Aus der Klinik für Hämatologie, Onkologie und Transfusionsmedizin der Medizinischen Fakultät Charité - Universitätsmedizin Berlin

# DISSERTATION

Charakterisierung von gpA33 und Eignung als Antikörper-Target

zur Erlangung des akademischen Grades Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät Charité - Universitätsmedizin Berlin

von

Dietmar Frey aus Freiburg im Breisgau

Gutachter:

1. Prof. Dr. med. U. Keilholz

2. Prof. Dr. med. W. E. Berdel

3. Prof. Dr. rer. nat. H. Fuchs

Datum der Promotion: 05.06.2011

# Inhaltsverzeichnis

Abkürzungen und Begriffe 1				
1	I Zusammenfassung			2
2 Einleitung				4
	2.1	Das ko	olorektale Karzinom	6
		2.1.1	Ätiologie, Pathogenese und Klassifikation	7
		2.1.2	Diagnose und Diagnostik	8
		2.1.3	Therapie	10
	2.2	Thera	peutische Antikörperkonstrukte im Rahmen der ADEPT	13
	2.3	gpA33	als Target für die immunologische Therapie	14
	2.4	Aufgal	benstellung der Arbeit	16
3	Mat	erial ur	nd Methoden	18
	3.1	Materi	al	18
		3.1.1	Verbrauchsmaterialien	18
		3.1.2	Lösungen für Soluibilisierung, Waschen und Immunpräzipitation	19
		3.1.3	Zelllinien	20
		3.1.4	Kits	20
		3.1.5	Laborgeräte	20
	3.2	Metho	den	22
		3.2.1	Kulturbedingungen und Zellkultivierung	22
		3.2.2	Fluoreszenzmikroskopie	22
		3.2.3	FACS	23
		3.2.4	Zellsynchronisierung	25
		3.2.5	Real-time PCR	25
		3.2.6	Konfokale Laser-Scanning-Mikroskopie	29
		3.2.7	Protein-Konzentration	29

4	Ergebnisse		
4.1 Darstellung der Expression von gpA33 an Kolonkarzinomzellen de nie LIM1215 mittels Fluoreszenzmikroskopie			
			31
	4.2	Spezifität: Fluoreszenzmikroskopische Untersuchung der A33-Expression	
		an gesundem und veränderten Gewebe	32
	4.3	Affinität, Avidität, Dissoziation von gpA33::rbGFP–Fluoreszenz zu verschie-	
		denen Zeitpunkten nach Inkubation mit gpA33::rbGFP	32
	4.4	Entwicklung des Expressionsgrads von gpA33 am Beispiel verschiedener	
Tumorzelllinien mittels Durchflusszytometrie (FACS) über sieben Tage 4.5 Zellzyklusphasenspezifische Arretierung von LIM1215-Zellen			35
			41
<ul> <li>4.6 GpA33-Expression in Abhängigkeit von der Zyklusphase</li> <li>4.7 Nachweis der transfer-RNA für GPA33 mittels rt-PCR</li></ul>		GpA33-Expression in Abhängigkeit von der Zyklusphase	42
		Nachweis der transfer-RNA für GPA33 mittels rt-PCR	44
		Darstellung der Expression von GPA33 an Kolonkarzinomzellen der Zellli-	
		nie LIM 1215 mittels konfokaler Lasermikroskopie	46
	4.9	Membrankinetik und Internalisierungskinetik des gpA33-Antikörpers in der	
		konfokalen Mikroskopie	49
5	Disk	ussion	50
Lit	Literatur		
Eigene Veröffentlichungen			68
Da	Danksagung		
Eiç	Eigenständigkeitserklärung 70		

# Abbildungsverzeichnis

2.1	Klinik und Lokalisation des kolorektalen Karzinoms (Modifiziert nach Kas-	
	per et al. (2005))	6
2.2	Resektate nach Koloskopie, bzw. Operation	10
2.3	Mechanismus der ADEPT	13
4.1	Fluoreszenzmikroskopie von LIM 1215 und K 562	31
4.2	Gesundes Gewebe des Colon-Epithels nach Inkubation	32
4.3	Adeno-Karzinom des Kolons nach Inkubation mit gpA33::rbGFP	33
4.4	Fluoreszenz über die Zeit	33
4.5	Entwicklung der Zellzahl Tag 1-6 LIM 1215	35
4.6	Entwicklung der Fluoreszenz Tag 1-6 LIM 1215	36
4.7	Entwicklung der Zellzahl Tag 1-6 CaCo 2	36
4.8	Entwicklung der Fluoreszenz Tag 1-6 CaCo 2	37
4.9	Entwicklung der Zellzahl Tag 1-6 K 562	37
4.10	Entwicklung der Fluoreszenz Tag 1-6 K 562	38
4.11	Untersuchung der Korrelation von Fluoreszenz und Zellzahl für LIM 1215 .	39
4.12	Abhängigkeit der Fluoreszenz von der Zelldichte der Zelllinie 1215	40
4.13	DNA-Quant. nach Arretierung mit L-Mimosine, Aphidicolin und Nocodazole	42
4.14	Expression von gpA33::rbGFP in der jeweiligen Zyklusphase	43
4.15	Fluoreszenzintensität im jeweiligen Zellzyklus	43
4.16	Quantifizierung von gpA33-mRNA	44
4.17	Quantität der gpA33-mRNA im Vergleich zur Fluoreszenz von gpA33::rbGFP	45
4.18	Expression von gpA33-mRNA in zyklusphasenarretierten LIM1215-Zellen .	45
4.19	Zeitliche Entwicklung LIM 1215 nach Inkubation 1	47
4.20	Zeitliche Entwicklung LIM 1215 nach Inkubation 2	48
4.21	Inkubation von A33 positiven Zellen mit gpA33::rbGFP	49
4.22	FRAP–Film	49

# Abkürzungen und Begriffe

SI-Einheiten und andere international festgelegte Abkürzungen sind hier nicht angegeben.

ADEPT	Antibody-directed Enzyme Prodrug Therapy
ATP	Adenosintriphosphat
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
FACS	Fluorescence Activated Cell Scanning
GFP	Green-Fluorescent-Protein <sup>™</sup>
lgG	Immunglobulin G
mRNA	Messenger-Ribonukleinsäure
PBS	phosphatgepufferte Kochsalzlösung (Phosphate Buffered Saline Solution)
PCR	Polymerase-Kettenreaktion (Polymerase Chain Reaction)
scFv	variable single-chain fragment
tRNA	Transfer-Ribonukleinsäure
U/min	Umdrehungen pro Minute

## 1 Zusammenfassung

## 'Charakterisierung von gpA33 und Eignung als Antikörper-Target'

*Hintergrund:* In der Therapie des kolorektalen Karzinoms wurden in den letzten Jahren neben der chirurgischen Resektion zunehmend multimodale Therapieansätze etabliert. Obwohl das kolorektale Karzinom weiterhin einer der führenden Ursachen für Morbidität und Mortalität in der westlichen Welt ist, konnten neue Therapieoptionen wie antikörpergesteuerte Medikamente das Gesamtüberleben erheblich verbessern. Nichtsdestrotrotz ist angesichts der Inzidenz und Mortalität des kolorektalen Karzinoms der Bedarf für neue Therapiekonzepte gegeben. Die Zielsetzung dieser Arbeit ist die Identifizierung und Charakterisierung des Antigens A33 zur Etablierung einer antikörpergesteuerte Therapie und die Einführung eines funktionierenden Antikörpers für dieses Antigen in vitro.

Material und Methoden: Zur Untersuchung von Kolonkarzinomzellen der Zelllinien LIM1215 und CaCo2 in vitro und von Gewebsschnitten von kolorektalem Karzinomgewebe kamen FACS-Analyse, Fluoreszenzmikroskopie, konfokale Laser-Mikroskopie und PCR-Analyse als Untersuchungsmethoden zur Anwendung. Die Darstellung des auf der Zelloberfläche befindlichen Antigens gpA33 erfolgte mit dem Antikörper gpA33::rbGFP.

*Ergebnisse:* Grundlage für diese Ergebnisse war der zunächst erbrachte Nachweis der Spezifität und Affinität von gpA33::rbGFP bei Zellen und an Gewebe von kolorektalem Karzinom. Es wurde in dieser Arbeit erstmals gezeigt, dass die Expression von gpA33 auf der Zelloberfläche von Kolonkarzinomzellen über die Zeit keine Konstanz aufweist, sondern von der Umgebung der Zelle, ihrem Wachstumsgrad und der Phase des Zellzyklus, in dem sie sich befindet, abhängig ist. Die Expression von gpA33 auf der Zelloberfläche zeigt eine biphasische Proportionalität zur Dichte des Zellverbandes, in der sich die Zellen befinden. Wie gezeigt werden konnte, steigt der Expressionsgrad von gpA33 auf der Zelloberfläche mit der Zelldichte bis zum Konfluenzpunkt an, um danach wieder zu sinken. Daneben konnte erstmals nachgewiesen werden, dass ein Oberflächenantigen eine für die jeweilige Zellzyklusphase spezifisches Expressionsprofil aufweist. In der G2/M-Phase erreicht die Expression von gpA33 ihr Maximum, nachdem in der S-Phase der Expressionsgrad minimal war. Wir konnten daneben zeigen, dass nach Inkubation von Kolonkarzinomzellen mit dem Antikörper gpA33::rbGFP eine teilweise Internalisierung des Antigen-Antikörper-Komplexes erfolgt, wobei der weitere intrazelluläre Weg und eine Rezirkulationan die Zelloberfläche nicht verfolgt werden konnte.

Diskussion: Bisherige Arbeiten deuten darauf hin, dass es als transmembranales Glykoprotein an Zell-Zell-Interaktion und der Steuerung von Epithelwachstum und -differenzierung beteiligt ist. Die in-vitro-Expression von gpA33 auf kolorektalen Zellen unterliegt entsprechend den Ergebnissen dieser Arbeit nicht mehr dem eigentlichen physiologischen Ziel der Wachstumsregulation und -kontrolle sondern ist dysreguliert und bewirkt ein unkontrolliertes Wachstum, welches auch durch Adhäsion der Zellen mit Nachbarzellen in vollständiger Konfluenz nicht beeinflusst wird. Die in physiologischer Umgebung gezeigte Wachstumsinhibition durch Agglomeration geschieht hier nicht. Die Abnahme der Expression des Adhäsionsmoleküls nach Erreichen des Konfluenzpunktes könnte daneben die Bereitschaft der malignen Zellen zur Metastasierung zeigen. Eine entscheidende Einflussgröße auf den Grad der gpA33-Expression hat darüber hinaus die Zyklusphase, in der sich die jeweilige Zelle befindet. In der G2/M-Phase erreicht die Expression von gpA33 ihr Maximum, nachdem in der S-Phase der Expressionsgrad minimal war. Die Ergebnisse dieser Arbeit begründen die Hypothese, dass der Expressionsgrad von gpA33 auf der Zelloberfläche vom Zellzyklus abhängig ist, vom Wachstumsverhalten der einzelnen Zelle und des Zellverbandes beeinflusst wird und in maligne transformierten Zellen spezifisch und im Vergleich zur gesunden Zelle signifikant in höherem Maße exprimiert wird. Dies zeigt neue Ansätze für zukünftige Forschungsarbeiten auf, um weitere Antikörper-gesteuerte Therapieansätze für das kolorektale Karzinom zu etablieren. Die Überprüfung der Übertragbarkeit dieser Ergebniss auf in-vivo-Modelle ist ausstehend. Daneben steht zur weitergehenden Untersuchung die Frage, ob die hier nachgewiesenen Veränderungen der Antigenexpression in den jeweiligen Zyklusphasen für die Behandlung des kolorektalen Karzinoms therapeutische Ansätze eröffnen könnte und gegebenenfalls auf andere Tumorentitäten übertragbar ist.

#### 2 Einleitung

Seit Jahrzehnten wird versucht, die Potenz und Spezifität von Therapeutika in der Behandlung von malignen Erkrankungen zu erhöhen. Probleme wie unerwünschte Arzneimittelwirkungen und die ungezielte Zerstörung von gesundem Gewebe stellen erhebliche Einschränkungen der Behandlung mit Cytostatika dar und sind oftmals der limitierende Faktor für die Dosierung. Dies gilt auch und insbesondere für solide Tumoren wie das metastasierte kolorektale Karzinom mit seiner hohen Resistenz gegenüber der konventionellen Chemotherapie.

Ein vielversprechender Weg für eine gezieltere Therapie solider Tumoren schien die Entwicklung von monoklonalen Antikörpern zu sein, die tumorspezifische Antigene binden. Seit Anfang der 90er Jahre erfolgte die Zulassung mehrerer Antikörper zur Tumortherapie (Allegra CJ (2009); Chouhan et al. (2007); Cunningham et al. (2004)). In den letzten Jahrzehnten wurden verschiedene monoklonale Antikörper für die Radioimmunotherapie des kolorektalen Karzinoms in klinischen Studien untersucht (Chong et al. (2005); Allegra CJ (2009); Welt et al. (1996)). Insgesamt zeigten mehrere Studien, dass in einzelnen Indikationen antikörpergestützte Therapieansätze durchaus erfolgreich waren, allerdings weiterhin große Hürden zu überwinden sind (Chouhan et al. (2007); Chong et al. (2005)). Dies liegt zum einen an der Tatsache, dass es schwer fiel, geeignete Antigene an der Zelloberfläche von Tumorzellen zu finden. Das gesuchte Antigen muss ausreichende Spezifität für die jeweiligen Tumorzellen aufweisen, um eine lokalisierte und begrenzte Wirkung zu erreichen. Eine angemessene Affinität des Antikörpers zum Antigen ist erforderlich, um in der zeitlichen Dimension Wirkung zu erzielen. Und schließlich muss der zu Therapiezwecken eingesetzte Antikörper möglichst nahe an das Zielgewebe herangebracht werden können, das heißt in Größe und sonstiger molekularbiologischer Beschaffenheit geeignet sein, zum Tumor vorzudringen, um alle Zellen des Tumors zu erreichen. Zum anderen mussten Moleküle konstruiert werden, die sowohl eine Bindungsstelle zum Antigen aufweisen als auch das für die Wirkung erforderliche Enzym enthalten. Die Bindungsstelle muss spezifisch sein, damit die Wirkung lokal am Zielort erfolgt. Voraussetzung für die Eignung eines Enzyms ist, dass es ebenfalls hochspezifisch das Medikament von seiner wirkungslosen Vorstufe in die Wirksamkeit bringt. Daneben ist erforderlich, dass es im

physiologischen Milieu aktiv ist, idealerweise keine oder wenig Immunogenität aufweist und keine äquivalenten endogenen Enzyme existieren.

Die vorliegende Arbeit befasst sich mit der Frage, ob ein monoklonaler Antikörper die geforderte Spezifität, Affinität und Diffusionseigenschaft hat, um letzten Endes zu therapeutischen Zwecken eingesetzt werden zu können. Untersuchungsgegenstand ist das gpA33-Antigen und dessen monoklonaler Antikörper gpA33::rbGFP. GFP steht hierbei für ein fluoreszierendes Protein (Green Fluorescent Protein), mit welchem der Antikörper zu Zwecken der Sichtbarmachung fusioniert wurde.

GpA33 ist ein Antigen der Immunoglobulin-Superfamilie, das von gastrointestinalen Zellen und von über 95% der Kolonkarzinome exprimiert wird (Garin-Chesa et al. (1996)). Es ist ein transmembranales Glykoprotein, das an der Zelloberfläche exprimiert wird und als Oberflächenrezeptor bzw. als Adhäsionsmolekül für die Zell-Zell-Interaktion dient (Garin-Chesa et al. (1996); Johnstone et al. (2000)). Außerhalb des Gastrointestinaltrakts ist es kaum zu finden (Johnstone et al. (2002)). Die Funktion des gpA33-Antigens und sein natürlicher Ligand sind unbekannt. Verschiedene Arbeiten deuten auf seine Beteiligung an Zell-Zell-Interaktionen hin, die an der Steuerung von Epithelwachstum und -differenzierung beteiligt sind (Van Niel et al. (2001, 2003); Ritter et al. (2001)). Nach Bindung an der Zelloberfläche wird der Antigen-Antikörper-Komplex internalisiert und intrazellulär prozessiert, um wieder an der Zelloberfläche dargeboten zu werden (Denzer et al. (2000)). Dieser, im einzelnen ungeklärte Mechanismus, scheint wesentlich an der Tumorspezifität beteiligt zu sein (Heath et al. (1997)).

Die Untersuchung erfolgt mittels eines rekombinanten anti-gpA33-GFP-Fusionsproteins. Untersucht wird die Expression des gpA33-Antigens in verschiedenen Zelllinien und Kolonkarzinomproben und das Schicksal des Antigens nach Bindung des Antikörpers mit Methoden der Fluoresezenzzytometrie, Fluoreszenzmikroskopie und konfokalen Laser-Mikroskopie sowie molekularbiologischen Expressionsanalysen.

Aufgabe dieser Arbeit ist eine nähere funktionelle Charakterisierung des gpA33-Antigens mit dem Ziel, Ansätze zur Optimierung immunologischer Therapieverfahren des Kolonkarzinoms aufzuzeigen. verlauf

#### 2.1 Das kolorektale Karzinom

auf

Mit weltweit circa 1 Million Neuerkrankungen im Jahr und fast 500.000 Sterbefällen ist das kolorektale Karzinom der dritthäufigste maligne Tumor (Jemal et al. (2006); Kasper et al. (2005)). Klinisch präsentieren sich die Patienten mit Leistungsminderung und allgemeiner Schwäche als Folge der Tumoranämie. Gastrointestinale Symptome wie Teerstühle oder Blutbeimengungen im Stuhl, Obstipation und Diarrhöen treten oft erst spät im Krankheits-

abhängig



und

sind

von der Lokalisation. Zu differenzieren ist nach Ort der Läsion. Ein Tumor im Colon ascendens verursacht häufig Ulzerationen und führt zu chronischen, okkulten Blutverlusten ohne sichtbare Veränderungen des Stuhls. Hierbei findet man oft eine hypochrome, mikrozytäre Anämie. Bei Neoplasien im Colon trans-

Abb. 2.1: Klinik und Lokalisation des kolorektalen Karzinoms (Modifiziert nach Kasper et al. (2005))

versum und descendens manifestiert sich das kolorektale Karzinom oft durch Obstruktionen aufgrund der im Kolon zunehmenden Stuhlkonsistenz. Krämpfe, Ileus und Perforationen können als Komplikationen auftreten. Karzinome im Sigmoid und Rektum führen zu blutigem Stuhl und 'Bleistiftstühlen'. Die Tumorausbreitung erfolgt durch kontinuierliches Wachstum, lymphogen und hämatogen. Wachstum per continuatum erfolgt in die Nachbarorgane wie Blase, Ureteren, Uterus und Ovarien. Da die Lymphbahnen entlang der Blutgefäße verlaufen, erfolgt die lymphogene Ausbreitung je nach Ort des Primärtumors auf drei Hauptwegen: bei Wachstum von mehr als ca. 10 cm oberhalb der Anokutanlinie in die paraaortalen Lymphknoten, in der mittleren Etage, das heißt 5-10 cm oberhalb der Anokutanlinie sowohl in die paraaortalen wie in die Beckenlymphknoten, bei 0-5 cm oberhalb der Anokutanlinie zusätzlich nach inguinal. Hämatogen erfolgt die Metastasierung primär in die Leber, sekundär in die Lunge und das Skelett. Histologisch findet sich in 95 % der Fälle ein Adenokarzinom, wobei die Dysplasie eines Adenoms mit Infiltration der Submukosa als Karzinom gilt und auf die Adenom-Karzinom-Sequenz hinweist. 5 % sind Plattenepithelkarzinome, Leiomyosarkome, maligne Karzinoide, Melanome und Kaposi-Sarkome des Gastrointestinaltrakts bei AIDS mit einer insgesamt sehr schlechten Prognose (Kasper et al. (2005)).

#### 2.1.1 Ätiologie, Pathogenese und Klassifikation

Genetische Faktoren spielen nachgewiesenermaßen für zwei Sonderformen des kolorektalen Karzinoms eine Rolle; für die erblichen Polyposis-Syndrome des Kolons wie Familiäre Juvenile Polyposis, das PEUTZ-JEGHERS-Syndrom und die Familiäre Adenomatöse Polyposis (FAP) und daneben für das seltene LYNCH–Syndrom, eine Sonderform des Kolonkarzinoms, bei der es vor allem zu im Colon ascendens lokalisierten multiplen Karzinomen kommt, die um das 45. Lebensjahr gehäuft auftreten. Ansonsten ist die genetische Komponente nicht eindeutig. Zwar ist bei Verwandten 1. Grades von Kolonkarzinompatienten das Erkrankungsrisiko um das zwei- bis dreifache erhöht, doch könnte dies auch auf familiär und sozial geprägte Ess- und Verhaltensgewohnheiten zurückgeführt werden (confounding).

Hinweise auf Umweltfaktoren ergeben sich vor allem aus epidemiologischen Studien, die zeigen, dass sich das Erkrankungsrisiko umweltabhängig ändert. Der hohe Konsum von tierischem Fett und Fleisch in Verbindung mit ballaststoffarmer Ernährung könnte potentiell kanzerogen sein.

Die nachgewiesenen Risikofaktoren für die Entwicklung eines kolorektalen Karzinoms sind Alter - 90% aller Karzinome treten jenseits des 50. Lebensjahres auf - multiple und mehr als 1cm durchmessende Adenome des Kolons, Colitis ulcerosa, die das Risiko um den Faktor 5 erhöht, glutensensitive Enteropathie und die genannten genetischen Erkrankungen (siehe Tab. 2.1).

Bei der Adenom-Karzinom-Sequenz handelt es sich um einen mehrstufigen Prozess. Aus normalem Kolonepithel entwickelt sich ein Adenom, welches wiederum dysplastisch wird und schließlich in ein invasives Karzinom übergeht. Diese Abfolge wird durch die folgenden molekularen Veränderungen in der DNA hervorgerufen: 1. Punktmutation im Kras-Protoonkogen; 2. Hypomethylierung in der DNA mit Genaktivierung; 3. Allel-Verlust Risikofaktoren für die Entwicklung eines kolorektalen Karzinoms Alter Ernährung: tierische Fette Hereditäre Tumorsyndrome (autosomal-dominanter Erbgang) Familiäre adenomatöse Polyposis (FAP) Nicht-polypöse Tumorsyndrome (Lynch-Syndrome) Chronisch-entzündliche Darmerkrankungen Colitis ulcerosa M. Crohn Streptococcus-bovis-Bakteriämie Gluten-sensitive Enteropathie evtl. Tabakkonsum

Tab. 2.1: Risikofaktoren für die Entwicklung eines kolorektalen Karzinoms (Modifiziert nach Kasper et al. (2005))

eines Tumorsuppressorgens, dem APC- (= adenomatöse Polyposis-coli-) Gen auf 5q21; 4. Allel-Verlust eines Tumorsuppressorgens, dem DCC- (= Deleted in Colorectal Cancer-) Gen auf 5q21; 5. Allel-Verlust mit Mutation des p-53-Tumorsuppressorgens auf Chromosom 17. Ungeklärt ist momentan, inwieweit die Mutationen kumulativ auftreten müssen und ob eine definierte Abfolge der DNA-Veränderungen für die Entstehung des Karzinoms erforderlich ist (Kasper et al. (2005)).

Das kolorektale Karzinom wird heute nach zwei verschiedenen Klassifikationen eingeteilt, die nachfolgend in den Tabellen 2.2 und 2.3 aufgeführt sind: der TNM-Klassifikation und der DUKES-Klassifikation.

#### 2.1.2 Diagnose und Diagnostik

Der Sinn und Zweck jedes Screening-Programms liegt darin, dass die frühe Erkennung eines Tumors bei asymptomatischen Patienten die Prognose durch die chirurgische Intervention erheblich verbessert. Insbesondere Verwandte ersten Grades von Personen, die an kolorektalem Karzinom erkranken, profitieren von der Früherkennung, da deren relatives Risiko für die Erkrankung um bis zu dem Faktor drei erhöht sein kann.

Initiale Diagnoseschritte sind die Erhebung einer Anamnese und die körperliche Untersuchung. Bei hoher Lokalisation und fortgeschrittenem Stadium ist ein palpabler Tumor

	inding		
	т	Tumor = Primärtumor	
	ТΧ	Primärtumor kann nicht beurteilt werden	
	Т0	kein Anhalt für einen Primärtumor	
	Tis	Carcinoma in situ	
	T1	Tumor infiltriert die Submukosa	
	T2	Tumor infiltriert die Muscularis propria	
	Т3	Tumor infiltriert die Subserosa bzw. das nicht-peritonealisierte	
		parakolische bzw. pararektale Gewebe	
	T4	Tumor perforiert das viszerale Peritoneum und/oder infiltriert direkt andere Organe	
	Ν	Nodus = regionale Lymphknoten	
	NX	regionale Lymphknoten können nicht beurteilt werden	
	N1	Metastasen in 1-3 parakolischen/pararektalen Lymphknoten	
	N2	Metastasen in mehr als 4 parakolischen/pararektalen Lymphknoten	
M Metastasen		Metastasen	
	Tab. 2.2: TNM-Klassifikation des kolorektalen Karzinoms (Böckler 2001)		
S	tadium	Ia = Beschränkung der Tumorinfiltration auf die Mukosa und Submucosa (Dukes A)	
S	tadium	lb = Beschränkung der Tumorinfiltration bis in die Muscularis propria (Dukes A)	
S	tadium	II = T3 oder T4 ohne Lymphknotenmetastasierung (Dukes B)	
S	tadium	III = Lymphknotenmetastasierung (Dukes C)	
S	tadium	IV = Fernmetastasen (Dukes D)	

Tab. 2.3: UICC-Klassifikation, bzw. Dukes-Klassifikation des kolorektalen Karzinoms

in den unteren Quadranten tastbar. Die digital-rektale Untersuchung kann Tumoren mit rektaler Lokalisation auffinden, die ca. 60% aller Fälle ausmachen. Der Blutnachweis per Hämoccult-Test® ist sowohl zur Diagnose wie als Screening-Methode sinnvoll. Allerdings ist die Sensitivität des Tests selbst bei optimaler Durchführung auf circa 50% begrenzt, da die Blutungen aus dem Karzinom oft im Intervall auftreten. Auch die Spezifität ist mit 10-20% sehr gering. Dennoch bleibt festzustellen, dass ein umfassendes Screening bei Erwachsenen über 40 Jahre per Hämoccult-Test® gerechtfertigt ist, da der Test zum einen sehr kostengünstig ist und zum anderen die test-positiven Fälle mittels der relativ komplikationsarmen Koloskopie abgeklärt werden können.

Bei Verdacht auf Gewebstransformation wird eine Koloskopie mit evtl. Gewebeentnahme

und/oder Doppelkontrasteinlauf mit Röntgen durchgeführt. Mit der flexiblen fiberoptischen Sigmoidoskopie können die distalen 60 cm des Kolons eingesehen werden und damit Neoplasien in diesem Bereich erkannt und beurteilt werden. Die definitive Diagnose erfolgt histologisch auf der Basis von Biopsien, beziehungsweise Resektaten.

Das Staging umfasst bezüglich der Tumorausdehnung und des lokalen Lymphknotenbefalls die transrektale Endosonografie und die Computertomografie. Metastasen werden in der Leber mittels Sonografie und CT und in der Lunge mittels computer-tomographischer Thoraxuntersuchung dargestellt.

Das Carcino-embryonale Antigen (CEA) ist stadienabhängig erhöht, jedoch aufgrund seiner niedrigen Spezifität und Sensitivität als Tumormarker zur Primärdiagnostik nicht geeignet. Als Verlaufsmarker nach radikaler Operation wird es jedoch eingesetzt.



(a) Polyp im Kolon bei Koloskopie



(b) Kolorektales Karzinom im Rektum (Pfeil) bei Resektat

Abb. 2.2: Resektate nach Koloskopie, bzw. Operation

## 2.1.3 Therapie

Die Therapie des kolorektalen Karzinoms wird entsprechend ihrer Zielsetzung unter Berücksichtigung von Lokalisation und Stadium in eine kurativ-operative, adjuvante und palliative unterteilt.

Die Mehrzahl der Patienten mit Kolonkarzinom profitieren unabhängig vom Stadium des Tumors von einer chirurgischen Intervention. Das Ziel des chirurgischen Eingriffs ist die vollständige Entfernung des Tumors mit einem Mindestabstand von 2-5 cm zum gesunden Gewebe. Dabei werden die lokalen Lymphknoten vollständig extirpiert. Die meisten Karzinome werden durch Segment-Resektion, bzw. Hemikolektomie reseziert, wobei zumeist eine End-zu-End-Anostomose hergestellt wird. Auch Karzinome mit Fernmetastasen werden in der Regel chirurgisch entfernt, um das Risiko für Komplikationen wie Blutungen und/oder Obstruktionen zu minimieren.

Die Chemotherapie des metastasierten Kolonkarzinoms führt nachgewiesenermaßen zu einer Verlängerung der Überlebenszeit von 6 auf 12 und mehr Monate (Javle (2010)). Die Einführung neuer Substanzen hat, im Vergleich zur etablierten Therapie mit 5-FU und Folinsäure, sowohl die Ansprechrate wie auch den Überlebensvorteil erhöht. Irinotecan (CPT-11) kann bei Patienten, die nicht mehr auf 5-FU ansprechen, zur Verlängerung des Gesamtüberlebens beitragen. Auf bis zu 17 Monate kann die Überlebenszeit bei metastasiertem kolorektalen Karzinom ansteigen, wenn Irinotecan mit 5-FU/Folinsäure als Dauerinfusion kombiniert wird (Douillard et al. (2000)). Oxaliplatin, ein Drittgeneration-Platinderivat, führt zu einer signifikanten Verlängerung der Überlebenszeit auf 19-20 Monate und einer Erhöhung der Ansprechrate auf über 50%. Wenn die genannten Substanzen konsequent angewendet und kombiniert werden, können heute Überlebenszeiten von über 20 Monaten erreicht werden (de Gramont et al. (2000); Andre et al. (2006)).

Postoperativ wird im internationalen Standard eine Therapie mit 5-Fluoruracil (5-FU) und Folinsäure über sechs Monate durchgeführt. Dies führt bei Patienten mit Kolonkarzinom im Stadium UICC III zu einer Reduktion der Rezidivrate um 40% und zu einem erhöhten Überleben von 30%. Im Tumorstadium UICC II wird momentan, außer in klinischen Studien, eine Chemotherapie nicht durchgeführt, da keine signifikante Verminderung von Rezidiven festgestellt werden konnte (Andre et al. (2004)). Adjuvante Therapiere-gime für das Kolonkarzinom in den Stadien UICC II/III mit dem monoklonalen Antikörper Bevacizumab<sup>™</sup> zeigten zumindest für das erste Jahr einen deutlichen Vorteil in Bezug auf das rezidivfreie Überleben (Allegra CJ (2009)).

Die kontinenzerhaltende Resektion bei Rektum-Karzinomen erfordert eine Tumorlokalisation von mindestens 5 cm oberhalb der Linea dentata, da andernfalls die Sphinkterenmuskulatur verletzt würde. Hierbei ist heute die Totale Mesorektale Exzision (TME) die Therapie der Wahl, um eine Lokalrezidivierung weitestmöglich zu vermeiden. Liegt der Tumor unterhalb dieses Ortes, ist eine totale Rektumresektion mit Anlegung eines Kolostomas erforderlich. Eine Resektion von Lebermetastasen ist bei derzeitigem Stand dann sinnvoll, wenn eine radikale Resektion des Primärtumors erfolgreich war und keine anderen Fernmetastasen, zum Beispiel in Lunge oder Knochen, nachweisbar sind. In den Stadien UICC II und UICC III eines Rektumkarzinoms wird eine Bestrahlung des Beckens mit insgesamt 50 Gy empfohlen, da dies das Rezidivrisiko von circa 25% verringert.

Beim Rektumkarzinom in den Stadien UICC II und III ist aufgrund einer verminderten Rezidiv- und erhöhten Heilungsrate eine postoperative Radiochemotherapie indiziert. Daneben kann eine Cetuximab-Monotherapie und eine Cetuximab / Irinotecan-Kombinationstherapie bei Irinotecan-refraktärem metastasiertem Kolonkarzinom das Überleben verlängern (Dalerba et al. (2003); Cunningham et al. (2004); Hurwitz et al. (2004, 2005); Khamly et al. (2005)). Inzwischen zeigte sich in Studien eine kombinierte neoadjuvante Radiochemotherapie bezüglich des Auftretens von Lokalrezidiven als bestmögliche Therapie bei fortgeschrittenem Rektumkarzinom (Javle (2010)).

Vor der Einführung von immunologisch wirksamen Therapeutika wurde das kolorektale Karzinom wie die meisten soliden epithelialen Tumoren für relativ unempfänglich gegenüber einer Immunotherapie gehalten. Diese Erkenntnis wurde vor allem aus epidemiologischen Studien gewonnen, die zeigten, dass es wenig spontane Regressionsverläufe beim kolorektalen Karzinom gab. Auch führte die immunologische Therapie der ersten Generation zu keinen positiven Studienergebnissen. In den letzten 15 Jahren wurde jedoch auch in Bezug auf das kolorektale Karzinom Ergebnisse erbracht, die darauf hindeuten, dass das Immunsystem auf das Tumorwachstum und die Metastasierung Einfluss nimmt. Diese Annahme wird vor allem durch die Tatsache unterstützt, dass das Vorhandensein von CD8+ T-Zellen im Kolonepithel einen vorteilhaften prognostischen Faktor darstellt. Auch der Verlust von Klasse I HLA von Tumorzellen scheint dies zu bestätigen. Damit erscheint eine Vakzinierung auch in der Therapie des kolorektalen Karzinoms möglich und sinnvoll (Zitvogel et al. (1998)). Voraussetzung hierfür ist jedoch die Identifikation von geeigneten Tumor-assoziierten Antigenen (TAA) (Dalerba et al. (2003)). Antikörpergesteuerte Therapiekonzepte haben in den letzten Jahren eine gezieltere Therapie von Tumorerkrankungen ermöglicht. Insbesondere in der Therapie des Nierenzellkarzinoms und des Mammakarzinoms haben Antikörper-Therapien signifikante Vorteile in Bezug auf das Gesamtüberleben und das progressionsfreie Intervall erbracht (Mills et al. (2009); Chouhan et al. (2007); Viani et al. (2007); Cunningham et al. (2004); Hurwitz et al. (2004, 2005); Khamly et al. (2005)).

#### 2.2 Therapeutische Antikörperkonstrukte im Rahmen der ADEPT

Seit Ende der 70'er Jahre wurde damit begonnen, neue Ansatzpunkte für eine gezieltere Therapie von Tumorerkrankungen zu suchen. Die sogenannte 'targeted therapy' sollte Medikamente gezielt und spezifisch an den Tumor zu bringen, um eine dort lokalisierte Wirkung zu entfalten. Diese Therapieform sollte generalisierte unerwünschte Arzneimittelwirkungen vermeiden helfen und gleichzeitig die Applikation einer wirkungsvollen Dosis am Zielort ermöglichen. Mit seiner bahnbrechenden Arbeit zeigte Bagshawe, dass gezielte Therapien mittels einer von Antigen-geleiteten Antikörper-Applikation grundsätzlich möglich ist (Bagshawe (1990)).

Die Antibody-directed enzyme-prodrug therapy (ADEPT) benutzt fusionierte Antikörper-Enzym-Moleküle, um ein Enzym präzise zum Zielort zu bringen, damit dort lokal eine Medikamentenvorstufe zum wirksamen Medikament aktiviert werden kann, wie schematische in Abbildung 2.3 dargestellt. Dabei wandelt die Cytosin-Deaminase 5-Fluorocytosin (5-FC) in 5-Fluorouracil (5-FU) um. Dies wurde bereits erfolgreich im Rahmen der ADEPT angewandt (Wallace et al. (1994)). Wie gezeigt werden konnte, sind rekombinante Fusi-



Abb. 2.3: Mechanismus bei der antikörpergesteuerten Enzym-Prodrug Therapie (ADEPT)

14

onsantikörper klein genug, um zum Tumor diffundieren zu können und dementsprechend geeignet für ADEPT. Verschiedene derartiger Antikörper sind bisher beschrieben worden, darunter single-chain variable fragments (scFv). Diese scheinen die besten Eigenschaften hinsichtlich Diffusion und Verteilung im Gewebe zu haben, um solide Tumoren wirksam bekämpfen zu können (Bhatia et al. (2000)). Mit dem rekombinanten Fusionsantikörper gpA33scFv-CD konnte in vitro die lokal wirkende Toxizität von 5-FU um den Faktor 300 verstärkt werden unter Nachweis der Spezifität des AK (Deckert et al. (2003)). Die grundsätzliche Eignung der ADEPT-Therapie konnte bereits in Phase I-Studien gezeigt werden (Webley et al. (2001); Sharma et al. (2005); Sizeland & Burgess (1991); Welt et al. (2003)). Auch konnte die Spezifität des gpA33-Antikörpers verschiedentlich nachgewiesen werden. Klinische Studien zeigten, dass radiomarkierte gpA33-AK spezifisch an Kolonkarzinomzellen bindet. Im Gegensatz zu gesundem Kolongewebe, an dem es nach wenigen Tagen nicht mehr nachweisbar war, konnte es an den Tumorzellen noch nach mehreren Wochen gefunden werden (Welt et al. (1996, 1990)). Es konnte darüber hinaus bereits gezeigt werden, dass Radioimmuntherapie eine effektive adjuvante Therapieform in der Krebstherapie darstellen kann (King et al. (1995); Chong et al. (2005)). Dabei ist die Aufnahme von radiomarkierten monoklonalen Antikörpern umgekehrt proportional zur Größe des Tumors. Die Schädigung des Knochenmarks ist der limitierende Faktor bei der Therapie. 23 Phase-I/II-Studien, die die Möglichkeiten und Wirksamkeit der RIT untersuchten, konnten gefunden werden. In diesen Studien wurden 5 verschiedene Radionuklide und 15 Mabs gegen CEA, tumorassoziiertes Glykoprotein 72, epitheliale Zelladhäsionsmolekül, Kolon-spezifisches Antigen P und gpA33, vor allem bei Patienten mit fortgeschrittenem kolorektalem Karzinom, eingesetzt. Kein bestimmter Antikörper erwies sich als den anderen überlegen (Koppe et al. (2005)).

#### 2.3 gpA33 als Target für die immunologische Therapie

Erforderlich für die Anwendung von Antikörpern ist ein Antigen, welches geeignete Bindungs- und Affinitätseigenschaften besitzt. Darüber hinaus muss es ausreichende Spezifität aufweisen, damit die gewünschten Effekte wie maximierte lokale Wirkung und minimierte generalisierte Wirkung realisiert werden können. Als Antigen, das bisherigen Studien zufolge dieses geforderte Profil hat, erweist sich das gpA33-Antigen des Gastrointestinaltrakts (Garin-Chesa et al. (1996)).

GpA33 ist ein Marker für die basolaterale Seite von Epithelzellen des Gastrointestinaltraktes. Wie beschrieben, ist das gpA33-Antigen ein neu gefundenes Transmembranprotein vom Typ 1 mit 298 Aminosäuren. Es wird von zwei extrazellulären Ig-ähnlichen Domänen, einer transmembranalen Domäne und einer stark sauren cytoplasmatischen Domäne gebildet (Johnstone et al. (2000)). Das hydrophile gpA33 Protein hat drei unterschiedliche strukturelle Domänen: eine extrazelluläre mit 213 Aminosäuren, welche durch Sequenzierung von konservierten Überbleibseln (residues) zwei Immunglobulin-ähnliche Domänen aufweist, eine einzelne hydrophobe Transmembran-Domäne und einen stark polaren intrazellulären Schwanz mit vier aufeinanderfolgenden Cystein-Bausteinen. Dies legt die Vermutung nahe, dass gpA33 ein neuer Membranrezeptor oder ein neues Adhäsionsmolekül aus der Ig-Superfamilie ist (Heath et al. (1997)). GpA33 ist damit ein neues Mitglied der Immunglobulin-Superfamilie, die auch die Transmembran-Proteine CTX/ChT1, CTM/CTH und CAR beinhalten. Das Protein wird spezifisch auf der basolateralen Oberfläche von Zellen des GIT exprimiert. Somit ist gpA33 ein neuer Marker sowohl für Zellen des GIT in der Proliferation wie auch in der Ausdifferenzierung (Abud et al. (2000)). GpA33 kann als gewebsspezifisches Antigen des normalen physiologischen Zellgewebes des Kolons, Rektums und Intestinums wie auch derer entarteten Zellen bezeichnet werden. Einige humane Karzinomzelllinien zeigen eine starke Expression von gpA33 und können bis zu 800.000 Moleküle je Zelle binden. GpA33 wird nicht sezerniert und gebundene radiomarkierte gpA33 monoklonale Antikörper werden schnell internalisiert (Catimel et al. (1996, 1997)). GpA33 wurde als Zielstruktur für die Radioimmuntherapie beschrieben. Es konnte hierbei eine Verzögerung des Tumorwachstums erreicht werden (Barendswaard et al. (2001)). In-vitro-Studien zeigten, dass nach Bindung an das Oberflächenantigen gpA33 der Antikörper internalisiert wird, in cytoplasmatischen Vesikeln in die perinukleäre Region transportiert wird, um daraufhin wieder als intaktes Molekül an die Zelloberfläche rezirkuliert und dort dargeboten zu werden (Daghighian et al. (1996)). Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass Zellen des GIT Vesikel in der Größe von 30-90 nm Durchmesser freisetzen, die MHC I, MHC II, CD 63, CD 26 / Dipeptidyl-Peptidase IV und gpA33 enthielten (Ritter et al. (2001)). Dies weist auf eine Beteiligung der Zellen des GIT an der Antigen-Präsentation hin, die unter anderem unabhängig von direktem Zellkontakt mit Effektorzellen ist (Van Niel et al. (2001)). In den Exosomen, die von Zellen des GIT von Mäusen sezerniert werden, fanden sich neben MHC I und II und CD9, CD81, CD82 das für den GIT hochspezifische gpA33-Antigen (Mallegol et al. (2007)). Auch in den mesenterialen Lymphknoten war gpA33 nachweisbar, was für die Annahme spricht, dass eine exosomale Migration vom Epithel in die Lymphknoten stattgefunden hat (Mallegol et al. (2005)). Dies zeigt, dass epitheliale Exosomen Antigene präsentieren können (Van Niel et al. (2003); Zitvogel et al. (1998)). Daneben sind Adhäsionsmoleküle und Antigene für Zell-Zell-Interaktionen für ein Funktionieren von Karzinomentstehung und Ausbreitung von elementarer Bedeutung (Burgess (1998); Rescigno et al. (2001)). Es konnte gezeigt werden, dass gpA33 auch in Bezug auf Genexpression eine für den Gastrointestinaltrakt spezifisches Genexpressionsprofil aufweist (Johnstone et al. (2002)).

#### 2.4 Aufgabenstellung der Arbeit

Mit dieser Arbeit wird das Ziel verfolgt, gpA33 als geeignete Zielstruktur für Antikörpergesteuerte Therapieansätze zu charakterisieren und einen funktionierenden Antikörper für dieses Antigen in vitro einzuführen. Die Arbeit wird mit Zellkulturen verschiedener Zelllinien und Gewebsschnitten von gesundem Kolonepithel und Kolonkarzinom durchgeführt.

Die Darstellung des auf der Zelloberfläche befindlichen Antigens gpA33 wird mit dem Antikörper gpA33::rbGFP unternommen. Dieser Antikörper wurde durch unsere Arbeitsgruppe rekombinant hergestellt (Petrausch et al. (2007); Coelho et al. (2007)). Hierbei dient das mit dem eigentlichen Antikörper verbundene fluoreszierende GFP (Green Fluorescent Protein) als Marker für die Signaldetektion in der Durchflusszytometrie und zur Visualisierung in der Fluoreszenz- und konfokalen Lasermikroskopie.

Als erster Schritt erfolgt die genaue Charakterisierung von gpA33. Im einzelnen soll untersucht werden, ob der Antikörper für das Zielantigen Spezifität aufweist, um eine lokalisierte Wirkung zu erreichen. Desweiteren wird die Affinität bzw. Avidität des Antikörpers in Bezug auf das Antigen ermittelt. Methode hierfür sind die Durchflusszytometrie (FACS) und mikroskopische Bildgebungsverfahren sowohl an Zellkulturzellen als auch an Gewebsschnitten. Daneben wird der Grad der Expression von gpA33 unter verschiedenen Bedingungen untersucht. Zum einen wird die Dichte des Wachstums der Zellkulturen, die Konfluenz, als Einflussgröße verwendet. Zum anderen wurden die Zellen im Zellzyklus phasenspezifisch arretiert, um zu überprüfen ob und wie die Expression des Antigens von der Zyklusphase abhängt. Methoden für diese Untersuchungen waren die Durchflusszytometrie sowie die Echtzeit-PCR (Polymerase Chain Reaction).

Die Untersuchung des Verhaltens des Antikörpers nach Bindung am Antigen wird mit der konfokalen Laser-Scanning-Mikroskopie durchgeführt. Hierbei soll insbesondere Internalisierung, Prozessierung und Rezirkulation des Antigen-Antikörper-Fusionsmoleküls nach Bindung von gpA33-GFP an der Zellmembran untersucht werden.

Die Charakterisierung von gpA33 erfolgt zur weiteren Evaluation von Therapieoptionen. Insbesondere die Rolle von gpA33 in Zell-Zell-Interaktion und im Zellverband als Adhäsionsmolekül kann bei Ausbreitung von Karzinomzellen und Metastasierung gezieltere und präzisere Therapieansätze ermöglichen. Eine Untersuchung des Verhaltens von gpA33 im Zellzyklus könnte bei phasenspezifischer Expression des Antigens neue mehrstufige Therapieansätze ermöglichen.

# 3 Material und Methoden

### 3.1 Material

## 3.1.1 Verbrauchsmaterialien

Produkt	Hersteller
Agarose SEKEM LE	Biozym, Hessisch Oberdorf
Aphidicolin	Sigma, Taufkirchen
DMEM	GibcoBRL, Karlsruhe
dNTP	Roche Diagnostics, Mannheim
Ethanol	J. T. Baker, Deventer, Niederlande
Ethidium Bromid	Sigma, Steinheim
Falcon tubes versch. Größe	BD, Heidelberg
Fetal Calf Serum FCS	GibcoBRL, Karlsruhe
Formaldehyd	Roth, Karlsruhe
Fotofilme	Kodak
Glasplättchen	Menzel, Braunschweig
Glycerin	Roth, Karlsruhe
GITC	Roth, Karlsruhe
Hybond C Transfer Membran	Amersham Pharmacia, Freiburg
L-Glutamin	GibcoBRL, Karlsruhe
L-Mimosine	Sigma, Taufkirchen
MEM Earle's Medium	PAN, Aidenbach
Methanol	Roth, Karlsruhe
Mikrotom	Leica Microsystems, Nussloch
Nocodazole	Sigma, Taufkirchen
PBS Dulbecco's	GibcoBRL, Karlsruhe
PCR Puffer	Roche Diagnostics, Mannheim
Penicillin	Serva, Heidelberg

Pipetten	BD, Heidelberg
Pipettenspitzen	Biozym, Heidelberg
Primers (Oligo, Random)	Roche Diagnostics, Mannheim
Propidium-Iodid	Roche Diagnostics, Mannheim
RNAse A	Roche Diagnostics, Mannheim
RPMI 1640	GibcoBRL, Karlsruhe
Streptomycin	GibcoBRL, Karlsruhe
Tris-(Hydroxymethyl-)Aminomethan (Tris)	Roth, Karlsruhe
Trypan blue	Sigma, Taufkirchen
Trypsin Typ 1	Sigma, Taufkirchen
Whatman Papier	Bio-Rad, München
Zellkulturflaschen versch. Größe	NUNC, Wiesbaden
Zellschaber	Sarstedt, Nümbrecht
Zentrifugenfilter	Millipore, Schwalbach

## 3.1.2 Lösungen für Soluibilisierung, Waschen und Immunpräzipitation

# PBS (Phosphat-gepufferte NaCI-Lösung)

NaCl	128 mM	
KCI	2,7 mM	
$Na_2HPO_4$	8 mM	Elektrophorese-Laufpuffer
$KH_2PO_4$	1,5 mM	
in H $_2$ O	pH 7,4	

#### 3.1.3 Zelllinien

Colo 205	American Type Culture Collection, Manassas, USA
HT 29	American Type Culture Collection, Manassas, USA
K 562	American Type Culture Collection, Manassas, USA
LIM 1215	Ludwig Institute of Cancer Research Melbourne Branch, Australia
MKR	American Type Culture Collection, Manassas, USA

#### 3.1.4 Kits

## RNeasy Mini Kit, Qiagen, Hilden

Diese Methode erlaubt die Isolierung von RNA aus Zellen mittels eines Microspin-Verfahrens. Hierzu werden zunächst die Proben in Gegenwart des RNAse-inaktivierenden Guanidinisothiocyanats (GITC) lysiert und homogenisiert. Nach Zugabe von Ethanol, welches die Bindungseigenschaften der Silica-Gel-Membran stabilisiert, wird die Probe auf die Säule gegeben. Hier bindet die RNA und wird nach Waschen eluiert. Dieses Verfahren wurde zur RNA-Isolierung aus verschiedenen Zelllinien angewandt.

Omniscript Reverse Transpriptase Kit, Qiagen, Hilden

## 3.1.5 Laborgeräte

Produkt	Hersteller
Digitalkamera	Olympus, Hamburg
Elektrophoreseausstattung Mini-	Bio-Rad, München
PROTEAN 3 Cell	
Elektroporator GenePulser	Bio-Rad, München
Entwickler Optimax TR	MS Laborgeräte
FACScalibur Flow Cytometer	BectonDickinson, Heidelberg
FACSscan Flow Cytometer	BectonDickinson, Heidelberg

Feinwaage Universal Sartorius, Göttingen Fluoreszenzmikroskop Carl Zeiss, Jena Gelkammer für Agarosegel Horizon 58 GibcoBRL, Karlsruhe Konfokales Laser-Scanning-Carl Zeiss, Jena Mikroskop LSM 510 Laborwaage Sac 52 SCALTEC, Heilgenstadt LightCycler System Roche Diagnostics, Mannheim Mikrotom 2800 FrigoCut E Leica Microsystems, Wetzlar Mikrowelle Moulinex Moulinex, Solingen Nebauer Zählkammer Carl Zeiss, Jena NanoDrop ND-1000 Nanodrop Prod., Wilm., US PCR Thermocycler MultiCycler PCT 200 Biozym, hess. Oldendorf Photometer GeneQuant II Pharmacia Biotech, Freiburg Pipettierhilfe Eppendorf-Pipette Eppendorf, Hamburg Pipettierhilfe pipetus-akku Hirschmann, Eberstadt Power Supply Power Pac 300 Bio-Rad, München Power Supply PS 305 GibcoBRL, Karlsruhe Schüttler/Inkubator SI 50 Dunn Labortechnick, Asbach Semidry Blot Transferkammer Transblot SD Bio-Rad, München Sofortbildkamera Polaroid Polaroid, Offenbach Thermoblock Biometra Biometra, Göttingen Eppendorf, Hamburg Thermomixer Eppendorf 5436 Tischzentrifuge Eppendorf 5415 C Eppendorf, Hamburg UV Schirm Reprostar II Lamag, Berlin Vortexer VF 2 **IKA-Labortechnik** Wasserbad Merk Eurolab, Berlin Zentrifuge Eppendorf 5402 Eppendorf, Hamburg

#### 3.2 Methoden

#### 3.2.1 Kulturbedingungen und Zellkultivierung

Die Behandlung der Zellkulturen und die Prozessierung der Zellen, Antikörper und Suspensionen erfolgte grundsätzlich nach allgemein anerkannten und veröffentlichten Protokollen (Mellman et al. (1998); Mellman (2005); Trombetta & Mellman (2005)). Die Zellen der adhärent wachsenden Zelllinien CaCo2, Colo 205, LIM 1215, MKR wurden in Kulturflaschen mit einer Bodenfläche von 75 cm<sup>2</sup> inkubiert. Für die nicht adhärent wachsende Zelllinie K562 wurden diesselben Kulturflaschen verwendet. Als Kulturmedium wurde RPMI 1640 mit 2% stabilisiertem N-acetyl-L-Alanin-L-Glutamin und 2,0 g/l NaHCO<sub>3</sub> unter Zugabe von 10% fetalem Kälberserum (FCS), 100 Units/ml Penicillin, 100  $\mu$ g/ml Streptomycin mit einem Gesamtvolumen von 30 ml je Flasche verwendet. Die Inkubation erfolgte in einer Atmosphäre von 95 % Luft und 5 % CO<sub>2</sub> bei 37°C. Jeden 2. Tag wurde das Kulturmedium ausgetauscht. Nach Erreichen der Konfluenz wurden die Zellen in neue Kulturflaschen in einem Verhältnis von 1 zu 3 umgesetzt. Überzählige Zellen wurden verworfen.

Im Rahmen der Zellkultivierung wurde unter sterilen Arbeitsbedingungen gearbeitet. Die Zubereitung der Lösungen und Medien sowie das Umsetzen der Zellen erfolgte unter einer Arbeitsbank.

Zur weiteren Verarbeitung in Zellexperimenten wurden die Zellen nach Absaugen und Verwerfen des Mediums und Zugabe von 10 ml PBS mit einem Zellschaber von der Bodenfläche der Flasche entfernt. Anschließend wurde die Zellsuspension zum Zwecke der Reinigung wiederholt bei 1000 Umin<sup>-1</sup> zentrifugiert und in 5 ml PBS resuspendiert. Vor der Verwendung im Experiment wurden die Zellen gezählt. Dazu wurden 20  $\mu$  I der Zellsuspension mit 20  $\mu$ I Trypan Blue angefärbt und anschließend in der Neubauer-Zählkammer gezählt.

#### 3.2.2 Fluoreszenzmikroskopie

Zur Sichtbarmachung der auf der Zelloberfläche vorhandenen gpA33-Antigene wurden Zellen verschiedener Zelllinien mit gpA33::rbGFP inkubiert und dann mittels Fluoreszenz-

mikroskopie beurteilt und fotografiert. Hierzu wurden die in der Kulturflasche bis zur Konfluenz gewachsenen Zellen der Zelllinie LIM 1215 durch Abschaben und Resuspension in eine Einzelzellsuspension in 10 ml PBS gebracht. Zellen der nicht adhärent wachsenden Zelllinie K562 wurden in gleicher Konzentration in PBS gebracht. Anschließend erfolgte jeweils die Inkubation der Zellen mit 1000  $\mu$ l gpA33::rbGFP, bzw. 1000  $\mu$ l gpA33CD, 1000  $\mu$ l DAPI [1  $\mu$ g/ml] und 1000  $\mu$ l PBS (Negativkontrolle). Nach einer 20-minütigen Inkubation auf dem Shaker bei 700 U/Min wurden die Zellen drei Mal gewaschen und schließlich in 100  $\mu$ l PBS resuspendiert. Von dieser Suspension wurden 20  $\mu$ l auf einem Objektträger platziert und ein Deckglas aufgebracht. Danach erfolgte die Mikroskopie und fotografische Dokumentation. Das hierfür verwendete Fluoreszenzmikroskop emittiert Licht mit einer Wellenlänge von 325-345 nm. Die Fluoreszenz des GFP wird durch die Abstrahlung von grünem Licht sichtbar.

#### 3.2.3 FACS

Die Durchflusszytometrie (Fluorescence-activated Cell Scanner, FACS) ist ein Verfahren, das die Untersuchung von Zellen auf verschiedene Eigenschaften erlaubt. Das Prinzip der durchflusszytometrischen Messung beruht auf der Emission von optischen Signalen durch Zellbestandteile, die durch einen Laserstrahl evoziert wird. Hierzu werden Zellen, die sich in Einzelzellsuspension befinden, von einer Kapillare angesaugt und einzeln an einem Laserstrahl vorbeigeführt. Beeinflusst von Zellgröße, der Beschaffenheit der Membran und vom Vorhandensein intrazellulärer Bestandteile wird Licht gebeugt und gebrochen. Mit dem Forward Scatter (Vorwärtsstreulicht), der die Beugung des Lichtes misst, kann die Zellgöße ermittelt werden. Der Side Scatter (Seitwärtsstreulicht) misst die Lichtbrechung und ermöglicht so die Charakterisierung intrazellulärer Kompartimente. In Anwesenheit von Antikörpern, die fluoreszierende Eigenschaften haben, kann darüber hinaus eine Aussage über das Vorhandensein verschiedener spezifischer Antigene auf der Oberfläche der untersuchten Zellen getroffen werden. Hierbei wird der Umstand ausgenutzt, dass Anregung und Fluoresenz bei verschiedenen Wellenlängen erfolgen (Robinson et al. (1999)).

In der vorliegenden Arbeit wurden die Zellen auf das gpA33-Antigen und auf Propidium lodid mit den jeweils geeigneten Emissionsmaxima bei 520 nm, bzw. 650 nm untersucht.

Die Durchflusszytometrie wurde auf den Durchflusszytometern FACScalibur und FACSscan (Becton & Dickinson, Heidelberg) durchgeführt und mit der CellQuest Software desselben Herstellers ausgewertet.

Die Untersuchung auf das gpA33-Antigen erfolgte mit gpA33::rbGFP supernatant, einem aus Hefezellen gewonnenen monoklonalen Antikörper gegen gpA33, der zur Signaldetekion mit einem fluoreszierenden Protein (GFP) verbunden ist. Zur Messung der Fluoreszenz wurden die Zellen mit dem Zellschaber in Einzelzellsuspension gebracht und eine definierte Anzahl von Zellen mit einem definierten Volumen des Antikörpergemisches inkubiert. Zellzahl und Volumen variierten in den verschiedenen Versuchsreihen. Die Inkubation erfolgte, sofern nicht anders angegeben, für 30 Minuten bei Raumtemperatur unter UV-Abschirmung. Durch wiederholte Zentrifugation und Resuspension in PBS wurden die Zellen gewaschen, um so das Risiko einer Messung unspezifisch gebundener Fluoreszenz zu minimieren. Anschließend wurden, wiederum abhängig vom jeweiligen Versuchsaufbau, 100.000-300.000 Zellen jeder Probe analysiert. In der Auswertung wurde zum Zwecke der interexperimentellen Vergleichbarkeit ein 'Gate' definiert, das mit hoher Wahrscheinlichkeit tote Zellen und Zelldetritus ausschloss, um so ausschließlich die Fluoreszenz intakter Zellen zu messen. Dieses Gate (R1) wurde für jede Messsitzung festgelegt und durchgehend angewandt.

Um ein Maß für die Expression des gpA33-Antigens auf der Zelloberfläche zu erhalten, wurde der Median der Fluoreszenz der verschiedenen Messreihen als Grundwert genommen und aus den jeweiligen Paarmessungen 'Inkubation mit Antikörper' gegen 'nativ' ein Quotient gebildet. Dieser Quotient ergab somit einen zur Antigen-Expression der Zelle proportionalen Wert.

Die Überprüfung des Erfolgs der Zellsynchronisation durch DNA-Markierung erfolgte mit der Inkubation mit Propidium Iodid (PI). Nachdem die Zellen mit einer fünfprozentigen Formaldehyd-Lösung in PBS für die Dauer von 15 min fixiert wurden, erfolgte eine Inkubation in 100% Ethanol bei -20°C. Nach 16 Stunden Inkubation wurde die DNA mit Propridium Iodid (50  $\mu$ g/ml) und RNAse A (50  $\mu$ g/ml) markiert. Nach einer Inkubation bei 20°C in Dunkelheit für 10 Stunden erfolgte die FACS-Analyse mit mindestens 10.000 Zellen auf dem FACScalibur. Die Einordnung der jeweiligen Proben in die Zyklusphase erfolgte protokollkonform (Vasquez et al. (1997); Oertl et al. (2005); Zalatnai (2005); Korfiatis et al. (2001)).

## 3.2.4 Zellsynchronisierung

Nach Verbringung der Zellen der Zelllinie LIM 1215 in Einzelsuspension erfolgte die Synchronisierung der Zellen. Hierzu wurde L-Mimosine (300  $\mu$ M) zur Arretierung in G1, Aphidicolin (15  $\mu$ M) zur Arretierung in S und Nocodazole (400 nM) zur Arretierung in G2/M zugegeben (Korfiatis et al. (2001); Vasquez et al. (1997); Oertl et al. (2005); Zalatnai (2005)). Nach 20 Stunden Inkubation wurden die Zellen nach mehrfachem Waschen in frisches Medium eingebracht und damit die Zyklusarretierung aufgehoben. Nachdem die Zellen weitere 24 Stunden unter Zellkulturbedingungen inkubiert waren, erfolgten die Messungen.

## 3.2.5 Real-time PCR

## RNA-Isolierung gemäß dem Qiagen Protokoll

Nach der Zellzählung mittels Trypan-blue-Färbung, wurden  $1 \cdot 10^6$  Zellen zweifach mit PBS gewaschen und in 1000  $\mu$ l Guanidinium Isothiocyanate (GITC) zum Zwecke der RNA-Freisetzung Iysiert. Anschließend wurde die Gesamt-RNA mit dem RNeasy Mini Kit® und RNase-Free DNase Set® wie folgt isoliert. Nach Homogenisierung der Zellproben in 1000  $\mu$ l 70% Ethanol wurde die Lösung auf die Säulen aufgebracht und mit 14.000 Umin<sup>-1</sup> 15 Sekunden lang zentrifugiert. Ein Waschschritt mit 350  $\mu$ l RW1 Puffer folgte. Anschließend wurden die Proben mit 10  $\mu$ l Desoxyribonuklease (DNAse), die zuvor in 70  $\mu$ l RDD Puffer gelöst worden war, 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Weitere Waschschritte mit 350  $\mu$ l RW1-Puffer, RPE-Puffer (15 Sekunden bzw. 2 Minuten) folgten. Schließlich wurde die Gesamt-RNA von der Säule mit 53  $\mu$ l RNase-freiem Wasser mittels 1-minütiger Zentrifugation bei 14.000 Umin<sup>-1</sup> eluiert. Die RNA-Proben wurden bei -80°C gelagert.

## Qualitative und quantitative Bestimmung der Gesamt-RNA

Proben der Gesamt-RNA wurden im Verhältnis 1:1 mit Bromphenol-Blau für die quali-

tative Bestimmung in der Gelelektrophorese und im Verhältnis 1:10 mit RNAse-freiem Wasser für die quantitative Bestimmung mittels Spectrophotometrie verdünnt.

Der gelelektrophoretische Nachweis von RNA beruht auf dem Prinzip, dass in einem Gleichspannungsfeld RNA-Fragmente in Abhängigkeit von ihrem Molekülmasse mit unterschiedlicher Geschwindigkeit wandern. Daraus folgt, dass nach einer gewissen Zeit die jeweiligen Fragmente unterschiedliche Strecken im Gel zurückgelegt haben. Zur Abschätzung der Molekulargröße des zu untersuchenden Fragments, werden Fragmente mit bekanntem Molekulargewicht (Marker) angelegt.

Die Sichtbarmachung der RNA erfolgt mit Ethidiumbromid, das mit den Nukleinsäuren der Proben interkaliert und mittels UV-Licht zur Fluoreszenz gebracht wird.

Agarose wurde in MESA-Puffer von 0,3 % gelöst und in der Mikrowelle bei 700 W bis zum Aufkochen erwärmt. Nach Zugabe von Ethidiumbromid im Verhältnis von 1  $\mu$ I Ethidiumbromid je 20 ml Gel wurde das flüssige Gel in eine Gelkammer mit Gelkamm gegossen. Sobald das Gel eine feste Konsistenz zeigte, wurde es mit 0,5-facher TBE-Puffer-Lösung belegt. Nach dem Entfernen des Gelkamms wurden die mit Bromphenolblau in 50 % Glycerol versetzten RNA-Proben sowie ein Marker in die Geltaschen eingebracht. Anschließend erfolgte die Spannungsanlage mit 100 V. Aufgrund der negativen Außenladung der RNA wanderten die Fragmente Richtung Anode. Die Spannung wurde solange aufrecht erhalten, bis die vordere Grenze ca. 2/3 der gesamten Kammer erreicht hat. Die Ergebnisse wurden mit UV-Licht von einer Wellenlänge von 302 nm sichtbar gemacht und fotografiert. Die Analyse und Dokumentation des RNA-Gels erfolgte mit der AlphaEaseFC software Version 4.0 (Alpha Innotech, CA, USA).

Die Spektrophotometrie erfolgte mittels konventioneller Messung und mit dem 'NanoDrop'– Spectrophotometer.

Die Methode der Spektrophotometrie beruht auf dem Grundsatz, dass die Absorption von Licht durch vorhandene RNA proportional zu ihrer Quantität ist. Die Absorption der RNA wurde, wie üblich, bei Wellenlängen von 260 nm und 280 nm gemessen. Eine Absorption von 1 bei 260 nm entspricht einer RNA-Konzentration von 40  $\mu$ g/l. Dementsprechend wurde die quantitative Messung der RNA durchgeführt und die jeweiligen Konzentration nen von RNA errechnet. Die Reinheit der RNA wurde mittels des Quotienten A260/A280

- die Absorption bei 260 nm ins Verhältnis gesetzt mit der Absorption bei 280 nm - bestätigt. Dieser Quotient sollte bei 2,0 liegen; niedrigere Werte weisen auf eine Kontamination der RNA durch andere Proteine hin.

Die Quantifizierung der RNA mit dem NanoDrop ND-1000 erfolgte gemäß dem Herstellerprotokoll. Nach dem Starten des Programms 'Nucleid Acids', wurde zunächst 1  $\mu$ l deionisiertes Wasser als Leerprobe eingebracht. Anschließend wurde, jeweils im Wechsel mit Spülung, 1  $\mu$ l jeder Probe gemessen. Die Konzentration und Reinheit der einzelnen Proben wurden von der Software nach den oben unter 'konventionelle Spektrophotometrie' dargelegten Grundsätzen ermittelt.

## Synthese der komplementären Desoxyribonukleinsäure (cDNA)

In der Transkription werden Abschnitte der DNA des Genoms in mRNA (messenger Ribonucleic Acid) überschrieben. Es existieren jedoch Viren, die die Richtung dieses Prozesses umgedreht haben, um in das Genom des Wirts Informationen zu integrieren. Sie werden dementsprechend Retroviren genannt. Diese Viren besitzen ein Enzym, die reverse Transkriptase, welches die mRNA in cDNA (komplementäre Desoxyribonukleinsäure) umschreiben kann.

Der Prozess der reversen Transkription wird sich in der Molekularbiologie zunutze gemacht, um aus extrahierter RNA eine komplementäre DNA zu erhalten.

In dieser Arbeit wurde die Synthestisierung der cDNA mit dem Omniscript Reverse Transcriptase Kit® gemäß dem Herstellerprotokoll wie folgt durchgeführt. Die bei -80°C gelagerte RNA wurde auf Eis aufgetaut. Nach Berechnung wurden 2  $\mu$ g RNA in 15  $\mu$ l RNAse-freiem Wasser aufgelöst. Nach 5-minütiger Inkubation bei 65°C zur Zerstörung der Sekundärstruktur der RNA wurde die Lösung auf Eis gelegt. Für jede zu transkribierende Probe wurde ein Gemisch von 7.5  $\mu$ l mit folgenden Bestandteilen zubereitet: 1  $\mu$ l Oligonucleotides p(dT) 15 primer [0,8  $\mu$ g/ml], 1  $\mu$ l Random p(pT)6 Primer [0,2  $\mu$ g/ml], 2  $\mu$ l of desoxynucleotide triphosphate (5 mM), 0,5  $\mu$ l of RNasin (40 units/ml), 1  $\mu$ l of Omniscript Reverse Transcriptase (4,5 units/ $\mu$ l) and 2  $\mu$ l Reverse Transcriptase Buffer (x10). Mit diesem Gemisch wurde die RNA-Proben bei 37°C eine Stunde lang inkubiert. Anschließend wurde die Reverse Transcriptase durch Erhitzen auf 95°C für die Dauer von fünf Minuten inaktiviert. Die cDNA wurde bei -20°C gelagert.

## Polymerase-Kettenreaktion in Echtzeit (real-time polymerase chain reaction)

Die Polymerase Chain Reaction (PCR) ist eine Methode zur Vervielfältigung von bereits vorhandenem DNA-Material. Dies wird durch den Gebrauch von künstlichen Oligonucleotiden ermöglicht(Meuer et al. (1999)). In Gegenwart aller erforderlichen Reagentien, kann die Vervielfältigung durch zyklische Temperaturveränderungen herbeigeführt werden. Dies geschieht in drei Schritten: Denaturierung der DNA-Struktur, Aneinanderfügen von Primern mit DNA, Verlängerung.

In der konventionellen PCR sind Messung und Analyse zwei voneinander getrennte Prozesse. Die mit der DNA-Vervielfältigung zeitgleich ablaufende Analyse wurde durch eine neue Generation von Cycler-Systemen ermöglicht. Das für diese Arbeit verwendete System führt Temperaturveränderungen mit einer Geschwindigkeit von bis zu 20°C /s durch. Ein PCR-Zyklus kann somit in weniger als 30 Sekunden vonstatten gehen (Fig. 2.3.7.1).

Genauigkeit und Sensitivität werden durch Fluoreszenzmessungen zu definierten Zeitpunkten, an denen die Signalintensität zur Menge des PCR-Produkts proportional ist, gewährleistet (Wittwer et al., (1997)). Für die Analyse wichtig ist die Tatsache, dass die Menge der PCR in den ersten Zyklen exponentiell ansteigt, um dann ein Plateau zu erreichen. Um die Genauigkeit der Messung zu überprüfen, werden diese ersten Zyklen herangezogen, da in dieser Phase das interessierende Signal leicht vom Hintergrundrauschen unterschieden werden kann und so exakte Aussagen über die Anfangskonzentrationen der gemessenen Zielsequenzen ermöglicht.

Alle Proben wurden auf die cDNA von Porphobilirubin Deaminase (PBGD) und gpA33 untersucht. Diese Messung erfolgte in Duplikaten. Als quantitativer Wert wurde der Mittelwert der Doppelmessungen errechnet. Die Plasmide wurden mit PCR-Produkten von MDR1, MRP1, LRP und PBGD in den Vektor pCR2.1-Topoisomerase (Invitrogen, Karlsruhe, Germany) geklont. Zur Ermittlung einer Standardkurve wurden die rekombinaten Vektoren seriell in Wasser mit 0,4 g/l Polyadenylsäure verdünnt. Mit der jeweiligen Plasmid-Probe und den Verdünnungen (1, 0.1, 0.001 pg/ml) wurde mit jedem PCR-Lauf eine Standardkurve erstellt. Ebenso wurde für jeden Lauf zwei Negativ-Proben – Reverse-Transkriptase-negativ bzw. Zugabe von Wasser – gemessen. Die Datenauswertung erfolgte mit der LightCycler Software Version 3.0 der Firma Roche Diagnostics. Die Kreuzungspunkt ('crossing points') wurden mit dem Second Derivative Maximum Algorithmus

berechnet und gegen die Standardkurven gesetzt. PBGD diente als sogenanntes Housekeeping Gen, um die errechneten Mengen von gpA33-cDNA mit der jeweiligen Stoffwechsellage der Zellen ins Verhältnis setzen zu können. Schließlich wurde ein Quotient aus gpA33-Quantität und PBGD-Quantität gebildet, um eine plausible Vergleichbarkeit der Proben zu erhalten.

Um das Kontaminationsrisiko zu minimieren, wurden die verschiedenen Schritte RNA-Isolierung, cDNA-Synthese und PCR-Lauf in verschiedenen Labors durchgeführt.

#### 3.2.6 Konfokale Laser-Scanning-Mikroskopie

Die Visualisierung und Analyse der membranständigen gpA33-Expression und deren Aufnahme in die Zelle erfolgten über ein konfokales Laser-Scanning-Mikroskop, das mit einem Argon-Laser ausgestattet ist. Für die Aufnahmen wurde ein Plan-Apochromat 63x/-1,4-Objektiv oder ein Alpha-Plan-Fluar 100/1,45-Objektiv benutzt. Die zu untersuchenden Zellen wurden nach Konfluenzerreichung in Einzelzellsuspension gebracht und 500  $\mu$ l in einer Konzentration von 1·10<sup>6</sup> Zellen/ml auf Deckplättchen mit einem Durchmesser von 24mm aufgebracht. Nach Zugabe von Kulturmedium (s.o.) wurden die Zellen bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> inkubiert. 24 Stunden später wurden die Zellen unter mikroskopischer Kontrolle mit 25-fach verdünntem gpA33::rbGFP Überstand, welcher zuvor mittels Zentrifugation durch Zentrifugenfilter auf eine 25-fache Konzentration gebracht worden war, inkubiert.

Für das GFP-markierte gpA33-Antigen wurde ein Hauptfarbteiler mit einer Wellenlänge von 458 nm und ein Langpassfilter mit einer Wellenlänge von 505 nm des Argon-Lasers verwendet. Das vom GFP emittierte Licht wurde mit einem 460-500 nm Bandpassfilter aufgezeichnet. Die Einstellungen der optischen Blenden entsprachen einer optischen Schichtdicke von ca. 1  $\mu$ m. Die Dokumentation erfolgte mit Hilfe der LSM-510-Software Version 3.2 von Carl Zeiss.

## 3.2.7 Protein-Konzentration

Zur Gewinnung des Antikörpers in für die konfokale Laser-Scanning-Mikroskopie geeigneter Konzentration, wurde gpA33::rbGFP Überstand mittels Ultrafiltration gereinigt. Hierzu wurden der Anleitung des Herstellers entsprechend 15 ml des Antikörpergemisches in einen Millipore Amicon Filter gegeben und bei 5000 Umin<sup>-1</sup> zentrifugiert. Den hier verwendeten Filter passieren Moleküle bis zu einem Molekülmasse/Molekulargröße von 15 kDa. Damit ist der Antikörper gpA33::rbGFP mit seinem Molekulargewicht von 63 kDa im Filter verblieben. Je nach Dauer der Zentrifugation, bzw. Wiederholung der Schritte ließen sich verschiedene Konzentrationen des Antikörpers gewinnen.

## 4 Ergebnisse

# 4.1 Darstellung der Expression von gpA33 an Kolonkarzinomzellen der Zelllinie LIM1215 mittels Fluoreszenzmikroskopie

Es wurden Kolonkarzinomzellen der Zelllinie LIM 1215 mit gpA33::rbGFP inkubiert und fluoreszenzmikroskopisch untersucht. Demselben Prozedere wurden zum Vergleich A33 negative Leukämiezellen der Blastenlinie K 562 unterzogen. Bei den mit gpA33::rbGFP



(a) LIM 1215 nativ (500x)



(b) LIM 1215 nach Inkubation mit gpA33::rbGFP

(c) K 562 nach Inkubation mit gpA33::rbGFP

Abb. 4.1: Fluoreszenzmikroskopie an den Zelllinien LIM 1215 und Vergleichslinie K 562

inkubierten Kolonkarzinomzellen (Abb. 4.1(b)) ist sowohl im Vergleich zur Nativkontrolle (Abb. 4.1(a)) wie auch im Vergleich zur Negativkontrolle (Abb. 4.1(c)) eine deutliche Fluoreszenzverstärkung zu beobachten. Die in Abb. 4.1(b) angegebene Skala gilt für auch für Abb. 4.1(a) und Abb. 4.1(c). Die Anfärbung der Zellen der Leukämiezellreihe K 562 zeigt nach Anfärbung das für die Färbung mittels GFP-gekoppelter Antikörper typische Hintergrundrauschen.
# 4.2 Spezifität: Fluoreszenzmikroskopische Untersuchung der A33-Expression an gesundem und veränderten Gewebe

Resektate, die während Operationen bei kolorektalem Karzinom gewonnen wurden, wurden per Mikrotom geschnitten und mit gpA33::rbGFP angefärbt. Die Untersuchung erfolgte unter dem Fluoreszenzmikroskop. Die Abbildung 4.2 zeigt Gewebsschnitte aus gesundem Gewebe in 500-facher Vergrößerung unter Durchlicht- (Abb. 4.2(a)) bzw. Fluoreszenzmikroskop (4.2(b)). Abbildung 4.3 zeigt Gewebsschnitte eines kolorektalen Kar-



(a) Durchlichtmikroskopie



(b) Fluoreszenzmikroskopie

Abb. 4.2: Gesundes Gewebe des Colon-Epithels nach Inkubation mit gpA33::rbGFP in 500facher Vergrößerung (Durchlicht bzw. Fluoreszenz-Mikroskopie)

zinoms in 500-facher Vergrößerung unter Durchlicht- (Abb. 4.3(a)) bzw. Fluoreszenzmikroskop (Abb. 4.3(b)). Es zeigt sich eine Intensitätssteigerung der Fluoreszenz im maligne transformierten Gewebe des kolorektalen Karzinoms im Vergleich zum gesunden Gewebe. Die Fluoreszenzanreicherung zeigt sich vorrangig im perizellulären Raum, beziehungsweise an der Zelloberfläche der Karzinomzellen. Die intrzelluläre Signalanhebungen stellen möglicherweise internalisierte Antigen-Antikörper-Komplexe dar.

# 4.3 Affinität, Avidität, Dissoziation von gpA33::rbGFP–Fluoreszenz zu verschiedenen Zeitpunkten nach Inkubation mit gpA33::rbGFP

Es wurden Zellen der humanen Kolonkarzinom-Zelllinie LIM1215 mit gpA33::rbGFP protokollgemäß inkubiert. Zu verschiedenen Zeitpunkten nach Inkubation wurde eine FACS-



(a) Durchlichtmikroskopie

(b) Fluoreszenzmikroskopie

Abb. 4.3: Adeno-Karzinom des Kolons nach Inkubation mit gpA33::rbGFP in 500facher Vergrößerung (Durchlicht bzw. Fluoreszenz-Mikroskopie)

Analyse zur Bestimmung der Fluoreszenzintensität durchgeführt. Abbildung 4.4 zeigt die Fluoreszenzintensität von gpA33::rbGFP über der Zeit. Die auf der y-Achse aufgetragene Fluoreszenz wurde als Quotient zwischen dem per FACS-Analyse ermittelten Werten der mit dem Antikörper gpA33::rbGFP inkubierten Zellen und nativen Zellen errechnet. Ein Cut-Off-Wert wurde auf eine Ratio von 1,5 festgelegt, um Autofluoreszenz und Hintergrundrauschen zu berücksichtigen. Es zeigt sich eine deutliche Fluoreszenzzunahme



Abb. 4.4: Fluoreszenz über die Zeit

über die Zeit, die schon 60 Minuten post inkubationem ihr Maximum erreicht. Danach ist eine Stabiliät in der Fluoreszenzintensität zu sehen. 3 Tage nach Inkubation zeigt sich eine Fluoreszenzabnahme bis auf den Ausgangswert, jedenfalls unter eine Ratio von 1,5.

## 4.4 Entwicklung des Expressionsgrads von gpA33 am Beispiel verschiedener Tumorzelllinien mittels Durchflusszytometrie (FACS) über sieben Tage

Tumorzellen der Zelllinien LIM 1215, CaCo 2, K 562 wurden in jeweils 6 Kulturflaschen in Kultur gebracht. An sechs aufeinander folgenden Tagen erfolgte zur selben Tageszeit die Inkubation mit gpgpA33::rbGFP und die Messung der Fluoreszenz mittels FACS-Analyse. Das Experiment wurde unter Standardbedingungen dreimal durchgeführt. Aufgrund der interexperimentell verschiedenen Wachstumsgeschwindigkeiten, die trotz Standardbedingungen auftraten, wurde die Fluoreszenz mit der tatsächlichen Zellzahl verrechnet, um einen von externen Einflussfaktoren bereinigten Wert zu erhalten. Abbildung 4.5 zeigt



Abb. 4.5: Entwicklung der Zellzahl Tag 1-6 LIM 1215

die Entwicklung der Zellzahl über sechs Tage. Die gestrichelten Linien dienen hier und im Folgenden ausschließlich der Veranschaulichung und sollen keinen funktionalen Verlauf suggerieren. Abbildung 4.6 zeigt die Fluoreszenzintensität in Abhängigkeit von der Inkubationszeit. Die in der y-Achse aufgetragene Fluoreszenzintensität wurde als Quotient von mit gpA33::rbGFP inkubierten Zellen und nativen, also nicht mit dem Antikörper inkubierten Zellen berechnet. In der x-Achse ist die Zeit in Stunden nach Inkubation aufgetragen. Die Fluoreszenz der mit gpA33::rbGFP inkubierten Zellen der Zelllinie CaCo 2 zeigt eine mäßige Fluoreszenz, die über die Zeit, das heißt mit wachsender Zellzahl und damit zunehmender Konfluenz - keinen signifikanten Änderungen unterworfen ist. Es



Abb. 4.6: Entwicklung der Fluoreszenz Tag 1-6 LIM 1215



Abb. 4.7: Entwicklung der Zellzahl Tag 1-6 CaCo 2

findet sich, im Gegensatz zum Experiment mit der Zelllinie LIM 1215, keine Korrelation zwischen Konfluenzgrad der wachsenden Zellen und der gemessenen Fluoreszenz.

Die Fluoreszenz der Zellen der Zelllinie K 562 verbleibt über die beobachtete Zeit von sieben Tagen auf niedrigem Niveau. Es ist davon auszugehen, dass die gemessene Fluo-



Abb. 4.8: Entwicklung der Fluoreszenz Tag 1-6 CaCo 2



Abb. 4.9: Entwicklung der Zellzahl Tag 1-6 K 562

reszenz der autogenen Fluoreszenz der Zellen entspricht. Auch mit zunehmender Zellzahl bleibt die Fluoreszenz unverändert. Die non-adhärent wachsenden Zellen, die als Negativkontrolle dienen, zeigen damit erwartungsgemäß keine Proportionalität zwischen Zellzahl und Fluoreszenz.



Abb. 4.10: Entwicklung der Fluoreszenz Tag 1-6 K 562

Mit zunehmender Konfluenz wird eine Steigerung der Fluoreszenz bei den Kolonkarzinomzellen der Zelllinien LIM 1215 beobachtet. Die Fluoreszenz der Zelllinie CaCo 2 (Abb. 4.8)und der Leukämiezellen K 562 (Abb. 4.10)bleibt auf niedrigem Auto-Fluoreszenzniveau stabil.

Die für die Zelllinie LIM 1215 bestehende Korrelation zwischen Fluoreszenz und Zellzahl wird im folgenden genauer untersucht. Zellen der Kolonkarzinomzelllinie LIM1215 wurden zu verschiedenen Zeitpunkten nach Inkubation geerntet und nach Inkubation mit gpA33::rbGFP mittels FACS analysiert.

Diese Versuche wurden in dreifacher Ausführung zeitlich voneinander unabhängig durchgeführt.

In den Diagrammen Abb. 4.11(a)-4.11(c) ist der Verlauf der Fluoreszenzintensität als grüne Punkte mit der Fluoreszenzintensität in der y-Achse, die Zellzahl als schwarze Punkte mit der Anzahl der Zellen in 100.000 je Qudratzentimeter aufgetragen. Die numerische Fluoreszenzintensität wurde mit der Ratio aus mit gpA33::rbGFP inkubierten Zellen zu nativen Zellen angegeben.

Die sogenannten Konfluenzpunkte sind durch eine rote Linie gekennzeichnet. Diese bestimmen sich als die Zelldichte, in der mindestens 80% der Oberfläche in Kultur der adhä-



rent wachsenden Zellen im Monolayer bedeckt ist. Wie sich in den Abbildungen 4.11(a),

(c) Zellzahl und Fluoreszenz LIM 1215 (3)

Abb. 4.11: Untersuchung der Korrelation von Fluoreszenz und Zellzahl für LIM 1215 zu verschiedenen Zeitpunkten nach Inkubation

4.11(b) und 4.11(c) zeigt, nimmt die Fluoreszenzintensität zunächst mit der Zellzahl zu, um ab einem gewissen Punkt, dem Konfluenzpunkt, wieder schwächer zu werden. Dieser Punkt liegt bei einer Zellzahl von ca. 4–5·10<sup>5</sup> Zellen/cm<sup>2</sup>.

Um die bei der Messung der Zelllinie LIM 1215 gefundene Korrelation zwischen Konfluenzgrad und Fluoreszenz zu veranschaulichen, wurden im folgenden diese beiden Parameter für das jeweilige Experiment gegeneinander aufgetragen. In Abbildung 4.12 zeigt



Abb. 4.12: Abhängigkeit der Fluoreszenz von der Zelldichte der Zelllinie 1215

sich die maximale Fluoreszenz der Zelllinie LIM 1215 in allen drei Versuchsreihen bei einer Zellzahl von ungefähr  $4-5 \cdot 10^5$ /cm<sup>2</sup>. Die gemessene Fluoreszenz verhält sich linear proportional zur Expression von A33 auf der Zelloberfläche. Somit steigt die mittels FACS ermittelte Expression von gpA33 bis zum Konfluenzpunkt an, um danach wieder zu fallen. Der Anstieg der Fluoreszenz der Zelllinie LIM 1215 ist bis zu einem gewissen Punkt positiv proportional zur Zellzahl in Kultur. Bei ungefähr 4–5 · 10<sup>6</sup> Zellen/ml ist eine flächendeckende Bewachsung des Bodens der Kulturflasche erreicht, die Zellen sind konfluent. Mit der Konfluenz, das heißt dem Aneinanderliegen der Zellen, nimmt die messbare Fluoreszenz der Zellen wieder ab.

## 4.5 Zellzyklusphasenspezifische Arretierung von LIM1215-Zellen

Zellen der Zelllinie LIM1215 wurden in der jeweiligen Zyklusphase folgendermaßen arretiert: In der G1-Phase mit der Substanz L-Mimosine (300  $\mu$ M), in der S-Phase mit Aphidicolin (15  $\mu$ M), in der G2/M-Phase mit Nocodazole (400 nM). Die jeweiligen zellzyklusspezifischen Profile wurden mittels Anfärbung mit Propidium Iodid charakterisiert. Propidium Iodid weist die DNA-Menge quantitativ nach. Abbildung 4.13 zeigt die Zellen nach Arretierung im jeweiligen Zellzyklus. Die gezeigten Daten sind für vier voneinander unabhängige Versuchsreihen repräsentativ. (PI=Propidium Iodid, zs1= Zyklusstop Versuchsreihe 1, FSC=forward scatter). Die DNA-Quantität ist für den jeweiligen Zellzyklus spezifisch. Die Arretierung der Zellen in der jeweiligen Subgruppe war damit erfolgreich.



Abb. 4.13: DNA-Quantität nach Arretierung mit L-Mimosine, Aphidicolin und Nocodazole

## 4.6 GpA33-Expression in Abhängigkeit von der Zyklusphase

Nach erfolgter Zellsynchronisation wurde das Bindungsverhalten von gpaA33::rbGFP an den Zellen der Kolonkarzinomzellreihe LIM 1215 mittels FACS analysiert. Die Fluoreszenz ist als Quotient des Medians der Fluoreszenz der Probe und des Medians der Negativkontrolle dargestellt. Die vier verschiedenen mit zs1-zs4 markierten Balken stellen



vier Versuchsreihen dar. Abbildung 4.14 zeigt die Expression von gpA33 in der jeweili-

Abb. 4.14: Expression von gpA33::rbGFP in der jeweiligen Zyklusphase

gen Zyklusphase in vier verschiedenen, voneinander unabhängigen Versuchsreihen. Die Oberflächenexpression von gpA33 ist davon abhängig, in welcher Zyklusphase sich die Zellen befinden.

Die Daten wurden statistisch ausgewertet und im folgenden Diagramm (Abb. 4.15) dargestellt. Vier einzelne unabhängige Versuchsreihen des Experiments sind in Abbildung 4.15



Abb. 4.15: Fluoreszenzintensität im jeweiligen Zellzyklus

zusammengefasst: in der y-Achse ist die Fluoreszenzintensität aufgetragen, die als Quotient zwischen mit gpA33::rbGFP inkubierten Zellen und nativen Zellen berechnet wurde. Die vier verschiedenen geometrischen Symbole stehen für jeweils eine Versuchsreihe. Die Signifikanzen ergeben sich aus dem paired-t-Test. Zwischen Zyklusphasen G1 und S ist der errechnete p-Wert 0,0160, zwischen S und G2/M 0,0005, zwischen G1 und G2/M 0,0186. Damit sind zwischen allen synchronisierten Zyklusphasen statistisch signifikante Unterschiede aufgetreten.

## 4.7 Nachweis der transfer-RNA für GPA33 mittels rt-PCR

Von den Kolonkarzinomzellen der Zelllinien LIM 1215 und CaCo 2 und den Leukämiezellen K 562 wurden im Rahmen des unter 3.4. geschilderten Verlaufsexperiments, Teil 3, Zellen für die Weiterverwendung in der rt-PCR eingefroren. Diese Zellen wurden dann sukzessive auf das GPA33-Antigen untersucht. Abbildung 4.16 zeigt das Ergebnis der



Abb. 4.16: Quantifizierung von gpA33-mRNA

quantitativen real-time-PCR-Untersuchung mittels PCR-light-cycler. Es zeigt sich eine lineare Regression mit einem r von -1.00 und einem Fehler von 0.02. Positiv- und Negativkontrolle sind bestätigt, die Replikationstoleranz gewahrt.

Die Ergebnisse aus FACS-Analyse und mRNA-Quantifizierung aus derselben Zellpopulation aus Versuchsreihe 3 der über 6 Tage gemessenen Zellen wurden verglichen. Quantität der gpA33-mRNA im Vergleich zur Fluoreszenz von gpA33::rbGFP über die Zeit In Abb. 4.17 ist die im Zeitverlauf zunehmende Fluoreszenz mit der RNA-Quantität derselben Versuchsreihe verglichen. Die Fluoreszenzintensität wurde als Ratio zwischen inkubierten und nativen Zellen der Zelllinie LIM1215 ermittelt. Die RNA-Quantität wurde als Quotient von A33-RNA-Quantität und PBGD-Quantität (housekeeping-gene) ermittelt. Es zeigt sich ein Anstieg über die Zeit sowohl in der Fluoreszenz wie auch in der



Abb. 4.17: Quantität der gpA33-mRNA im Vergleich zur Fluoreszenz von gpA33::rbGFP über die Zeit

RNA-Quantität. Dem steilen Anstieg der Fluoreszenzintensität ab Tag fünf geht ein steiler Anstieg in der A33-RNA-Quantität voraus.

Die im jeweiligen Zellzyklus arretierten Zellen aus der Kolonkarzinomzelllinie LIM 1215 wurden mittels real-time polymerase chain reaction (rtPCR) auf die mRNA von gpA33::rbGFP untersucht. In Abbildung 4.18 ist die Expression von gpA33-mRNA in zyklus-



Abb. 4.18: Expression von gpA33-mRNA in zyklusphasenarretierten LIM1215-Zellen

phasensynchronisierten Zellen dargestellt. Die verschiedenen Symbole Dreieck, Quadrat und Raute stehen für drei voneinander unabhängige Versuchsreihen. Die Expression als 'mRNA ratio' in der y-Achse ausgedrückt, errechnet sich aus der Ratio zwischen gpA33-mRNA und PBGD(housekeeping gene)-mRNA. Es zeigen sich zyklusspezifische Differenzen in der mRNA-Quantität. Es zeigten sich statistisch signifikante Differenzen zwischen G1-Phase und S-Phase mit einem p-Wert von 0.0435 und zwischen S-Phase und G2/M-Phase mit einem p-Wert von 0.0490.

# 4.8 Darstellung der Expression von GPA33 an Kolonkarzinomzellen der Zelllinie LIM 1215 mittels konfokaler Lasermikroskopie

Kolonkarzinomzellen der Zelllinie LIM 1215 wurden mit gpA33::rbGFP inkubiert und mittels konfokaler Lasermikroskopie untersucht. Die zeitliche Entwicklung ist in den Abbildungen 4.19 und 4.20 dargestellt. 0 Minuten heißt hier vor Inkubation. Die vor Inkubation dargestellte Skala gilt für alle Aufnahmen in den Abbildungen 4.19 und 4.20.

Eine stetige Zunahme der Fluoreszenz an der Membran der Zelle wird deutlich und bleibt auch nach mehrfachem Waschprozessen gut sichtbar. In einigen Zellen ist membrannah eine Akkumulation der Fluoreszenz sichtbar: Nach Internalisierung des Antigen-Antikörper-Moleküls werden die fluoreszenztragenden Vesikel sichtbar.



Abb. 4.19: Teil 1 der zeitlichen Entwicklung der Durchlichtmikroskopie- und Lasermikroskopiebilder nach Inkubation. 0 Minuten heißt hier vor Inkubation.



Abb. 4.20: Teil 2 der zeitlichen Entwicklung der Durchlichtmikroskopie- und Lasermikroskopiebilder nach Inkubation.

## 4.9 Membrankinetik und Internalisierungskinetik des gpA33-Antikörpers in der konfokalen Mikroskopie

Ausgehend von dem in Abschnitt 4.8 dargestellten Versuch wurden die für die intrazellulare Prozessierung ersten notwendigen Schritte, die Bindung des Antikörpers an die Zellmembran und folgend die Internalisierung der Antigen-Antikörper-Verbindung mit Hilfe der konfokalen Lasermikroskopie dargestellt.



(a) 350 fache Vergrößerung

(b) 1250 fache Vergrößerung

(c) 2000 fache Vergrößerung

Abb. 4.21: Konfokale Mikroskopie nach Inkubation von A33 positiven Zellen mit gpA33::rbGFP



Abb. 4.22: FRAP-Film

Der FRAP-Film (Abb. 4.22)zeigt die wahrscheinlich endozytotisch ablaufende Internalisierung eines stark fluoreszierenden Membranabschnittes.

## 5 Diskussion

Obwohl die ersten klinischen Studien über das Antigen gpA33 schon Mitte der 90er veröffentlicht wurden, sind sowohl seine physiologische Funktion als auch seine Rolle in der Entstehung von Malignität weitgehend ungeklärt. GpA33 konnte als Mitglied der Immunoglobulin superfamily identifiziert werden (Denzer et al. (2000); Mallegol et al. (2007); Van Niel et al. (2003)). Eigenschaften wie die Expression an der basolateralen Seite von Epithelzellen führten zu der Einordnung in die Klasse der Adhäsionsmoleküle (Ackerman MA (2008); Heath et al. (1997)).

Die physiologische Aufgabe dieser Proteine ist die Aufrechterhaltung eines Zellverbandes im Epithel. Daneben fungieren sie als Informationsübermittler in der Zell-Zell-Interaktion und transzellulären Signalwegen (Van Niel et al. (2003); Heath et al. (1997)). Es konnte gezeigt werden, dass die Adhäsionsmoleküle E-cadherin und beta-catenin in Zelllinien des Pankreascarcinoms apoptoseinduzierend wirken, sobald der Zell-Zell-Kontakt hergestellt ist (Lowy et al. (2002)). Die Abwesenheit dieser Moleküle führt zu beschleunigtem Tumorwachstum (Lowy et al. (2002)). Die meisten anderen Klassen der Adhäsionsmoleküle - Integrine, EpCAM, CD44 Zellen - haben einen Einfluss auf die Zellkontaktvermittelte transzelluläre Signalübertragung und Wachstumshemmung (Kavale et al. (1992)). In Mäusen konnte gezeigt werden, dass die Expression von gpA33 in der embryonalen Entwicklung einem spezifischen rostrocaudalen Expressionsmuster unterliegt und dieses Antigen damit in der embryonalen Entwicklung des Intestinaltraktes eine Rolle spielt (Abud et al. (2000); Johnstone et al. (2000)). Darüber hinaus scheint gpA33 einen Einfluss auf die Antigen-Präsentation von Exosomen des Intestinaltraktes zu haben (Heath et al. (1997); Van Niel et al. (2001)).

In dieser Arbeit wurde eine weitergehende Charakterisierung des Glykoproteins gpA33 durchgeführt. Es wurde gezeigt, dass unter der konfokalen Mikroskopie nach Inkubation von Kolonkarzinomzellen mit dem Antikörper gpA33::rbGFP eine Antigen-Antikörper-Interaktion erfolgt, bevor das Antigen-Antikörper-Molekül nach intrazellulär transportiert wird. Dieser Prozess geschieht in den ersten Minuten nach Antikörper-Antigenkontakt. Wohin der Transport des fusionierten Antigen-Antikörper-Moleküls nach Prozessierung erfolgt, konnte nicht nachgewiesen werden. Allerdings scheinen Ergebnisse anderer Arbeiten darauf hinzuweisen, dass nach intrazellulärer Prozessierung eine Rezirkulation an die Oberfläche der Zellen erfolgt, von wo die internalisierten und rezirkulierten Antigene der Zellumgebung wieder präsentiert werden. Eine relativ stabile Expression von A33, wie in anderen Arbeiten gezeigt (Ackerman MA (2008)) steht hierzu nur scheinbar in Widerspruch. Auf die Internalisierung folgt unseren Ergebnissen zufolge eine mögliche intrazelluläre Prozessierung und Rezirkulation an die Zelloberfläche. Es verbleibt ein Großteil der Antikörper auf der Zelloberfläche. Weiterhin wurde gezeigt, dass A33-Antikörper die Fähigkeit haben auch solide Tumore zu penetrieren (Scott AM (2005)). Dies ist eine entscheidende Charaktereigenschaft, die für die klinische Anwendung von antikörpergestützten Therapieverfahren entscheidende Bedeutung hat. Das grundsätzliche Problem bei der Therapie von soliden Tumoren mit Antikörpern ist die reduzierte Erreichbarkeit aller Tumorzellen. Die Dosis muss einerseits hoch genug sein, um eine komplette Durchdringung des Tumors durch die Antikörper zu ermöglichen, andererseits ist der limitierende Faktor der Knochenmarkstoxizität gegeben. Die Schwierigkeit, Antikörper ins Innere des Tumors zu bringen liegt auch darin, dass sich Diffusion und Antikörperbindung ab einer bestimmten Entfernung im Gleichgewicht befinden; mit anderen Worten: auf dem Weg der Antikörper durch das Tumorzellgewebe fällt aufgrund der sukzessiven Bindung von Antikörpern an Antigene die Antikörperkonzentration auf ein Niveau ab, dass eine ausreichende Diffusion der nächsten Tumorzellen nicht mehr erlaubt. In diesem Zusammenhang gilt auch, dass eine hohe Anzahl von Bindungsstellen für einen bestimmten Antikörper therapeutisch nicht allein positiv wirkt, da hierdurch die Penetration von soliden Tumoren aufgrund der hohen Bindungsrate vermindert wird.

Daneben wurde in dieser Arbeit erstmals gezeigt, dass die Expression von gpA33 auf der Zelloberfläche von Kolonkarzinomzellen über die Zeit keine Konstanz aufweist, sondern von der Umgebung der Zelle, ihrem Wachstumsgrad und der Phase des Zellzyklus, in dem sie sich befindet, abhängig ist. Die gpA33-Expression zeigt eine biphasische Proportionalität zur Zelldichte. Wie gezeigt werden konnte, steigt der Expressionsgrad von gpA33 auf der Zelloberfläche mit der Zelldichte bis zum Konfluenzpunkt an, um danach wieder zu sinken. Eine entscheidende Einflussgröße auf den Grad der gpA33-Expression hat darüber hinaus die Zyklusphase, in der sich die jeweilige Zelle befindet. In der G2/M-Phase erreicht die Expression von gpA33 ihr Maximum, nachdem in der S-Phase der

Expressionsgrad minimal war.

Diese entscheidenden Eigenschaften von gpA33 passen zur Einordnung des Antigens in die vorhandenen Klassifikationen scheinbar nicht: erstens ist die beobachtete Internalisierung des Antigens nach Antikörperfusion und dessen nachfolgendes Recycling an die Zelloberfläche nur schwer in Einklang zu bringen mit der Funktion von gpA33 als Adhäsionsmolekül. Die Hypothese, dass aufgrund von Internalisierung und Recycling gpA33 in der Antigenpräsentation von luminal nach abluminal, das heißt vom Darm zum Lymphocyten, eine Rolle spielt konnte bislang noch nicht genauer begründet werden.

Zweitens steht die zeitabhängige Tumorspezifität in scheinbarem Widerspruch zum Ziel einen stabilen Zellverband aufrechtzuerhalten. Genau aufgrund dieser Tumorspezifität eignet sich gpA33 als Zielstruktur für Therapien. Der Unterschied der Antikörperaufnahme zwischen gesundem und malignem Gewebe vor allem im Hinblick auf die Zeit legen den Schluss nahe, dass gpA33 in der Entstehung bzw. Aufrechterhaltung von Malignität im Intestinaltrakt eine Rolle spielt. Die offensichtliche, fast zwangsläufige Erklärung wäre, dass in Tumorzellen die Synthese von gpA33 hochreguliert ist. Daneben könnte eine veränderte Abfolge oder zeitlicher Differenzierung von Internalisierung und Recycling in der Tumorzelle im Vergleich zur gesunden Zelle ein Grund für die vermehrte Expression von gpA33 im Coloncarcinom sein.

Ziel dieser Arbeit war die weitergehende Charakterisierung der Expression von gpA33 auf der Oberfläche von Epithelzellen, um die Tumorspezifität von gpA33-Antikörpern zu sichern und zukünftigen Studien bezüglich der Funktion von gpA33 eine Richtung zu geben.

Bei den Versuchen zur einfachen Spezifität des Antikörpers mittels durchflusszytometrischer Verfahren (FACS) zeigte sich im Vergleich zu den A33-negativen Zellen der Kontrollgruppe eine deutlich erhöhte Fluoreszenz der A33-positiven Zellen. Die Zellen der Tumorzelllinie LIM 1215 zeigten hierbei die höchste Fluoreszenz. Damit kann davon ausgegangen werden, dass die Expression von A33 spezifisch für kolorektale Gewebszellen ist. Diese Beobachtung deckt sich mit Ergebnissen anderer Arbeiten. Welt et al. (1996) zeigten in einer klinischen Studie, dass nach Verabreichung von radiomarkierten Antikörpern diese spezifisch an Zellen des kolorektalen Karzinoms binden. Auch der in dieser Arbeit verwendete Antikörper zeigte in der Studie von Deckert et al. (2003), dass er die erforderliche Spezifität zum Antigen aufweist. Hierbei konnte in vitro mit dem rekombinanten Fusionsantikörper A33scFv-CD die lokal wirkende Toxizität von 5-FU um den Faktor 300 verstärkt werden (Deckert et al. (2003)).

Die Spezifität konnte in der Bildgebung mittels Fluoreszenzmikroskopie bestätigt werden. Sowohl im Vergleich zur Nativkontrolle wie auch im Vergleich zur Negativkontrolle, die mit A33-negativen Zellen durchgeführt worden war, zeigte sich eine deutliche Fluoreszenzverstärkung.

Darüber hinaus zeigte sich eine relativ erhöhte Spezifität des Antikörpers zu entdifferenzierten Zellen im Vergleich zur gesunden Epithelzelle. Hier konnte in der fluoreszenzmikroskopischen Untersuchung von Gewebsschnitten eine deutliche Zunahme der Signalintensität des krankhaft veränderten Gewebes im Vergleich zum physiologischen Kolonepithel beobachtet werden. Dies legt den Schluss nahe, dass der Grad der Expression von gpA33 im dysplastisch veränderten Gewebe deutlich gesteigert ist. Dies könnte mit tumorspezifischen Veränderung im Bereich der Internalisierung/Prozessierung oder anderer veränderter Stoffwechselprozesse zusammenhängen. Ein Proportionalität zwischen gpA33-Expression und Entdifferenzierung der Zelle konnte noch nicht nachgewiesen werden. Allerdings zeigten Welt et al. dass ein radiomarkierter gpA33-Antikörper an Tumorzellen in der zeitlichen Dimension erheblich länger nachweisbar war als derselbe Antikörper an gesundem Gewebe (Welt et al. (1990)). Diese Eigenschaft könnte den veränderten Grad der A33-Expression bei dysplastisch veränderten Zellen erklären, da bei erhöhtem Zellwachstum und erhöhter Umsatzrate auch die Adhärenz, bzw. Konfluenz der Zellen gewährleistet sein müssen, um eine Solidität des Tumors zu ermöglichen.

Wir konnten zeigen, dass die Expression von gpA33 in einem biphasischen proportionalen Verhältnis zur Zelldichte steht. Die Expression von gpA33 nimmt mit zunehmender Zelldichte bis zum Erreichen des Konfluenzpunktes zu, um danach wieder abzufallen.

Bislang gibt es keine bekannten Studien, die die Korrelation zwischen Expression von Adhäsionsmolekülen an der Zelloberfläche und Dichte des Zellwachstums untersuchen. Dass nach Erreichen einer 2-dimensionalen vollständigen Zelldichte, der Konfluenz, die Expression von gpA33 abnimmt, ist für ein Antigen, welches dem Zellzusammenhalt und der interzellulären Signalübertragung dient, uncharakteristisch. Seine eigentliche Aufgabe im physiologischen Milieu des Epithels ist die Aufrechterhaltung von stabilen Zellverbänden und, bei Erreichen einer bestimmten Dichte der Zellen, die Wachstumshemmung von weiteren Zellen durch Zell-Zell-Signalübertragung (Ackerman MA (2008); Kavale et al. (1992); Heath et al. (1997)). Die hier beobachtete Abnahme der Expression von gpA33 nach Erreichen der Zellkonfluenz belegt die durch die Malignität bewirkte Transformation der Zellen. Die Expression von gpA33 unterliegt hier nicht mehr dem eigentlichen physiologischen Ziel der Wachstumsregulation und -kontrolle sondern ist in malignen Zellen dysreguliert und bewirkt letzten Endes ein unkontrolliertes Wachstum, welches auch durch Adhäsion der Zellen mit Nachbarzellen in vollständiger Konfluenz nicht beeinflusst wird. Die in physiologischer Umgebung gezeigte Wachstumsinhibition durch Agglomeration geschieht hier nicht (Walker et al. (2005)).

Die Abnahme der Expression des Adhäsionsmoleküls nach Erreichen des Konfluenzpunktes könnte die Bereitschaft der malignen Zellen zur Metastasierung zeigen. Wird bei Erreichen der Konfluenz der Zusammenhalt des Zellverbandes gelockert, wie hier durch die Abnahme der gpA33-Expression verursacht, können einzelne Zellen oder Zellgruppen vom eigentlichen Herd gelöst und potentiell Metastasen setzen. Dieser Absiedelungsmechanismus könnte auch der Aufrechterhaltung der Eigenversorgung des Tumors dienen. Bei unkontrolliertem schnellem Wachstum und gleichzeitiger Stabilität eines Zellverbandes kann eine Absiedelung von Tumorteilen sowohl die Nekrose des Tumors verhindern, wie auch die Vermehrung an anderen Orten bewirken. Die geringere Expression von gpA33 bei Zellagglomeration könnte damit das Überleben der malignen Zelle sichern. Indem gpA33 in malignen Zellen bei Erreichen der Konfluenz einen niedrigeren Expressionsgrad aufweist als vor Erreichen des Konfluenzpunktes könnte die maligne Zelle einen Überlebensvorteil haben gegenüber den Zellpopulationen, die das Antigen gpA33 konstant exprimieren. Eine durch reduzierte Adhäsionsintensität verursachte Dissemination von malignen Zellen kann letzten Endes für das Überleben der einzelnen Tumorzelle entscheidend sein.

Zur weiteren Charakterisierung des gpA33-Antigens wurde untersucht, ob die Expression des Antigens mit der Zyklusphase der Zellen in Beziehung steht. Hierfür wurden die Zellen, wie beschrieben, in den verschiedenen Zyklusphasen arretiert. Nach erfolgreicher Synchronisation wurden die Zellen mit gpA33-GFP inkubiert und fluoreszenzzytometrisch gemessen. Die Ergebnisse zeigten Veränderungen der Expression in den verschiedenen Zyklusphasen. Von einer basalen Antigenexpression, die in der G1-Phase beobachtet wurde, ausgehend, zeigte sich eine Abnahme in der Synthese-Phase. In der G2/Mitose-Phase des Zyklus steigt die Expression des gpA33-Antigens an. Die Ergebnisse hielten der Überprüfung in insgesamt vier Versuchsreihen stand.

Vor dem Hintergrund des jetzigen wissenschaftlichen Kenntnisstandes in der Zellbiologie überraschen diese Ergebnisse auf den ersten Blick. Grundsätzlich ist davon auszugehen, dass Proteine über den gesamten Zellzyklus hinweg produziert werden. Allerdings werden Schwankungen in der allgemeinen Protein- und Enzymsynthese beobachtet (Walker et al. (2005)). Zellwachstum entsteht durch Progression der Zelle durch die Phasen des Zellzyklus. Dabei werden die verschiedenen Phasen durch Restriktionspunkte initiiert. Beim Überwiegen antiproliferativer Signale kann die Zelle den Zellzyklus verlassen und in der G0-Phase in einen schlafenden Zustand eintreten. Den Übergang aus der G1-Phase (und G0) in die Synthese-Phase wird durch den G1-Restriktionspunkt reguliert. In der G1-Phase als Wachstumsphase der Zelle, in der gewährleistet sein muss, dass in der folgenden S-Phase ausreichend Substrate für die DNA-Replikation produziert werden, ist die allgemeine Proteinsynthese hoch Korfiatis et al. (2001); Walker et al. (2005).

Das beobachtete Absinken der Protein-Synthese in der Synthese-Phase wird damit erklärt, dass die Zelle einen Großteil ihrer Ressourcen für die DNA-Replikation benötigt. Allerdings trifft diese Aussage nur bedingt auf Proteine der Regulation der Zellproliferation zu, da diese während des gesamten Zellzyklus fördernd, bzw. hemmend auf diesen einwirken. Die mit dieser Arbeit gezeigte Reduktion der gpA33-Expression in der S-Phase wäre demzufolge mit der Sachlage vereinbar, dass Transkription und Translation dieses Proteins in dieser Phase reduziert sind. Das Antigen gpA33 wird als Adhäsionsmolekül und als Funktionsträger in der Zell-Zell-Interaktion für die DNA-Replikation nicht unmittelbar benötigt und ist damit als Endprodukt von Transkription und Translation auf der Zelloberfläche vermindert nachweisbar. Allerdings bleibt zu bemerken, dass auf dem Weg von DNA zur Oberfläche Veränderungen in der Aktivität des jeweiligen Substrats erfolgen können, wie in der posttranlationalen Modifikation. Damit ist ein zwingender Schluss von Antigenexpression und Transkriptions- bzw. Translationsrate nicht möglich, eine Proportionalität jedoch wahrscheinlich. Die Messung der phasenspezifischen RNA-Quantität von gpA33 hat diesbezüglich weitere Erkenntnisse erbracht, die im Anschluss diskutiert werden.

Das Ansteigen der Expression von gpA33-Antigen in der G2/M-Phase lässt sich mit seiner Funktion erklären. Zwar ist eine Steigerung der Expression in der G2/M-Phase von an der Zellteilung nicht unmittelbar beteiligten Proteinen atypisch, doch weist das Antigen Charakteristika auf, die diese erhöhte Expressionsrate erklären. Die Funktion von gpA33 als Adhäsionsmolekül macht dessen Vorhandensein gerade dann erforderlich, wenn Zellen nach der Teilung neue Bindungen eingehen müssen, um einen stabilen Zellverband zu bilden. Im wachsenden Tumor sind die Zellen darauf angewiesen, eine einigermaßen feste Stuktur zu formen, um die für die Versorgung notwendige Blutversorgung zu gewährleisten. In der Mitose ist es deshalb erforderlich, dass Adhäsionsmoleküle und Antigene für die Zell-Zell-Interaktion auf der Zelloberfläche präsentiert werden.

Inwieweit die Regulation des Antigens auch für Ausbreitung und Absiedelung von Tumorzellen eine Rolle spielt, bleibt zu untersuchen. Bisherige Erkentnisse sprechen dafür, dass durch die Regulation von Antigen die Ausbreitung und die Lokalisation von Metastasierung beeinflusst wird. Fraglich ist weiterhin, inwieweit das für die jeweilige Zyklusphase spezifische Expressionsprofil von gpA33 nicht nur bei Tumorzellen des kolorektalen Karzinoms gefunden wird, sondern ob die vorliegenden Ergebnisse auf die Expression des Antigens gesunder Epithelzellen übertragen werden können.

Die intrazelluläre Expression von gpA33-mRNA zeigt sich im Vergleich zu der Antigenpräsentation von gpA33 auf der Zelloberfläche völlig verschieden. Zwar zeigen unsynchronisierte Zellen und G1-Phase-Zellen ähnliche mRNA-Expressionsprofile. Dies entspricht den Beobachtungen, die bei der FACS-Analyse des Expressionsverhaltens von gpA33-Antigen auf der Zelloberfläche gemacht wurden. In der S-Phase konnte auf mRNA-Ebene jedoch, konträr zur gpA33-Oberflächenexpression, ein starker Anstieg von gpA33-mRNA beobachtet werden.

Es zeigt sich demnach ein Widerspruch zwischen der Genexpression von gpA33 und dem Vorhandenseins des Proteins auf der Zelloberfläche. Eine Ursache hierfür ist in der zeitlichen Dimension zu finden: die Dauer von der intrazellulären mRNA-Expression bis zur Präsentation des Antigens auf der Zelloberfläche ist für gpA33 bislang nicht beschrieben. Der Anstieg von gpA33-mRNA in der S-Phase könnte dahingehend erklärt werden, dass dieses letztlich an der Oberfläche der Zelle präsentierte Antigen, für die Zelle konstitutive Bedeutung hat und damit in der S-Phase die Synthese des Proteins initiiert werden muss. Wie gezeigt, dient das Protein damit der Zell-Zell-Interaktion und als Adhäsionsmolekül; diese Aufgaben sind von basaler Bedeutung für die Zelle.

Die Beobachtung, dass die Expression des Antigens auf der Zelloberfläche ihr Maximum erst in der zeitlich folgenden G2/M-Phase hat, wäre dann mit dieser Erklärung in Einklang zu bringen, wenn der natürliche zeitliche Ablauf dies erforderlich macht. Mit anderen Worten, wenn der zeitliche Abstand zwischen mRNA-Synthese und Oberflächenpräsentation gleich groß ist wie der Phasen-Übergang von der S-Phase in die G2/M-Phase. Es gibt bislang kein veröffentlichtes Material zur Fragestellung, wie groß der Zeitabstand zwischen mRNA-Synthese von A33 und Präsentation des Antigens gpA33 ist. Studien zeigen, dass der Abstand zwischen Proteinsynthese und Antigenpräsentation in einen Zeitraum von wenigen Minuten bis mehreren Stunden sein kann. Eine genauere zeitliche Einordnung ist für das in dieser Arbeit untersuchte Antigen unter Zugrundelegung des bisherigen wissenschaftlichen Standes nicht möglich (Ritter et al. (2001); Lowy et al. (2002); Miccoli et al. (2003)). Es ist daher wahrscheinlich, dass die beobachtete Latenz zwischen mRNA-Synthese und Antigen-Präsentation in intrazellulären Prozessierungsvorgänge ihre Ursache hat.

Das Bindungsverhalten und der Internalisierungsprozess des fusionierten gpA33-Antigen-Antikörper-Moleküls wurde mittels konfokaler Lasermikroskopie untersucht. Hierbei zeigten sich 2-3 Minuten nach spezifischer Anfärbung der Zelloberfläche intrazelluläre gpA33-Antikörper beladene Mikrovesikel. Das Ziel dieser Moleküle konnte nicht lokalisiert werden. Es ist davon auszugehen, dass erstens die Internalisierung des Fusionsmoleküls als Reaktion auf die Antigen-Antikörper-Bindung auf der Zellmembran stattfindet. Dies wird durch frühere Studien bestätigt (Denzer et al. (2000)). Zweitens liegt die Vermutung nahe, dass durch Bindung, Internalisierung und intrazelluläre Migration und Prozessierung ein stimulierender Effekt auf gpA33 aussgeübt wird. In physiologischem Milieu und gesundem Epithel wirkt die Aktivierung von gpA33 zum Zwecke der Wachstumsregulation inhibitorisch. Das Antigen gpA33 hat demnach multiple Funktionen, die vom Milieu, von den Nachbarzellen und vom Zellzyklus abhängig sind. Dies würde auch die augenscheinlich entfernten, wenn nicht sich widerstreitenden Funktionen von gpA33 in der embryonalen Entwicklung, in der Antigenpräsentation, in der Adhäsion und in der interzellulären Signalübertragung miteinander in Einklang bringen.

Zusammengefasst begründen die Ergebnisse dieser Arbeit die Hypothese, dass der Expressionsgrad von gpA33 auf der Zelloberfläche vom Zellzyklus abhängig ist, vom Wachstumsverhalten der einzelnen Zelle und des Zellverbandes beeinflusst wird und in maligne transformierten Zellen spezifisch und in im Vergleich zur gesunden Zelle signifikant höherem Maße exprimiert wird. Dies zeigt neue Ansätze für zukünftige Forschungsarbeiten auf, um letzten Endes Antikörper-gesteuerte Therapieansätze auch für das kolorektale Karzinom zu etablieren.

Insbesondere die unterschiedlichen Expressionsgrade in der jeweiligen Zellzyklusphase könnten in klinischen multimodalen Therapiestrategien einen neuen Ansatz ermöglichen. Durch die relativ hohe Expression von gpA33::rbGFP in der G2/M-Phase könnte eine biphasische sequenzielle Chemotherapie erfolgen. In einem ersten Schritt könnte ein phasenspezifische Wachstumsarretierung der Tumorzellen erfolgen. Ziel ist es, die Zellen in einem Zustand zu belassen, der eine höchstmögliche Wirksamkeit einer antikörpergesteuerten Therapie ermöglicht. In den in dieser Arbeit untersuchten Zellpopulationen der humanen Kolonkarzinomzelllinie LIM1215 ist eine relativ hohe Expression von gpA33::rbGFP auf der Zelloberfläche der untersuchten Zellen in der G2/M-Phase gegeben. Ein Zellzyklusarrest in der G2/M-Phase würde demnach die maximale Anzahl von Antigenen gewährleisten. Die Antikörper hätten damit proportional zum maximal exprimierten Antigen eine höchstmögliche Anzahl von Andockstellen an den Zielzellen. In einem zweiten Schritt erfolgt die Applikation eines Antikörpers, der mit einem Prodrug oder sonstigem therapeutischen Molekül bzw. mit einer physikalisch wirksamen Substanz (I131) konjugiert ist. Dieser therapeutische Ansatz würde die Wirksamkeit der antikörpergekoppelten Therapie erhöhen, bei gleichzeitiger Dosisverringerung und hätte damit bei gleicher Wirksamkeit potentiell weniger unerwünschte Wirkungen, bzw. bei gleichem Nebenwirkungsprofil eine erhöhte therapeutische Potenz.

Insgesamt bleibt allerdings die Frage, inwieweit die Translation von 'bench to bedside'

gelingt. Zunächst sind weitere präklinische Studien erforderlich. Zum einen ist ein tierexperimenteller Nachweis notwendig, in dem die prinzipielle Machbarkeit von Zyklusphasenarrest und antikörpergesteuerter Therapie gezeigt wird. Es bleibt zu zeigen, inwieweit in vivo ein Stop in der jeweiligen Zellzyklusphase gelingt, der zum einen Tumorzellen in ausreichender Anzahl arretiert, zum anderen sonstige Zellen, das gesunde Gewebe, in ihrer Funktion nicht erheblich stört und beeinträchtigt. Konventionelle Chemotherapiestrategien haben schon seit Jahrzehnten mit eben diesem Problem zu kämpfen.

Daneben bleibt die Frage, ob mit die in dieser Arbeit verwendeten Zellen, beziehungsweise Zelllinien, vorrangig wurden Zellen der humanen Kolonkarzinomzelllinie LIM1215 verwendet, repräsentativ für Kolonkarzinome sind. Idealtypischerweise würden dementsprechend in einem nächsten experimentellen Schritt verschiedene Zelllinien in vivo in einem biphasischen Ansatz getestet.

## Literatur

#### Abud et al. 2000

ABUD, Helen ; JOHNSTONE, Cameron ; TEBBUTT, Niall ; HEATH, Joan: The murine A33 antigen is expressed at two distinct sites during development, the ICM of the blastocyst and the intestinal epithelium. In: *Mechanisms of Development* 98 (2000), Nr. 1, 111–114. http://dx.doi.org/10.1016/S0925-4773(00) 00438-X. – DOI 10.1016/S0925-4773(00)00438-X

## Ackerman MA 2008

ACKERMAN MA, Schmidt M. Chalouni C: A33 antigen displays persistent surface expression. In: *Cancer Immunol Immunother* 57 (2008), S. 1017–1027

## Allegra CJ 2009

ALLEGRA CJ, O'Connell M. Yothers G: Initial safety report of NSABP C-08: A randomized phase III study of modified FOLFOX6 with or without bevacizumab for the adjuvant treatment of patients with stage II or III colon cancer. In: *J Clin Oncol* 27(20) (2009), Jul, S. 3385–90

#### Andre et al. 2006

ANDRE, T; SARGENT, D; TABERNERO, J et al.: Current Issues in Adjuvant Treatment of Stage II Clolon Cancer. In: Ann Surg Oncol 13 (2006), Juni, S. 887–898. http://dx.doi.org/10.1245/ASO.2006.07. 003. – DOI 10.1245/ASO.2006.07.003

#### Andre et al. 2004

ANDRE, Thierry ; BONI, Corrado ; MOUNEDJI-BOUDIAF, Lamia et al.: Oxaliplatin, Fluorouracil, and Leucovorin as Adjuvant Treatment for Colon Cancer. In: *N Engl J Med* 350 (2004), Nr. 23, 2343-2351. http://dx. doi.org/10.1056/NEJMoa032709. – DOI 10.1056/NEJMoa032709

#### Bagshawe 1990

BAGSHAWE, KD: Antibody-directed enzyme/prodrug therapy (ADEPT). In: *Biochem Soc Trans* 18 (1990), Oktober, S. 750–752

## Barendswaard et al. 2001

BARENDSWAARD, Els C.; HUMM, John L.; O'DONOGHUE, Joseph A. et al.: Relative Therapeutic Efficacy of <sup>125</sup>I- and <sup>131</sup>I-Labeled Monoclonal Antibody A33 in a Human Colon Cancer Xenograft. In: *J Nucl Med* 42 (2001), Nr. 8, 1251-1256. http://jnm.snmjournals.org/cgi/content/abstract/42/ 8/1251

#### Bhatia et al. 2000

BHATIA, J ; SHARMA, S ; CHESTER, K et al.: Catalytic activity of an in vivo tumor targeted anti-CEA scFv::carboxypeptidase G2 fusion protein. In: Int J Cancer 85 (2000), März, S. 571-577. http://dx.doi.org/10.1002/(SICI)1097-0215(20000215)85: 4<571::AID-IJC20>3.0.CO;2-1. - DOI 10.1002/(SICI)1097-0215(20000215)85:4<571::AID-IJC20>3.0.CO;2-1

#### Burgess 1998

BURGESS, Antony W.: Growth control mechanisms in normal and transformed intestinal cells. In: *Phil. Trans. R.* Soc. Lond. B 353 (1998), Nr. 1370, 903-909. http://dx.doi.org/10.1098/rstb.1998.0254. - DOI 10.1098/rstb.1998.0254

#### Catimel et al. 1997

CATIMEL, B.; NERRIE, M.; LEE, F. T. et al.: Kinetic analysis of the interaction between the monoclonal antibody A33 and its colonic epithelial antigen by the use of an optical biosensor: A comparison of immobilisation strategies. In: *Journal of Chromatography A* 776 (1997), Nr. 1, 15 - 30. http://dx.doi.org/10. 1016/S0021-9673(97)00087-3. – DOI 10.1016/S0021-9673(97)00087-3

#### Catimel et al. 1996

CATIMEL, B. ; RITTER, G. ; WELT, S. et al.: Purification and Characterization of a Novel Restricted Antigen Expressed by Normal and Transformed Human Colonic Epithelium. In: *J Biol Chem* 271 (1996), Nr. 41, 25664-25670. http://dx.doi.org/10.1074/jbc.271.41.25664. – DOI 10.1074/jbc.271.41.25664

#### Chong et al. 2005

Снома, Geoffrey; LEE, Fook T.; HOPKINS, Wendie et al.: Phase I Trial of <sup>131</sup>I-huA33 in Patients with Advanced Colorectal Carcinoma. In: *Clin Cancer Res.* 11 (2005), Nr. 13, 4818-4826. http://dx.doi.org/10. 1158/1078-0432.ccr-04-2330. – DOI 10.1158/1078-0432.CCR-04-2330

#### Chouhan et al. 2007

CHOUHAN, Jyoti D. ; ZAMARRIPA, Daniel E. ; LAI, Phillip H. ; ORAMASIONWU, Christine U. ; GRABINSKI, Jodi L.: Sunitinib (Sutent(R)): A novel agent for the treatment of metastatic renal cell carcinoma. In: *J Oncol Pharm Pract.* 13 (2007), Nr. 1, 5-15. http://dx.doi.org/10.1177/1078155207077924. – DOI 10.1177/1078155207077924

#### Coelho et al. 2007

COELHO, Vania ; DERNEDDE, Jens ; PETRAUSCH, Ulf et al.: Design, construction, and in vitro analysis of A33scFv::CDy, a recombinant fusion protein for antibody-directed enzyme prodrug therapy in colon cancer. In: Int J Oncol 31 (2007), Nr. 4, 951–957. http://www.spandidos-publications.com/ijo/ 31/4/951

### Cunningham et al. 2004

CUNNINGHAM, David ; HUMBLET, Yves ; SIENA, Salvatore et al.: Cetuximab Monotherapy and Cetuximab plus Irinotecan in Irinotecan-Refractory Metastatic Colorectal Cancer. In: *N Engl J Med* 351 (2004), Nr. 4, 337-345. http://dx.doi.org/10.1056/NEJMoa033025. – DOI 10.1056/NEJMoa033025

#### Daghighian et al. 1996

DAGHIGHIAN, Farhad ; BARENDSWAARD, Els ; WELT, Sydney et al.: Enhancement of Radiation Dose to the Nucleus by Vesicular Internalization of Iodine-125-Labeled A33 Monoclonal Antibody. In: *J Nucl Med* 37 (1996), Nr. 6, 1052-1057. http://jnm.snmjournals.org/cgi/content/abstract/37/6/1052

### Dalerba et al. 2003

DALERBA, Piero ; MACCALLI, Cristina ; CASATI, Chiara et al.: Immunology and immunotherapy of colorectal

cancer. In: Critical Reviews in Oncology/Hematology 46 (2003), Nr. 71, 33 - 57. http://dx.doi.org/ 10.1016/S1040-8428(02)00159-2. - DOI 10.1016/S1040-8428(02)00159-2

#### Deckert et al. 2000

DECKERT, PM ; JUNGBLUTH, A ; MONTALTO, N et al.: Pharmacokinetics and microdistribution of polyethylene glycol-modified humanized A33 antibody targeting colon cancer xenografts. In: *Int J Cancer* 87 (2000), Juli, S. 382–390. http://dx.doi.org/10.1002/1097-0215(20000801)87:3<382:: AID-IJC12>3.0.CO; 2-P. – DOI 10.1002/1097–0215(20000801)87:3<382::AID-IJC12>3.0.CO; 2-P.

## Deckert et al. 2003

DECKERT, PM; RENNER, C; COHEN, LS et al.: A33scFv-cytosine deaminase: A recombinant protein construct for antibody-directed enzyme-prodrug therapy. In: *Br J Cancer* 88 (2003), März, S. 937–939. http://dx. doi.org/10.1038/sj.bjc.6600751. – DOI 10.1038/sj.bjc.6600751

#### Denzer et al. 2000

DENZER, Kristin; EIJK, Marco van; KLEIJMEER, Monique J.; JAKOBSON, Eva; GROOT, Cornelis de; J. GEUZE, Hans: Follicular Dendritic Cells Carry MHC Class II-Expressing Microvesicles at Their Surface. In: *J Immunol* 165 (2000), Nr. 3, 1259-1265. http://www.jimmunol.org/cgi/content/abstract/165/ 3/1259

## Douillard et al. 2000

DOUILLARD, JY ; CUNNINGHAM, D ; ROTH, AD et al.: Irinotecan combined with flourouracil compared with flourpuracil alone as first-line treatment for metastatic colorectal cancer: a multicentre randomised trial. In: *Lancet* 355 (2000), März, S. 1041–1047. http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736(00)02034-1. – DOI 10.1016/S0140–6736(00)02034–1

#### Frey et al. 2008

FREY, Dietmar ; COELHO, Vania ; PETRAUSCH, Ulf ; SCHAEFER, Michael ; KEILHOLZ, Ulrich ; THIEL, Eckhard ; DECKERT, P. M.: Surface Expression of gpA33 is Dependent on Culture Density and Cell-Cycle Phase and is Regulated by Intracellular Traffic Rather than Gene Transcription. In: *Cancer Biotherapy & Radiopharmaceuticals* 23 (2008), Nr. 1, 65-73. http://dx.doi.org/10.1089/cbr.2007.0407. – DOI 10.1089/cbr.2007.0407. – PMID: 18298330

## Garin-Chesa et al. 1996

GARIN-CHESA, P. ; SAKAMOTO, J. ; WELT, S. ; REAL, F. X. ; RETTIG, W. J. ; OLD, L. J.: Organ-specific expression of the colon cancer antigen A33, a cell surface target for antibody-based therapy. In: *Int J Oncol* 9 (1996), Nr. 3, S. 465–471

#### de Gramont et al. 2000

GRAMONT, A. de; FIGER, A.; SEYMOUR, M. et al.: Leucovorin and Fluorouracil With or Without Oxaliplatin as First-Line Treatment in Advanced Colorectal Cancer. In: *J Clin Oncol* 18 (2000), Nr. 16, 2938-2947. http: //jco.ascopubs.org/cgi/content/abstract/18/16/2938

#### Heath et al. 1997

HEATH, Joanane ; WHITE, Sara ; JOHNSTONE, Cameron et al.: The human A33 antigen is a transmembrane

glycoprotein and a novel member of the immunoglobulin superfamily. In: *Proc Natl Acad Sci USA* 94 (1997), Nr. 2, S. 469–474

#### Hurwitz et al. 2004

HURWITZ, Herbert ; FEHRENBACHER, Louis ; NOVOTNY, William et al.: Bevacizumab plus Irinotecan, Fluorouracil, and Leucovorin for Metastatic Colorectal Cancer. In: *N Engl J Med* 350 (2004), Nr. 23, 2335-2342. http://dx.doi.org/10.1056/NEJMoa032691. – DOI 10.1056/NEJMoa032691

#### Hurwitz et al. 2005

HURWITZ, Herbert I.; FEHRENBACHER, Louis; HAINSWORTH, John D. et al.: Bevacizumab in Combination With Fluorouracil and Leucovorin: An Active Regimen for First-Line Metastatic Colorectal Cancer. In: *J Clin Oncol* 23 (2005), Nr. 15, 3502-3508. http://dx.doi.org/10.1200/JCO.2005.10.017. – DOI 10.1200/JCO.2005.10.017

## Javle 2010

JAVLE, J: Recent advances in gastrointestinal oncology-updates and insights from the 2009 annual meeting of the American society of clinical oncology. In: *J Hematol Oncol* (2010), 3, S. 11. http://dx.doi.org/10.1186/1756-8722-3-11. - DOI 10.1186/1756-8722-3-11

#### Jemal et al. 2006

JEMAL, A; SIEGEL, R; SMIGAL, C et al.: Cancer Statistics, 2006. In: *CA Cancer J Clin* 56 (2006), März, S. 106–130. http://dx.doi.org/10.332/canjclin.56.2.106. – DOI 10.332/canjclin.56.2.106

#### Johnstone et al. 2000

JOHNSTONE, Cameron N.; TEBBUTT, Niall C.; ABUD, Helen E. et al.: Characterization of mouse A33 antigen, a definitive marker for basolateral surfaces of intestinal epithelial cells. In: *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 279 (2000), Nr. 3, G500-510. http://ajpgi.physiology.org/cgi/content/abstract/ 279/3/G500

#### Johnstone et al. 2002

JOHNSTONE, Cameron N. ; WHITE, Sara J. ; TEBBUTT, Niall C. et al.: Analysis of the Regulation of the A33 Antigen Gene Reveals Intestine-specific Mechanisms of Gene Expression. In: *J Biol Chem* 277 (2002), Nr. 37, 34531-34539. http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M204865200. - DOI 10.1074/jbc.M204865200

## Kasper et al. 2005

KASPER, D; BRAUNWALD, E; FAUCI, A et al.: *Harrison's principles of internal medicine*. 16th edition. Mcgraw-Hill Professional, 2005

#### Kavale et al. 1992

KAVALE, D; KRAJCI, P; BRANDTZAEG, P: Expression and Regulation of Adhesion Molecules ICAM-1 (CD54) and LFA-3 (CD58) in Human Intestinal Epithelial Cell Lines. In: *Scand J Immunol* 35 (1992), Nr. 6, 669–676. http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-3083.1992.tb02973.x. - DOI 10.1111/j.1365-3083.1992.tb02973.x

#### Khamly et al. 2005

KHAMLY, Kenneth ; JEFFORD, Michael ; MICHAEL, Michael ; ZALCBERG, John: Beyond 5-fluorouracil: new horizons in systemic therapy for advanced colorectal cancer. In: *Expert Opin Investig Drugs* 14 (2005), Nr. 6, 607-628. http://dx.doi.org/10.1517/13543784.14.6.607. - DOI 10.1517/13543784.14.6.607. - PMID: 16004591

## King et al. 1995

KING, DJ ; ANTONIW, P ; OWENS, RJ et al.: Preparation and preclinical evaluation of humanized immunoconjugates for radioimmunotherapy. In: *Br J Cancer* 72 (1995), S. 1364–1372

#### Koppe et al. 2005

KOPPE, M.; BLEICHRODT, R.; OYEN, W.; BOERMAN, O. C.: Radioimmunotherapy and colorectal cancer. In: *Br J Surg.* 92 (2005), Nr. 3, 264–276. http://dx.doi.org/10.1002/bjs.4936. – DOI 10.1002/bjs.4936

#### Korfiatis et al. 2001

KORFIATIS, Natasha; TROUNSON, Alan; LACHAM-KAPLAN, Orly: Cell Synchronization for the Purposes of Nuclear Transfer in the Bovine. In: *Cloning and Stem Cells* 3 (2001), Nr. 3, 125-138. http://dx.doi.org/10.1089/153623001753205089. - DOI 10.1089/153623001753205089. - PMID: 11945222

#### Lowy et al. 2002

LOWY, Andrew M.; KNIGHT, Joy; GRODEN, Joanna: Restoration of E-cadherin/[beta]-catenin expression in pancreatic cancer cells inhibits growth by induction of apoptosis. In: *Surgery* 132 (2002), Nr. 2, 141 - 148. http://dx.doi.org/10.1067/msy.2002.125168. – DOI 10.1067/msy.2002.125168

#### Mallegol et al. 2005

MALLEGOL, J.; NIEL, G. van; HEYMAN, M.: Phenotypic and functional characterization of intestinal epithelial exosomes. In: *Blood Cells, Molecules, and Diseases* 35 (2005), Nr. 1, 11 - 16. http://dx.doi. org/DOI:10.1016/j.bcmd.2005.04.001. - DOI DOI: 10.1016/j.bcmd.2005.04.001. - Including Workshop on Exosomes: Part II

#### Mallegol et al. 2007

MALLEGOL, Julia ; VAN NIEL, Corinne ; LEBRETON, Corinne et al.: T84-Intestinal Epithelial Exosomes Bear MHC Class II/Peptide Complexes Potentiating Antigen Presentation by Dendritic Cells. In: *Gastroenterology* 132 (2007), Nr. 5, 1866–1876. http://www.gastrojournal.org/article/ S0016-5085(07)00402-7/abstract

#### Mellman 2005

MELLMAN, Ira: Antigen Processing and Presentation by Dendritic Cells: Cell Biological Mechanisms. Version: 2005. http://www.springerlink.com/content/k2572382670x120p. In: *Mechanisms of Lymphocyte Activation and Immune Regulation X.* Springer, 2005 (Adv Exp Med Biol), 63-67

#### Mellman et al. 1998

MELLMAN, Ira ; TURLEY, Shannon J. ; STEINMAN, Ralph M.: Antigen processing for amateurs and professionals. In: *Trends Cell Biol.* 8 (1998), Nr. 6, 231 - 237. http://dx.doi.org/10.1016/ S0962-8924(98)01276-8. - DOI 10.1016/S0962-8924(98)01276-8

#### Meuer et al. 1999

MEUER, S ; WITTWER, C ; NAKAGAWARA, K et al.: *Rapid Cycle Real-Time PCR: Methods and Application* . 1st. Springer, 1999

#### Miccoli et al. 2003

MICCOLI, Laurent ; BIARD, Denis S. F. ; FROUIN, Isabelle et al.: Selective interactions of human kin17 and RPA proteins with chromatin and the nuclear matrix in a DNA damage- and cell cycle-regulated manner. In: *Nucl. Acids Res.* 31 (2003), Nr. 14, 4162-4175. http://dx.doi.org/10.1093/nar/gkg459. – DOI 10.1093/nar/gkg459

#### Mills et al. 2009

MILLS, Edward ; RACHLIS, Beth ; O'REGAN, Chris et al.: Metastatic renal cell cancer treatments: An indirect comparison meta-analysis. In: *BMC Cancer* 9 (2009), Nr. 1, 34. http://dx.doi.org/10.1186/1471-2407-9-34. - DOI 10.1186/1471-2407-9-34

#### Oertl et al. 2005

OERTL, A ; CASTEIN, J ; ENGL, T et al.: Endothelial adhesion of synchronized gastric tumor cells changes during cell cycle transit and correlates with the expression level of CD44 splice variants. In: *World J Gastroenterol* 11 (2005), Nr. 40, 6243-6248. http://www.wjgnet.com/1007-9327/abstract\_en. asp?f=6243&v=11

#### Petrausch et al. 2007

PETRAUSCH, Ulf ; DERNEDDE, Jens ; COELHO, Vania ; PANJIDEH, Hossein ; FREY, Dietmar ; FUCHS, Hendrik ; THIEL, Eckhard ; DECKERT, P. M.: A33scFv Green fluorescent protein, a recombinant single-chain fusion protein for tumor targeting. In: *Prot Eng Des Sel* 20 (2007), Nr. 12, 583-590. http://dx.doi.org/10.1093/protein/gzm043. – DOI 10.1093/protein/gzm043

#### Rescigno et al. 2001

RESCIGNO, Maria ; URBANO, Matteo ; VALZASINA, Barbara et al.: Dendritic cells express tight junction proteins and penetrate gut epithelial monolayers to sample bacteria. In: *Nat Immunol* 2 (2001), 361–367. http://dx.doi.org/10.1038/86373. – DOI 10.1038/86373

#### Ritter et al. 1997

RITTER, Gerd ; COHEN, Leonard S. ; NICE, Edouard C. et al.: Characterization of Posttranslational Modifications of Human A33 Antigen, a Novel Palmitoylated Surface Glycoprotein of Human Gastrointestinal Epithelium. In: *Biochemical and Biophysical Research Communications* 236 (1997), Nr. 3, 682 - 686. http://dx.doi.org/10.1006/bbrc.1997.6966. – DOI 10.1006/bbrc.1997.6966

### Ritter et al. 2001

RITTER, Gerd ; COHEN, Leonard S. ; WILLIAMS, Jr. Clarence ; RICHARDS, Elizabeth C. ; OLD, Lloyd J. ; WELT, Sydney: Serological Analysis of Human Anti-Human Antibody Responses in Colon Cancer Patients Treated with Repeated Doses of Humanized Monoclonal Antibody A33. In: *Cancer Res* 61 (2001), Nr. 18, 6851-6859. http://cancerres.aacrjournals.org/cgi/content/abstract/61/18/6851

### Robinson et al. 1999

ROBINSON, J et al.: Current Protocols in Cytometry. John Wiley & Sons, Inc., 1999

#### Scott AM 2005

SCOTT AM, Jones R. Lee FT: A phase I trial of humanized monoclonal antibody A33 in patients with colorectal carcinoma: biodistribution, pharmacokinetics, and quantitative tumor uptake. In: *Clin Cancer Res.* 11 (2005), Jul, S. 4810–7

#### Sharma et al. 2005

SHARMA, Surinder K. ; PEDLEY, R. B. ; BHATIA, Jeetendra et al.: Sustained Tumor Regression of Human Colorectal Cancer Xenografts Using a Multifunctional Mannosylated Fusion Protein in Antibody-Directed Enzyme Prodrug Therapy. In: *Clin Cancer Res.* 11 (2005), Nr. 2, 814-825. http://clincancerres. aacrjournals.org/cgi/content/abstract/11/2/814

#### Sizeland & Burgess 1991

SIZELAND, A M.; BURGESS, A W.: The proliferative and morphologic responses of a colon carcinoma cell line (LIM 1215) require the production of two autocrine factors. In: *Mol. Cell. Biol.* 11 (1991), Nr. 8, 4005-4014. http://mcb.asm.org/cgi/content/abstract/11/8/4005

### Trombetta & Mellman 2005

TROMBETTA, E. S.; MELLMAN, Ira: CELL BIOLOGY OF ANTIGEN PROCESSING IN VITRO AND IN VIVO. In: Annu. Rev. Immunol. 23 (2005), Nr. 1, 975-1028. http://dx.doi.org/10.1146/annurev. immunol.22.012703.104538. - DOI 10.1146/annurev.immunol.22.012703.104538

#### Van Niel et al. 2003

VAN NIEL, G; MALLEGOL, J; BEVILACQUA, C et al.: Intestinal epithelial exosomes carry MHC class II/peptides able to inform the immune system in mice. In: *Gut.* 52 (2003), Nr. 12, 1690-1697. http://dx.doi.org/10.1136/gut.52.12.1690. – DOI 10.1136/gut.52.12.1690

## Van Niel et al. 2001

VAN NIEL, Guillaume; RAPOSO, Garca; CANDALH, Celine et al.: Intestinal epithelial cells secrete exosomelike vesicles. In: *Gastroenterology* 121 (2001), Nr. 2, 337–349. http://www.gastrojournal.org/ article/S0016-5085(01)28055-X/abstract

#### Vasquez et al. 1997

VASQUEZ, RJ; HOWELL, B; YVON, AM; WADSWORTH, P; CASSIMERIS, L: Nanomolar concentrations of nocodazole alter microtubule dynamic instability in vivo and in vitro. In: *Mol. Biol. Cell* 8 (1997), Nr. 6, 973-985. http://www.molbiolcell.org/cgi/content/abstract/8/6/973

#### Viani et al. 2007

VIANI, Gustavo ; AFONSO, Sergio ; STEFANO, Eduardo ; DE FENDI, Ligia ; SOARES, Francisco: Adjuvant trastuzumab in the treatment of her-2-positive early breast cancer: a meta-analysis of published randomized trials. In: *BMC Cancer* 7 (2007), Nr. 1, 153. http://dx.doi.org/10.1186/1471-2407-7-153. - DOI 10.1186/1471-2407-7-153

#### Walker et al. 2005

WALKER, Janice L.; FOURNIER, Alaina K.; ASSOIAN, Richard K.: Regulation of growth factor signaling and cell cycle progression by cell adhesion and adhesion-dependent changes in cellular tension. In: *Cytokine &* 

*Growth Factor Rev* 16 (2005), Nr. 4-5, 395 - 405. http://dx.doi.org/10.1016/j.cytogfr. 2005.03.003. - DOI 10.1016/j.cytogfr.2005.03.003

#### Wallace et al. 1994

WALLACE, Philip M.; MACMASTER, John F.; SMITH, Virginia F. et al.: Intratumoral Generation of 5-Fluorouracil Mediated by an Antibody-Cytosine Deaminase Conjugate in Combination with 5-Fluorocytosine. In: *Cancer Res* 54 (1994), Nr. 10, 2719-2723. http://cancerres.aacrjournals.org/cgi/content/ abstract/54/10/2719

## Webley et al. 2001

WEBLEY, SD ; FRANCIS, RJ ; PEDLEY, RB et al.: Measurement of the critical DNA lesions produced by Antibody-directed enzyme prodrug therapy (ADEPT) in vitro, in vivo and in clinical material. In: *Br J Cancer* 84 (2001), Juni, S. 1671–1676. http://dx.doi.org/10.1054/bjoc.2001.1843. – DOI 10.1054/bjoc.2001.1843

#### Welt et al. 1990

WELT, S; DIVGI, CR; REAL, FX et al.: Quantitative analysis of antibody localization in human metastatic colon cancer: a phase I study of monoclonal antibody A33. In: *J Clin Oncol* 8 (1990), Nr. 11, S. 1894–1906

#### Welt et al. 1996

WELT, S; SCOTT, AM; DIVGI, CR et al.: Phase I/II study of iodine 125-labeled monoclonal antibody A33 in patients with advanced colon cancer. In: *J Clin Oncol* 14 (1996), Nr. 6, 1787-1797. http://jco.ascopubs.org/cgi/content/abstract/14/6/1787

## Welt et al. 2003

WELT, Sydney; RITTER, Gerd; WILLIAMS, Jr. Clarence et al.: Phase I Study of Anticolon Cancer Humanized Antibody A33. In: *Clin Cancer Res.* 9 (2003), Nr. 4, 1338-1346. http://clincancerres. aacrjournals.org/cgi/content/abstract/9/4/1338

#### Zalatnai 2005

ZALATNAI, Attila: P-glycoprotein Expression is Induced in Human Pancreatic Cancer Xenografts During Treatment with a Cell Cycle Regulator, Mimosine. In: *Path Onc Res* 11 (2005), Nr. 3, 164–169. http: //webio.hu/por/content.php?article=717

#### Zitvogel et al. 1998

ZITVOGEL, L; REGNAULT, A; LOZIER, A et al.: Eradication of established murine tumors using a novel cell-free vaccine: dendritic cell derived exosomes. In: *Nat Med* 4 (1998), 594–600. http://dx.doi.org/doi: 10.1038/nm0598-594. – DOI doi:10.1038/nm0598-594
## Liste der eigenen Veröffentlichungen im Rahmen dieser Arbeit

**Frey, Dietmar** ; Coelho, Vania ; Petrausch, Ulf ; Schaefer, Michael ; Keilholz, Ulrich; Thiel, Eckhard ; Deckert, P. M.: *Surface Expression of gpA33 is Dependent on Culture Density and Cell-Cycle Phase and is Regulated by Intracellular Traffic Rather than Gene Transcription.* Cancer Biotherapy and Radiopharmaceuticals 23 (2008), Nr. 1, 65-73. PMID: 18298330

Petrausch, Ulf ; Dernedde, Jens ; Coelho, Vania ; Panjideh, Hossein; **Frey, Dietmar** ; Fuchs, Hendrik ; Thiel, Eckhard ; Deckert, P. M.: *A33scFv Green fluorescent protein, a recombinant single-chain fusion protein for tumor targeting.* Prot Eng Des Sel 20 (2007), Nr. 12, 583-590.

## Danksagung

Ich bedanke mich bei allen, die mich in der Ausführung dieser Dissertation unterstützt haben.

Besonderen Dank möchte ich Herrn Prof. Dr. U. Keilholz aussprechen, der die Betreuung dieser Arbeit übernommen hat und deren Ausführung in seiner Arbeitsgruppe ermöglicht hat.

Für die unmittelbare Betreung dieses Projektes bedanke ich mich bei Dr. Markus Deckert herzlich. Ohne seine stete Unterstützung und seinen Einsatz wäre die Umsetzung dieser Arbeit nicht möglich gewesen. Sein fachlicher und persönlicher Rat waren für mich von unschätzbarem Wert.

Allen Kolleginnen und Kollegen, den Labormitarbeitern und Kooperationspartnern danke ich vielmals.

Namentlich Prof. Dr. Michael Schaefer möchte ich für die Bereitstellung und Einweisung in die konfokale Lasermikroskopie danken.

Meiner Frau danke ich für ihre unerschütterliche Liebe und bedingungslose Unterstützung in den letzten Jahren. Meinen Töchtern für ihren guten Schlaf.

## Erklärung

'Ich, Dietmar Frey, erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: Charakterisierung von gpA33 und Eignung als Antikörper-Target selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt, ohne die (unzulässige) Hilfe Dritter verfasst und auch in Teilen keine Kopien anderer Arbeiten dargestellt habe.'

19. April 2011