2002.

13. Vollmers H.P., **Brändlein S.**, Bernhardt W., Hensel F., Müller-Hermelink H.K.
"Innate immunity and cancer: Analysis of IgM reactivity pattern"
Proceedings of the American Association for Cancer Research, 94th Annual Meeting;
Apr 2003.

14. **Brändlein S.**, Hensel F., Vollmers C., Bernhardt W., Müller-Hermelink H.K., Vollmers H.P.
"CFR-1 receptor on tumour cells: The janus-faced activity of human antibody PAM-1"
Proceedings of the American Association for Cancer Research, 94th Annual Meeting;
Apr 2003.

8 Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
ACE-Hemmer	Angiotensin converting enzyme-Hemmer
A _{xxx}	Absorption bei xxx nm
ADCC	antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity
bp	Basenpaare
BSA	bovine serum albumin (Rinder Serum Albumin)
CDC	complement dependent cytotoxicity
cDNA	komplementäre DNA
CDR	complement determining region (Komplement bestimmende Region)
CEA	carcinoembryonic antigen (Karzinoembryonisches Antigen)
CFR	cysteinerich fibroblast growth factor-receptor (Cysteinreicher Fibroblasten Wachstumsfaktor Rezeptor)
CLL	chronische lymphatische Leukämie
Da	Dalton
DAB	Diaminobenzidin
DAF	decay accelerating factor
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	deoxyribonucleic acid (Deoxyribonucleinsäure)
dNTP	Deoxy Nukleotid Triphosphat
D-region	diversity region (Diversitäts-Region)
DTT	di-Thiotreithol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGF	epidermal growth factor (Epidermis Wachstumsfaktor)
EGF-R	epidermal growth factor-receptor (Epidermis Wachstumsfaktor-Rezeptor)
ELISA	enzym linked immunosorbent assay
FACS	Fluorescence Activated Cell Sorting/ Scanning
FGF	fibroblast growth factor (Fibroblasten Wachstumsfaktor)
FCS	Fetal Calf Serum (Fötales Kälberserum)
FPLC	fast protein liquid chromatography
FR	framework region (Gerüst-Region)
g	Gramm
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase
GTC	Guanidinium-Isothiocyanate
h	Stunde
HAMA	human anti mouse antibody (humane Anti-Maus-Antikörper)
HAT	Hypoxantin, Aminopterin, Thymidin
Ig	Immunglobulin
IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalactopyranoside
k	Kilo
l	Liter
LB-Medium	Luria Broth-Medium
LPS	Lipopolysaccharide
m	Milli
M	Molar
MALT	Mukosa assoziiertes lymphoides Gewebe

MHC.....	major histocompatibility complex
min.....	Minute
M-MLV	Moloney Maus Leukämie Virus
MOPS	(3-[N-Morpholino]propan)-sulfonsäure
mRNA	messenger RNA
MTT-Test	Mitochondrialer Hydroxylase Activity Test
NaOH.....	Natriumhydroxid
NK	natürliche Killerzellen
O.D. _{xxx}	Optische Dichte bei xxx nm
PAMP	pathogen-associated molecular patterns
PARP	poly(ADP-ribose)polymerase
PBS	phosphat buffered saline (Phosphat gepufferte Salzlösung)
PCR	polymerase chain reaction (Polymerase-Ketten-Reaktion)
POD.....	Peroxidase
PRR	Pattern- Recognition-Receptor
RF	Rheumafaktor
RNA	ribonucleic acid (Ribonukleinsäure)
rpm	rounds per minute (Umdrehungen pro Minute)
RT	Raumtemperatur
RT-PCR.....	reverse transcription PCR (Reverse-Transkriptase-PCR)
scFv	single chain variable Fragments
SDS.....	Natrium-Dodecyl-Sulfat
SDS-PAGE.....	Natrium-Dodecyl-Sulfat Polyacrylamid Gelelektrophorese
sec.....	Sekunde
TAA.....	Tumor assoziiertes Antigen
Tab.	Tabelle
TBE	Tris-Borat-EDTA-Puffer
TCA.....	Trichlorazetat
TE	Tris EDTA-Puffer
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
TNF	tumor necrosis factor (Tumor Nekrose Faktor)
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
TSA	Tumor spezifisches Antigen
U	Unit (Einheit)
U/min.....	Umdrehungen pro Minute
UV	Ultraviolettes Licht
ü.N.	über Nacht
v/v	Volumenprozent
VH	Variable Region der Immunglobulin schweren Kette
VL.....	Variable Region der Immunglobulin leichten Kette
w/v	Gewichtsprozent
x g.....	x-fache Erdbeschleunigung
X-gal	5-Bromo-4-chloro-3-indolyl-phosphat

Danksagung

Bei all denen, die am Entstehen dieser Arbeit Anteil gehabt haben, möchte ich mich hiermit herzlich bedanken.

Mein ganz besonderer Dank gilt Prof. Dr. H. P. Vollmers. Insbesondere danke ihm für die interessante Themenstellung meiner Doktorarbeit, für die Betreuung und stete Unterstützung und für manches langes Gespräch. Die Zeit, die ich zur Anfertigung meiner Arbeit in seinem Labor verbringen durfte, war wissenschaftlich und menschlich eine große Bereicherung für mich.

Prof. Dr. E. Buchner danke ich für die Betreuung dieser Arbeit als Vertreter der Fakultät für Biologie.

Prof. Dr. H.K. Müller-Hermelink danke ich für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes und seine Unterstützung.

Den Mitgliedern meiner Arbeitsgruppe danke ich dafür, dass sie mit mir gelacht und gelitten haben, dass sie immer zu mir gehalten haben und mich unterstützten wo es nur ging. Ich danke Euch, dass ihr meine Freunde geworden seid. Nele, Tina, Ewa, Ines, Dany und Wolle, was wäre ich ohne Euch?

Dr. Frank Hensel danke ich für die freundschaftliche Zusammenarbeit, seine Diskussionsbereitschaft und für so manche mexikanische Köstlichkeit.

Allen restlichen Mitarbeitern des Pathologischen Instituts möchte ich für die freundschaftliche Atmosphäre und ihre stete Hilfsbereitschaft danken. Im besonderen möchte ich mich bei Dr. Bernd Schmauß, Dr. Matthias Eck, PD Dr. Justus Müller, Dr. Sergej Chuvpilo, Waldemar Rauh, Gerhard Walter, Erwin Schmitt, Andrea Homburger und Christel Kohaut bedanken.

Meinen Eltern und meinen Geschwistern möchte ich für die entgegengebrachte Liebe und die unermüdliche Unterstützung danken und dafür, dass sie immer an mich glauben. Ohne Euch hätte ich es nie geschafft!

Dirk danke ich für seine Liebe und seine Geduld, die er während dieser Arbeit aufgebracht hat und ganz besonders dafür dass es ihn gibt.

Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die Dissertation „Tumorimmunität: Spezifität, Genetik und Funktion natürlicher IgM-Antikörper“ selbständig angefertigt und keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet habe.

Ich erkläre außerdem, dass diese Dissertation weder in gleicher noch in anderer Form bereits in einem anderen Prüfungsverfahren vorgelegen hat.

Ich habe früher außer den mit dem Zulassungsgesuch urkundlich vorgelegten Graden keine weiteren akademischen Grade erworben oder zu erwerben versucht.

Würzburg, den 08. Mai 2003

Lebenslauf

Name: Brändlein

Vorname: Stephanie Ute

Geburtsdatum: 27.11.1970

Geburtsort: Werneck

Eltern: Karl Brändlein und Gisela Brändlein

Sep. 1977-Jul. 1981: Schiller-Grundschule in Schweinfurt

Sep. 1981-Jul. 1991: Alexander-von-Humboldt-Gymnasium in Schweinfurt

Jul. 1991: Abitur

Okt. 1991: Beginn des Biologie-Studiums (Diplom) an der Julius-Maximilians-Universität Würzburg.

Mär. 1994: Vordiplom

Feb.-Mär. 1997: Diplomprüfung in den Fächern Tierphysiologie, Biochemie und Mikrobiologie

Apr. 1997-Jan. 1998: Diplomarbeit am Lehrstuhl für physiologische Chemie II, Universität Würzburg. Thema: Konstruktion und funktionelle Analyse von Mutanten der humanen γ c-Rezeptorkette

Jan. 1998: Diplom

Feb. 1998-Jul. 1999: Anstellung als wissenschaftliche Mitarbeiterin am Lehrstuhl für physiologische Chemie II, Universität Würzburg

Aug. 1999-Mai 2003: Bearbeitung des Themas „Tumorimmunität: Spezifität, Genetik und Funktion natürlicher IgM-Antikörper“ am Pathologischen Institut als Dissertationsleistung für die Erlangung des naturwissenschaftlichen Doktorgrades an der Bayerischen Julius-Maximilians-Universität Würzburg