

Im Fachbereich Biologie, Chemie, Pharmazie
der Freien Universität Berlin eingereichte Dissertation

**Charakterisierung zielgerichteter Fusionsproteine
und Etablierung eines murinen Kolonkarzinom-Modells
für die *Antibody-directed Enzyme Prodrug Therapy***

eingereicht durch

Nicole Schellmann
Berlin, Oktober 2012

Diese Arbeit wurde am Institut für Laboratoriumsmedizin, Klinische Chemie und Pathobiochemie, Charité – Universitätsmedizin Berlin unter der Anleitung von Prof. Dr. Hendrik Fuchs angefertigt.

1. Gutachter: Prof. Dr. Hendrik Fuchs
Institut für Laboratoriumsmedizin
Klinische Chemie und Pathobiochemie
Charité – Universitätsmedizin Berlin

2. Gutachter: Prof. Dr. Markus Wahl
Institut für Chemie und Biochemie
Freie Universität Berlin

Abgabe der Dissertation: 23. Oktober 2012

Datum der Disputation: 18. April 2013

Inhaltsverzeichnis

1. Zusammenfassung	7
2. Summary	9
3. Einleitung	11
3.1. Darmkrebs	11
3.1.1. Diagnose	12
3.1.2. Therapieoptionen	13
3.2. Zielgerichtete Tumorthérapien	14
3.2.1. Zielgerichtete Proteintoxine in der Tumorthérapie	15
3.2.2. Immunothérapie mit Antikörpern	15
3.2.3. <i>Antibody-directed Enzym Prodrug Therapy</i> (ADEPT)	17
3.2.3.1. Cytosindeaminase und das <i>Prodrug</i> 5-Fluorocytosin	19
3.2.3.2. Die Einzelkettenantikörper antiA33 und L19	20
4. Zielsetzung	23
5. Ergebnisse	25
5.1. Charakterisierung des Fusionsproteins L19CDy-His	25
5.1.1. Klonierung und Aufreinigung des Kontrollproteins Cytosindeaminase und der Proteindomäne <i>Extra Domain B</i>	25
5.1.2. Proteinaufreinigung und -stabilität von L19CDy-His	27
5.1.3. Charakterisierung der L19CDy-His-ED-B-Interaktion	28
5.1.4. Die ADEPT mit L19CDy-His <i>in vitro</i>	31
5.1.5. Nachweis des mit L19CDy-His erzielten <i>Bystander Effects</i>	33
5.2. Etablierung eines murinen Kolonkarzinom-Modells	36
5.2.1. Klonierung und molekularbiologischer Nachweis der Transfektion	36
5.2.2. AntiA33-CDy in der ADEPT	42
5.2.3. Untersuchungen zur Immunogenität von antiA33-CDy in BALB/c- Mäusen	46
5.2.4. Das murine Kolonkarzinom-Modell <i>in vivo</i>	49
6. Diskussion	54
6.1. <i>In-vitro</i> -Untersuchungen zur ADEPT mit L19CDy-His	54
6.1.1. Das Fusionsprotein L19CDy-His	54
6.1.1.1. <i>In-vitro</i> -Untersuchungen zur Proteinstabilität in humanem Plasma	55

6.1.1.2.	Untersuchungen zur Bindungsaffinität des Fusionsproteins	55
6.1.1.3.	Die cytotoxische Wirkung der ADEPT <i>in vitro</i>	56
6.1.1.4.	Der durch L19CDy-His hervorgerufene <i>Bystander Effect</i>	57
6.2.	Immunogenität des Fusionsproteins antiA33-CDy	59
6.3.	Etablierung einer murinen Kolonkarzinomzelllinie	61
6.4.	<i>In-vivo</i> -Untersuchungen zur cytotoxischen Wirkung von antiA33-CDy	64
7.	Materialien und Methoden	69
7.1.	Material	69
7.1.1.	Chemikalien	69
7.1.2.	Geräte	69
7.1.3.	Kits	70
7.1.4.	Zellen	70
7.1.5.	Enzyme	70
7.1.6.	Antikörper	71
7.1.7.	Primer	71
7.1.8.	Vektoren	72
7.1.9.	Kulturmedien	72
7.1.10.	Sonstiges	73
7.2.	Molekularbiologische Methoden	74
7.2.1.	Restriktionsverdau	74
7.2.2.	Agarosegelelektrophorese	74
7.2.3.	DNA-Reinigung und -Gelextraktion	74
7.2.4.	Ligation	74
7.2.5.	Herstellung kompetenter Zellen	75
7.2.6.	<i>Escherichia-coli</i> -Transformation	75
7.2.7.	Plasmidisolation	75
7.2.8.	RNA-Isolation	76
7.2.9.	Polymerasekettenreaktion	76
7.2.9.1.	Reverse Transkriptase-Polymerasekettenreaktion	76
7.2.9.2.	Sequenzierung der klonierten Vektoren	77
7.2.10.	DNA-Polyacrylamidgelelektrophorese	77
7.2.11.	<i>Pichia-pastoris</i> -Transfektion	78
7.3.	Proteinbiochemische Methoden	79
7.3.1.	AntiA33-CDy-, L19CDy-His- und His-CDy-Expression	79
7.3.2.	Expression der Proteindomäne in <i>Escherichia coli</i>	79

7.3.3.	Proteinaufreinigung durch Affinitätschromatographie	79
7.3.3.1.	Nickel-Nitrilotriessigsäure-Affinitätschromatographie	80
7.3.3.2.	Protein L-Affinitätschromatographie	80
7.3.4.	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese	80
7.3.5.	Westernblot	81
7.3.6.	Immunodetektion	81
7.3.7.	Präparation von Membranproteinen	82
7.3.8.	Proteinquantifizierung	83
7.3.9.	Enzym gekoppelte Immunadsorptionsassay	83
7.3.9.1.	Enzym gekoppelte Immunadsorptionsassay mit L19CDy-His	83
7.3.9.2.	<i>Enzyme-linked immunosorbent assay</i> mit murinem Plasma .	84
7.3.10.	Oberflächenplasmonresonanz-Analyse	84
7.3.11.	Bestimmung der Enzymaktivität	85
7.3.11.1.	L19CDy-His-Aktivität nach Plasmainkubation	85
7.3.11.2.	antiA33-CDy-Aktivität nach Plasmainkubation	86
7.4.	Zellbiologische Methoden	86
7.4.1.	Kultivierung muriner und humaner Zellen	86
7.4.2.	Transfektion muriner Kolonkarzinomzellen	87
7.4.3.	Vorbereitung muriner und humaner Zellen für <i>In-vitro</i> -Untersuchungen	87
7.4.4.	Durchflusscytometrie	87
7.4.5.	Konfokale Fluoreszenzmikroskopie	88
7.4.6.	Cytotoxizitätsassays	88
7.4.6.1.	L19CDy-His für die ADEPT <i>in vitro</i>	88
7.4.6.2.	AntiA33-CDy für die ADEPT <i>in vitro</i>	89
7.4.7.	Untersuchungen zum <i>Bystander Effects</i> der Fusionsproteine	89
7.4.7.1.	L19CDy-His im <i>Bystander Effect</i> -Assay	89
7.4.7.2.	AntiA33-CDy im <i>Bystander Effect</i> -Assay	90
7.5.	Tierexperimentelle Methoden	90
7.5.1.	AntiA33-CDy-Immunisierung	91
7.5.2.	Tumorthherapie mit antiA33-CDy <i>in vivo</i>	91
7.5.2.1.	Eine Übersicht zum murinen Kolonkarzinommodell	91
7.5.2.2.	Vorbereitung der CT26-Zellen für den <i>In-vivo</i> -Einsatz	91
7.5.2.3.	antiA33-CDy <i>in vivo</i>	92
7.5.3.	ADEPT mit antiA33-CDy <i>in vivo</i>	92
7.5.3.1.	Tumorpräparation	93

A. Verzeichnisse	I
Abkürzungen	III
Abbildungen	III
Tabellen	IV
Literatur	XXII
B. Ergänzende wissenschaftliche Daten	XXIII
C. Ergänzende personenbezogene Daten	XXIV
Lebenslauf	XXV
Wissenschaftliche Publikationen	XXV
Eidesstattliche Erklärung	XXVII
Danksagung	XXVIII

Kapitel 1.

Zusammenfassung

Die zielgerichtete Tumorthherapie kann auf verschiedenen Wegen erfolgen. Beispiele hierfür sind die Tumorthherapie mit Proteintoxinen, die Immunotherapie mit therapeutischen Antikörpern und die *Antibody-directed Enzyme Prodrug Therapy* (ADEPT). Letztere zeichnet sich durch die Verwendung von speziellen Fusionsproteinen aus, die sowohl eine zielgerichtete Proteinkomponente, als auch eine Komponente mit enzymatischer Aktivität beinhalten. Eine große Menge einer nicht toxischen Substanz (*Prodrug*) wird in dem adressierten Gewebe in kurzer Zeit durch das Enzym in eine cytotoxische Substanz (*Drug*) umgesetzt. Diese lokale Toxizität ermöglicht die Reduktion von Nebenwirkungen, die bei einer systemischen Verabreichung von Chemotherapeutika auftreten können. Das *Drug* ist membranpermeabel und diffundiert auch in benachbarte Zellen. Diese cytotoxische Wirkung auf das Tumorstroma wird als *Bystander Effect* bezeichnet und verstärkt den anti-tumoralen Therapieeffekt durch Schädigung des tumorversorgenden Gewebes.

In dieser Arbeit wurden zwei verschiedene ADEPT-Fusionsproteine untersucht, die in Hinblick auf ihre Anwendung in der zielgerichteten Tumorthherapie näher charakterisiert wurden. Beide Proteine verfügen über die in Hefen vorkommende Cytosindeaminase (CDy) und unterscheiden sich in der Bindungsspezifität aufgrund verschiedener Einzelkettenantikörperfragmente (scFv).

Das ADEPT-Fusionsprotein L19CDy-His beinhaltet den scFv L19, der eine hohe Affinität zur *Extra Domain B* (ED-B) aufweist. Die ED-B kommt ausschließlich in einer Splicevariante des humanen Fibronectins vor, welches während der Angiogenese in der extrazellulären Matrix gebildet wird. Die Entwicklung des Tumorgewebes geht mit der Angiogenese einher, sodass die ED-B eine geeignete Struktur für die Etablierung einer zielgerichteten Tumorthherapie darstellt. Das ADEPT-Fusionsprotein L19CDy-His wurde als Voraussetzung für seinen Einsatz in der Tumorthherapie *in vitro* charakterisiert. In diesem Zusammenhang wurde die zielgerichtete Komponente in Bezug auf ihre Bindungsaffinität untersucht. Die dabei bestimmte Dissoziationskonstante belegt eine moderate Bindungsaffinität zu ED-B mit einem Wert von 81 ± 7 nM. Die enzymatische Aktivität des Fusionsproteins wurde ebenfalls bestimmt, da diese die grundlegende Voraussetzung für die Bildung des cytotoxischen *Drugs* darstellt. Die Enzymaktivitätsassays mit L19CDy-His zeigten, dass die Aktivität durch die Fusion mit dem scFv L19 nicht beeinflusst wurde. Auch die Untersuchungen der enzymatischen Aktivität nach Inkubation mit humanem Plasma verdeutlichten die Stabilität von L19CDy-His. Die Aktivität in humanem Plasma sank innerhalb weniger Stunden auf 75 % des Ausgangswertes, blieb dann jedoch über einen Verlauf von drei Tagen stabil.

Die *In-vitro*-Untersuchungen mit ED-B+ und ED-B- Tumorzelllinien zeigten eine hervorragende cytotoxische Wirkung, deren Spezifität dadurch belegt werden konnte, dass ausschließlich die Vitalität der ED-B exprimierenden Zellen in der ADEPT mit L19CDy-His erfolgreich reduziert wurde.

Neben dem ADEPT-Fusionsprotein L19CDy-His wurden auch Untersuchungen zur Wirkung der Therapie mit antiA33-CDy durchgeführt. Der scFv antiA33 bindet spezifisch an das humane Glykoprotein A33 (hgpA33), welches in 95 % aller Kolonkarzinome überexprimiert wird und damit eine optimale Zielstruktur darstellt. Das Fusionsprotein antiA33-CDy wurde bereits von Panjideh et al. charakterisiert. Die zuvor gewonnenen Erkenntnisse aus *In-vitro*-Studien und einer Pilotstudie zur anti-tumoralen Wirkung in athymischen Nacktmäusen belegten die potentielle anti-tumorale Wirkung, die in dieser Arbeit detailliert *in vivo* untersucht werden sollte. Hierfür wurde eine BALB/c-syngene Tumorzelllinie generiert, die die antiA33-CDy-Zielstruktur hgpA33 exprimiert. Die Etablierung dieses Kolonkarzinom-Modells ermöglichte die ADEPT *in vivo* zu testen und deren Einfluss auf das murine Immunsystem zu analysieren. Die Therapie hgpA33+ Tumore hatte eine antiA33-CDy-konzentrationsabhängige Reduktion der Tumormasse zur Folge, die signifikante Unterschiede zwischen den behandelten und nicht behandelten Gruppen aufzeigte. Besonders ist hierbei hervorzuheben, dass die Tumore bei allen Mäusen der Gruppe, die die größte Menge des Fusionsproteins antiA33-CDy erhielten, vollständig reduziert werden konnten. Die vielversprechenden *In-vivo*-Ergebnisse zu antiA33-CDy und die ausgezeichneten Resultate zu L19CDy-His ebneten den Weg dieser Fusionsproteine für den Einsatz in der zielgerichteten Tumorthherapie, die aufgrund des gleichen Enzyms/*Prodrugs* auch in einer dualen Therapie münden könnte.

Kapitel 2.

Summary

Targeted tumor therapies can be implemented in different ways, e.g., protein toxin therapy, the immunotherapy with therapeutic antibodies, and the Antibody-directed Enzyme Prodrug Therapy (ADEPT). The latter is characterized by fusion proteins containing both a targeting and an enzymatic moiety. The targeting moiety directs the fusion protein to a specific targeted tissue, where the enzymatic moiety converts a non-toxic substance (prodrug) into a cytotoxic substance (drug). The resulting local effect reduces side effects usually occurring due to systemic administration of chemotherapeutics. Additionally, the enzyme rapidly converts a large number of prodrug molecules into drug molecules. The drug is membrane permeable and diffuses in neighboring cells as well. This bystander effect on the tumor stroma enhances the efficacy of the anti-tumor treatment by damaging tumor-supplying tissue.

In this work, two different fusion proteins have been investigated and characterized in regard to their application in the targeted tumor therapy. Both therapeutic proteins are fusions of yeast cytosine deaminase (CDy) to different targeting moieties, i.e. different single chain fragment variables (scFv).

The ADEPT fusion protein L19CDy-His contains the scFv L19, which binds the Extra Domain B (ED-B) with high affinity. ED-B is a splice variant of the human extracellular matrix protein fibronectin, which is exclusively expressed during angiogenesis. The tumor development is depended on angiogenesis, thus ED-B is a suitable structure for the establishment of a targeted tumor therapy. The fusion protein L19CDy-His has been characterized in this work *in vitro* with regard to the targeted tumor therapy. Therefore, the binding affinity of L19CDy-His to ED-B was determined. The analysis resulted in a moderate binding affinity to ED-B with a dissociation constant of 81 ± 7 nM. The enzymatic activity is the main prerequisite in drug development and was therefore determined for L19CDy-His. The analyses documented that the activity of CDy was not decreased upon fusion to the scFv L19. Studies with human plasma preincubation displayed the stability of L19CDy-His, as the enzymatic activity was reduced to 75 % within few hours, however, remained stable for three days. *In-vitro*-investigations on ED-B-expressing and ED-B-negative tumor cells clearly demonstrated a magnificent cytotoxic effect and a high specificity by affecting selectively ED-B-expressing cells.

Beside L19CDy-His, the therapeutic efficacy of the ADEPT fusion protein antiA33-CDy was investigated. The scFv antiA33 interacts with the human glycoprotein A33 (hgpA33) that is strongly expressed in 95 % of all colorectal carcinoma. The fusion protein antiA33-

CDy has been characterized by Panjideh et al. *In-vitro*-investigations and a pilot study on the anti-tumorigenic effect with athymic nude mice showed some anti-tumorigenic potential, which was investigated in detail in this work. Therefore, a hgpA33+ BALB/c-syngeneic tumor cell line was generated. This colorectal carcinoma model facilitated the analysis of ADEPT with antiA33-CDy *in vivo* and the investigation of the influence of antiA33-CDy on the murine immune system. The therapy of hgpA33+ tumors showed an antiA33-CDy concentration-dependent reduction of tumor mass and significant differences in tumor masses between treated and non-treated groups. Of particular note, the mice treated with the highest amount of antiA33-CDy achieved a complete remission without any side effects. This promising result and further excellent data obtained with L19CDy-His demonstrate the suitability of both fusion proteins for tumor therapy. Furthermore, these fusion proteins could potentially be used in a combined administration based on their need for the same prodrug.

Kapitel 3.

Einleitung

3.1. Darmkrebs

Das kolorektale Karzinom wird als Darmkrebs bezeichnet und umfasst Krebserkrankungen im Bereich des Darms, die zu 66 % im Kolon und zu etwa 30 % im Rektum auftreten [135]. Hierbei handelt es sich in fast allen Fällen um Adenokarzinome, die als maligne Veränderung des Drüsengewebes beschrieben werden. Die Diagnose Darmkrebs wird bei mehr als der Hälfte der Erkrankten im höheren Alter (> 70 Jahren) gestellt [135]. Nur bei 10 % aller Patienten tritt die Erkrankung vor dem 55. Lebensjahr auf. Das Risiko an Darmkrebs zu erkranken, kann sowohl von intrinsischen Faktoren, wie Übergewicht und Diabetis [161], als auch dem Lebensstil mit extrinsischen Faktoren, wie Ernährung, Alkoholkonsum und Rauchen beeinflusst werden [86, 156]. Beispielsweise konnte ein negativer Einfluss eines erhöhten *Body Mass Index* auf den Therapieerfolg bei einer Überexpression der Fettsäuresynthetase im Tumorgewebe gezeigt werden [122]. Dies ist eine isolierte Beobachtung und sollte daher differenziert betrachtet werden. Wie eine Auswertung der bis zum März 2010 publizierten Untersuchungen zum Einfluss der Ernährung, des *Body Mass Index* und der körperlichen Aktivität auf die Rezidivbildung bei Kolonkarzinomen und das Gesamtüberleben zeigt, bestehen die oben genannten Zusammenhänge aufgrund der bisherigen Datenlage nur für bestimmte Fälle, wie zum Beispiel einzelne Lebensmittel oder Nährstoffe [160]. Eindeutig ist jedoch der Zusammenhang eines erhöhten Erkrankungsrisikos bei familiärem Auftreten von Darmkrebs, beispielsweise aufgrund einer familiären adenomatösen Polyposis oder dem nicht-polypösen kolorektalen Krebsyndrom, nachgewiesen [91]. Letzteres wird auch als Lynch-Syndrom bezeichnet und basiert auf einer Mutation in einem *Mismatch-Repair*-Gen mit autosomal-dominantem Erbgang [141].

Das Kolonkarzinom kann in vier verschiedene Stadien unterteilt werden. In Stadium I bildet sich ein in das Darmlumen hereinragender Polyp durch inadäquate Zellvermehrung des Drüsengewebes. Das fortschreitende Wachstum führt zur Vergrößerung des Polyps, der aufgrund mangelnder Energieversorgung und Hypoxie im Inneren nekrotisches Gewebe aufweist und das Stadium II kennzeichnet. In Stadium III wächst das invasive Adenokarzinom durch die einzelnen Schichten der Darmwand, was anschließend zum direkten Kontakt mit den Lymph- und Blutgefäßen führt. Das Stadium IV ist durch die Auswanderung von Tumorzellen in das Lymph- und Blutsystem gekennzeichnet und führt häufig zu den in der Literatur beschriebenen Lebermetastasen des Kolonkarzinoms [163, 32]. Eine detaillierte Einteilung in das jeweilige Stadium erfolgt nach den Leitlinien der *Union internationale*

contre le cancer (UICC, dt. Internationale Vereinigung gegen Krebs) auf der Grundlage der TNM-Klassifikation, bei der der Tumor (T), die Lymphknoten (N) und das Auftreten von Metastasen (M) betrachtet werden [151].

3.1.1. Diagnose

Das kolorektale Karzinom gehört unter den Krebssterbefällen in Deutschland zur zweithäufigsten Todesursache mit 13,0% bei Frauen und 11,8% bei Männern [135]. Dies ist darin begründet, dass die Diagnose des Kolonkarzinoms in mehr als 70% aller Fälle erst in höheren Stadien (III/IV) gestellt wird und daher mit einer schlechten Prognose verbunden ist [64]. Zu den Tumormarkern zählen tumorassoziierte Antigene, Serumproteine, Enzyme, Hormone aber auch im Blut zirkulierende Gensequenzen. Das *Carcinoembryonic Antigen* (CEA) und das *Carbohydrate Antigen 19-9* (CA 19-9) sind die bisher am häufigsten in der Klinik eingesetzten Tumormarker im Bereich des Kolonkarzinoms, wobei das Auftreten von Serum-CEA mit großer Genauigkeit bis zu einem Jahr nach einer Resektion auf ein Rezidiv des Karzinoms hinweist [69]. Die Untersuchungen von Mourtzikou et al. zeigten für CA 19-9 die größte Sensitivität im Vergleich zu CEA, dem epidermalen Wachstumsfaktorrezeptor (EGFR) und dem epithelialen Zelladhäsionsmolekül (EpCAM) [117]. Die Identifizierung von nukleären Strukturproteinen in adenomatösen Polypen führte zu neuen, potentiellen Tumormarkern des Kolonkarzinoms [24]. Ein Beispiel ist das *Colon Cancer Specific Antigen-2* (CCSA-2), das in *In-vitro*-Untersuchungen mit Serumproben viel versprechende Ergebnisse hinsichtlich der Spezifität (78,4%) und der Sensitivität (97,3%) erzielte [105]. Einen Zusammenhang zwischen der ansteigenden Konzentration des CCSA-2 und dem klinischen Status des Patienten mit kolorektalen Karzinomen konnte auch in 40 Patientenproben durch Knychalski et al. gezeigt werden [95]. Im Gegensatz zu Leman et al. [105] schlussfolgern Knychalski et al. jedoch, aufgrund ihrer statistischen Berechnungen, dass dem CCSA-2 im Vergleich zu CEA als Tumormarker nur ein geringer diagnostischer Wert zugeschrieben werden kann.

Die Entdeckung zirkulierender Tumorstammzellen führte zu der Entwicklung neuer Nachweismethoden [80]. In diesem Zusammenhang tritt die EpCAM-Expression in Tumorstammzellen bei Kolon-, Pankreas-, Prostata- und Mammakarzinomen in den Vordergrund [60]. EpCAM wird nicht in Blutzellen, jedoch spezifisch auf den im Blut zirkulierenden Tumorstammzellen exprimiert, sodass diese zirkulierenden Zellen gezielt isoliert und charakterisiert werden können [169]. Die bisher angestrebten diagnostischen Verfahren verfolgen unabhängig von den Markern alle das Ziel, den Nachweis von Tumoren und Metastasen valide und nicht invasiv zu gestalten, um eine möglichst zeit- und patientennahe Therapie durchzuführen [82].

3.1.2. Therapieoptionen

Die Resektion des betroffenen Darmabschnittes ist eine seit langem praktizierte Methode bei der Behandlung des Kolonkarzinoms. Wie Fred Rankin schon 1934 beschrieb, erfolgte die erste gestaffelte Resektion mit Exteriorisation und Dekompression durch Paul von Liverpool im Jahre 1892 [134]. Die medizinischen Fortschritte der letzten Jahrzehnte eröffnen eine Vielzahl verschiedener Therapiemöglichkeiten. Seit 1990 wird empfohlen bei Patienten mit kolorektalem Karzinom im Stadium III nach der vollständigen Resektion des Tumorgewebes eine adjuvante Therapie einzusetzen [119]. Diese Therapie umfasst die Bereiche Chemo-, Hormon-, Immuno- und Strahlentherapie. Bei der Chemotherapie werden verschiedene Zytostatika, wie zum Beispiel das Pyrimidinanalogon 5-Fluorouracil (5-FU) [137], das Platinanalogon Oxaliplatin [10] oder das Anthracyclin Doxorubicin eingesetzt [47]. Häufig verwendete Wirkstoffkombinationen sind FOLFOX, bestehend aus 5-FU, Folinsäure und Oxaliplatin oder FOLFIRI mit Folinsäure, 5-FU und Irinotecan [38]. In neueren klinischen Studien wurde die adjuvante Therapie auch ab Stadium II nach erfolgreicher Resektion des Tumorgewebes eingesetzt [62], obwohl die Notwendigkeit bisher noch nicht eindeutig belegt ist.

Ist die Chemotherapie nach Resektion induziert, sollte sie innerhalb von 12 Wochen nach der Resektion erfolgen, um den bestmöglichen Therapieeffekt zu erzielen [154]. Abgesehen von den medizinischen Möglichkeiten muss abgewägt werden, ob eine adjuvante Therapie für den betroffenen Patient geeignet ist. Hierbei spielt die altersabhängige Morbidität, die auch bei anderen klinischen Fragestellungen ausschlaggebend für die durchzuführende Therapie ist, eine entscheidende Rolle [28]. In einigen Fällen führt sie dazu, dass ein Teil der Patienten nach der Resektion keine adjuvante Therapie erhält. Dies belegt auch die retrospektive Auswertung einer klinischen Studie mit 613 Patienten nach Resektion des Kolonkarzinoms im Stadium III [45]. Die Auswertung dieser Studie ergab, dass aufgrund einer oder mehrerer Co-Morbiditäten oder einer Co-Morbidität in Verbindung mit ihrem Alter, 18% der Patienten keine adjuvante Therapie erhielten. Zudem lehnten 9% der Patienten eine Chemotherapie nach einem Informationsgespräch zu diesem Thema ab.

3.2. Zielgerichtete Tumorthapien

Ein Tumorrezidiv kann aus nur einer einzelnen Tumorzelle hervorgehen. Daher steht grundsätzlich die Entfernung aller Tumorzellen im Vordergrund. Dieses Ziel wird mit einer systemisch angewandten Chemotherapie nach Resektion des Kolonkarzinoms verfolgt. Die mit dieser Therapie erreichten Verlängerungen des Gesamtüberlebens sind jedoch in vielen Fällen mit ernsthaften Nebenwirkungen verbunden, die sich in Form von hämatologischer Toxizität, wie Anämie, Neutropenie, Thrombocytopenie oder Leukozytopenie widerspiegeln [85, 100, 171]. Neben Diarrhoe, Nausea und Emesis treten infolge der multiplen Verabreichung von Chemotherapeutika auch unerwünschte kardiovaskuläre Nebenwirkungen auf [124, 37]. Aufgrund der geringen therapeutischen Breite können die Chemotherapeutika nicht in den Konzentrationen eingesetzt werden, die für eine vollständige Elimination aller Tumorzellen notwendig wären. In Bezug auf diese Erkenntnisse wurde eine Vielzahl zielgerichteter Moleküle entwickelt.

Die zielgerichtete Tumorthapie basiert auf einer lokal begrenzten und tumorspezifischen Therapie des betroffenen Gewebes. Die Spezifität wird zum Beispiel durch den Einsatz von Liganden, Immunoglobulinen der Klasse G (IgG) und deren Proteinfragmenten wie dem $F(ab')_2$ -Fragment oder dem Einzelkettenantikörperfragment (scFv) erzielt. Ein $F(ab')_2$ -Fragment entsteht durch die enzymatische Abspaltung des Fc-Fragmentes eines IgGs, wobei die beiden bindungsspezifischen Domänen erhalten bleiben [79]. Ein scFv besteht nur aus dem variablen Fragment der leichten Kette, die über einen Peptidlinker mit der schweren Kette eines Immunoglobulins verknüpft ist [19]. Sowohl das $F(ab')_2$ -Fragment, als auch ein scFv, enthält kein Fc-Fragment. Dies bietet gegenüber den Antikörpern den Vorteil, dass eine Immunreaktion in Form einer antikörperabhängigen, zellulären Cytotoxizität durch diese Proteine nicht ausgelöst wird [30].

Die Verknüpfung der Antikörper oder deren Fragmente mit therapeutisch wirksamen Substanzen, wie Toxinen, Antikörpern oder Enzymen generiert zielgerichtete, anti-tumoral wirkende Moleküle. Zu den zielgerichteten Tumorthapien zählen unter anderen I) die Tumorthapie mit Proteintoxinen, II) die Immunotherapie mit Antikörpern und III) die *Antibody-directed Enzyme Prodrug Therapy* (ADEPT).

3.2.1. Zielgerichtete Proteintoxine in der Tumorthherapie

Zielgerichtete Proteintoxine bestehen aus einem hochwirksamen Toxin und einem Liganden, der die Spezifität vermittelt. Das Toxin ist zumeist pflanzlichen oder bakteriellen Ursprungs und kann mit dem Liganden als rekombinantes Fusionsprotein exprimiert werden. Durch den Liganden erfolgt die zielgerichtete Aufnahme in die Tumorzellen. Zielgerichtete Proteintoxine unterscheiden sich von Immunotoxinen dahingehend, dass letztere anstatt des Liganden einen monoklonalen Antikörper aufweisen [101]. Der EGFR zählt neben dem Interleukin-2-Rezeptor und dem Leukozytenantigen CD22 zu den am häufigsten verwendeten Zielstrukturen [56, 115]. Die Eignung des EGFR als Zielstruktur belegen die Untersuchungen mit dem Proteintoxin SE, bestehend aus dem epidermalen Wachstumsfaktor (EGF) und dem Toxin Saporin. Die cytotoxische Wirkung von SE konnte nach einstündiger Inkubation durch eine deutliche Einschränkung des Tumorzellwachstums oraler Plattenepithelkarzinomzellen *in vitro* gezeigt werden [12]. Die N-Glykosidaseaktivität des Saporins führt durch Abspaltung des Adenins 4325 in der 28S-rRNA [149] zur Inaktivierung von Ribosomen [145]. Wie Bachran et al. in einem BALB/c-Modell zeigten, kann die cytotoxische Wirkung des SE in Kombination mit einem Triterpenoidgemisch (*Saponinum album*) erheblich gesteigert werden [11]. Die bisher verwendeten bakteriellen und pflanzlichen Toxine wurden bereits in klinischen Studien eingesetzt, weisen jedoch einige Hürden, wie die Immunogenität des Toxins und die unspezifische Toxizität auf [112]. Die neueste Generation der Proteintoxine basiert auf humanen Toxinen mit denen diese Hürden überwunden werden sollen. Zu den humanen Toxinen zählen zum Beispiel RNasen [21] oder proapoptotische Proteine wie BAX, dem tumornekrosefaktorabhängigen Apoptose induzierenden Liganden (TRAIL) oder Granzyme B [9, 23, 42, 107]. RNasen werden hier aufgrund ihrer Eigenschaft RNA abzubauen als Toxin eingestuft, da die Inhibition der Proteinbiosynthese zum Zelltod führt [112].

3.2.2. Immunotherapie mit Antikörpern

Die Bezeichnung Immunoglobulin basiert auf der globulären Struktur der Antikörper, die aufgrund verschiedener konstanter Fragmente (Fc) bereits 1964 von Immunologen im *Bulletin of the World Health Organization* in die Klassen IgA, IgG, IgD und IgM eingeteilt wurden [103]. Erst vier Jahre später wurde die Immunoglobulin-Klasse E (IgE) in Anlehnung an die *Nomenclature of Human Immunoglobulins* als eigene Klasse eingeführt [16]. Zu diesem Zeitpunkt wurde schon durch Stanworth postuliert, dass das Fc-Fragment dieser Immunoglobuline für die passive Aktivierung des Immunsystems verantwortlich ist [43]. Die auf dieser Grundlage entwickelte Immunotherapie mit Antikörpern ist eine Form der

passiven Immunsierung, bei der das Fc-Fragment des eingesetzten Antikörpers für die Aktivierung des Immunsystems in Form der antikörperabhängigen, zellulären Cytotoxizität verantwortlich ist [30]. Dieses Phänomen konnte sehr anschaulich mit trifunktionalen bispezifischen Antikörpern gezeigt werden [44]. Die in diesen Molekülen enthaltene Fc-Region war ausschlaggebend für die Aktivierung Fc-Rezeptor exprimierender Zellen, die mit dem identischen $F(ab')_2$ -Fragment nicht erzielt werden konnte.

Die Antikörperverabreichung kann verschiedene Auswirkungen haben. Die Antikörperbindung an Transmembranrezeptoren kann zum Beispiel dazu führen, dass die Ligandenbindungsstelle blockiert wird, ohne die nachgeschaltete Signalkaskade zu aktivieren [70]. Die Bindung kann auch die Internalisierung von Transmembranrezeptoren wie zum Beispiel dem EGFR oder tumorassoziierten Antigenen veranlassen und dadurch deren Anzahl auf der Zelloberfläche verringern [70].

Die Immunotherapie mit Antikörpern wird bereits in der Klinik angewendet. Hierfür stehen verschiedene zugelassene Antikörper zur Verfügung, die jedoch in Kombination mit Chemotherapeutika eine deutlich bessere anti-tumorale Wirkung zeigen. Hierzu zählt der chimäre Antikörper Cetuximab, der gegen den EGFR gerichtet ist und für die Behandlung kolorektaler Karzinome sowie Hals- und Kopfkarzinome zugelassen wurde [148]. Zudem wurde für die Behandlung des metastasierenden kolorektalen Karzinoms der humane Antikörper Panitumumab, der ebenfalls an EGFR bindet, zugelassen [110]. Der humanisierte Antikörper Bevacizumab bindet an den vaskulären endothelialen Wachstumsfaktor (VEGF-A) und inhibiert dadurch die Angiogenese in Tumoren. Dieser Antikörper wurde für verschiedene Karzinome, wie dem metastasierenden kolorektalen Karzinom, dem nicht-kleinzelligen Lungenkarzinom, dem Glioblastom und Nierenkarzinomen zugelassen [162].

Obwohl zum Kolonkarzinom die meisten Untersuchungen und Studien durchgeführt wurden, gibt es bis heute keinen spezifischen Test, der die anzuwendende Therapie aufgrund der jeweiligen Tumoreigenschaften prognostiziert. Das ist darin begründet, dass jeder Tumor einzigartige, genetische und epigenetische Veränderungen aufweisen kann, die einen Einfluss auf die Immunantwort des Organismus und damit auch auf den Tumor haben [121]. Darüber hinaus hat die genetische Individualität der Patienten einen Einfluss auf die Wirksamkeit und Toxizität der angewendeten Therapeutika [144]. Die Analyse der genetischen Prädisposition könnte dabei helfen eine individuelle Therapie mit hoher Wirksamkeit und geringer Toxizität zu entwickeln.

3.2.3. *Antibody-directed Enzym Prodrug Therapy (ADEPT)*

In der *Antibody-directed Enzym Prodrug Therapy* werden Fusionsproteine verwendet, die sowohl eine enzymatisch aktive, als auch eine zielgerichtete Komponente in sich vereinen [14]. Für letztere werden Antikörper oder Antikörperfragmente verwendet, die eine Affinität gegenüber tumorassoziierten Proteinen aufweisen. Diese Proteine kommen auf der Oberfläche der Tumorzellen oder in deren direkter Umgebung, der extrazellulären Matrix, vor. Die enzymatisch aktive Komponente hat die Aufgabe eine nicht toxische Substanz, die als *Prodrug* bezeichnet wird, direkt am Bindungsort des Fusionsproteins in eine toxische Substanz (*Drug*) umzusetzen. Voraussetzung hierfür ist, dass das verwendete Enzym nicht in dem betroffenen Organismus vorkommt, damit die Bildung des *Drugs* nicht in gesunden Geweben erfolgt [15]. Wie in der Abbildung 3.1 gezeigt wird, erfolgt die Verabreichung des Fusionsproteins zeitlich getrennt von der des *Prodrugs*, um die systemische Umsetzung durch noch im Blutkreislauf zirkulierende Fusionsproteine zu vermeiden. Hierzu wurde eine spezielle Strategie entwickelt, die die Verabreichung eines neutralisierenden Antikörpers vorsieht. Dieser inaktiviert das ungebundene Fusionsprotein durch Bindung, wodurch der Zeitraum zwischen der Verabreichung des Fusionsproteins und des *Prodrugs* verringert werden kann. Dies erhöht die Wahrscheinlichkeit, dass ausreichend enzymatisch aktive Fusionsproteine vorhanden sind, die die Bildung des *Drugs* ermöglichen. Die Entwicklung der ADEPT begann mit den Forschungsarbeiten Kenneth D Bagshawes an einem Fusionsprotein, dessen Antikörper spezifisch an das humane Choriongonadotrophin bindet und der mit der Carboxypeptidase G₂ verknüpft wurde [13]. Die zahlreichen Untersuchungen in den letzten Jahrzehnten führten zur Entwicklung verschiedener ADEPT-Fusionsproteine, die sowohl vollständige Antikörper als auch Antikörperfragmente enthalten. Die Verwendung von scFvs, die rekombinant hergestellt werden, ist bei den ADEPT-Fusionsproteinen stark verbreitet [6, 68, 4, 29]. Aber auch Fab-Fragmente kommen für ADEPT-Fusionsproteine zum Einsatz. Wie Napier et al. in Tumorbiopsien zeigten, wurde das für ADEPT bestimmte A5B7 F(ab')₂-Fragment, welches spezifisch an CEA bindet, erfolgreich im Kolonkarzinom angereichert [118]. Einige der entwickelten Fusionsproteine wurden nach erfolgreichen präklinischen Studien bereits in klinischen Studien getestet.

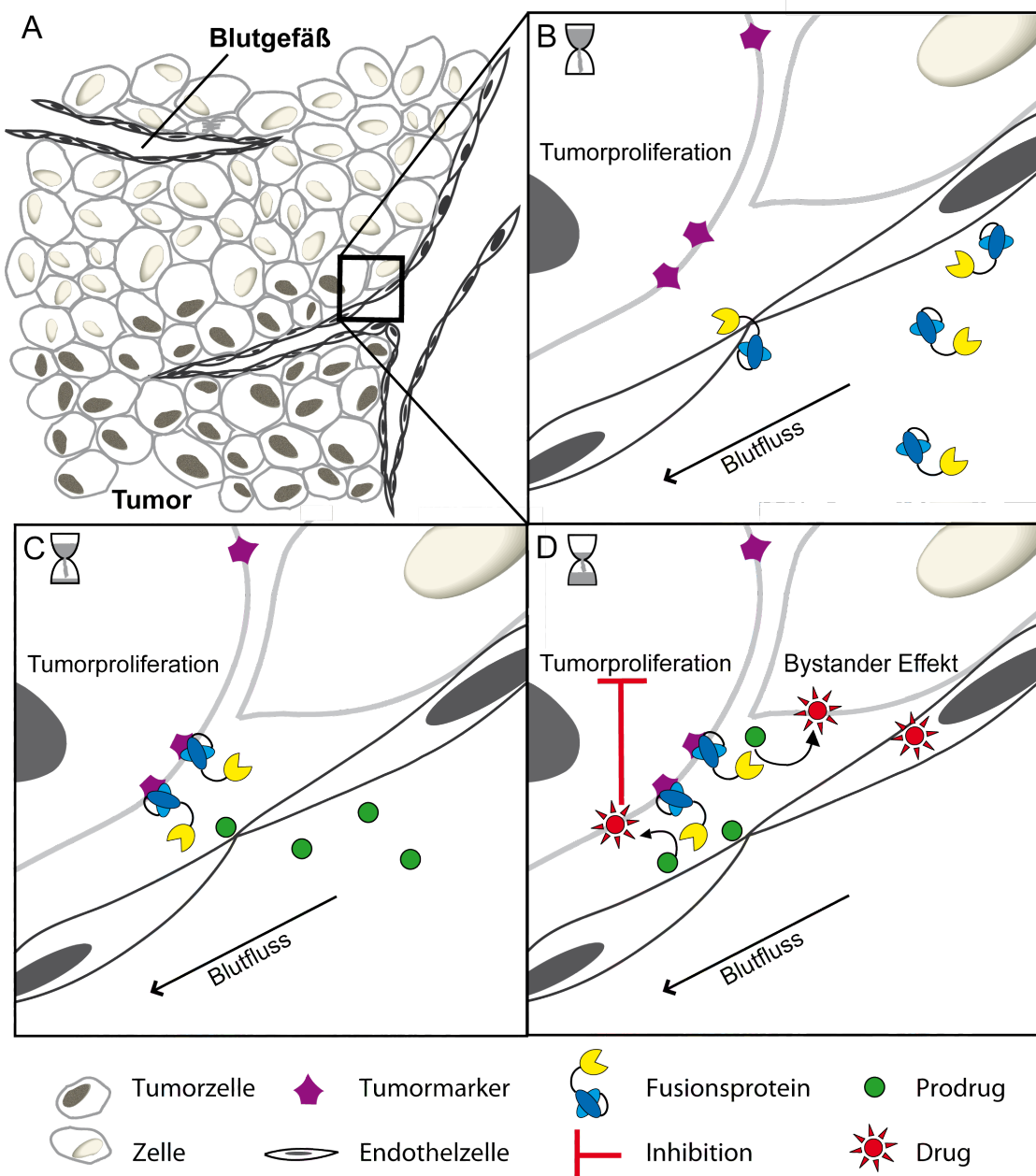


Abb. 3.1.: Die Abbildung zeigt (A) eine Ansammlung von Tumorzellen (dunkler Zellkern) und neugebildete Blutgefäße. (B) Die *Antibody-directed Enzyme Prodrug Therapy* beginnt mit der Verabreichung eines Fusionsproteins, das spezifisch an Proteine (Tumormarker) bindet, die von den Tumorzellen gebildet werden und auf deren Zelloberfläche oder in deren extrazellulärer Matrix vorkommen. (C) Nachdem die ungebundenen Fusionsproteine renal elimiert wurden, erfolgt die Gabe einer nicht toxischen Substanz (*Prodrug*), die durch das im Fusionsprotein enthaltene Enzym in eine toxische Substanz (*Drug*) umgesetzt wird. (D) Dieses *Drug* diffundiert in die Tumormarker präsentierenden Zellen und inhibiert deren Proliferation. Ein *Bystander Effect* wird durch die Diffusion des *Drugs* in das umliegende Tumor versorgende Gewebe ermöglicht. Die Abbildung wurde auf der Basis einer eigenen Abbildung erstellt, die im Rahmen dieser Dissertation bereits publiziert wurde (Schellmann et al.(2012)).

3.2.3.1. Cytosindeaminase und das *Prodrug* 5-Fluorocytosin

Hervorzuheben ist hier die Cytosindeaminase (CD), die sowohl in Hefen als auch Bakterien vorkommt. CD aus Hefen (CDy) unterscheidet sich von dem bakteriellen Protein in seiner molekularen Masse und dem komplexierten Ion. CDy katalysiert die hydrolytische Deaminierung der Pyrimidinbase Cytosin (Abb. 3.2 A), die mit der Bildung eines tetraedrischen Intermediats verbunden ist [58]. Die Deaminierung des *Prodrugs* 5-Fluorocytosin (5-FC) kann auch durch CDy erfolgen und zur Bildung des Chemotherapeutikums 5-FU (Abb. 3.2 B) führen.

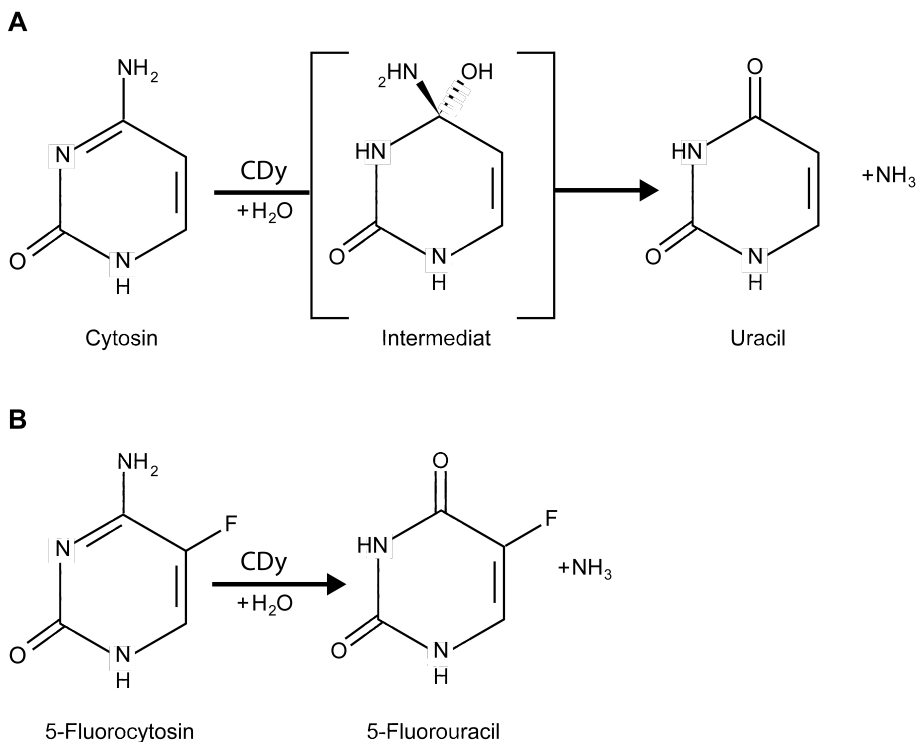


Abb. 3.2.: **(A)** CDy katalysiert die hydrolytische Deaminierung Cytosins, wobei ein tetraedrisches Intermediat gebildet wird und Uracil entsteht. **(B)** Die Deaminierung des 5-Fluorocytosins wird ebenfalls durch CDy katalysiert. Hier entsteht das Chemotherapeutikum 5-Fluorouracil. Die Abbildung wurde auf der Basis einer Abbildung von Ireton et al. (2003) erstellt [58].

Der Chemiker Charles Heidelberger entwickelte 5-FU und publizierte dies unter dem Titel *Fluorinated Pyrimidines, A New Class of Tumor-Inhibitory Compounds* [74]. Die ersten klinischen Studien, in denen 5-FU für die Therapie von soliden Tumoren eingesetzt wurde, folgten umgehend. Sie belegten die Reduktion des Tumorgewebes, jedoch konnte dieser Erfolg nur bei Patienten erzielt werden, die sehr hohe Mengen erhielten und dadurch von schweren Begleiterscheinungen betroffen waren [36]. 5-FU entfaltet seine cytotoxische

Wirkung besonders deutlich in Zellen, die eine hohe Teilungsrate aufweisen. Diese Zellen synthetisieren vermehrt RNA und DNA und sind daher sensibler gegenüber Störungen in deren Synthese. Bei der ADEPT diffundiert das an der Zelloberfläche gebildete 5-FU in die Zellen und wird erst dort in aktive, membranimpermeable Metabolite umgewandelt [67]. Das unter anderen Metaboliten gebildete fluorodesoxyuridinmonophosphat inhibiert die Thymidylat-Synthetase. Dies hat zur Folge, dass die *De-novo*-Synthese des Thymidinmonophosphates unterbleibt, wodurch die DNA-Synthese gestoppt wird, da kein anderes Enzym die Aufgabe übernehmen kann [128].

Der älteste Eintrag für 5-FC in der *National Library of Medicine* im *National Institute of Health* ist von Grunberg et al. aus dem Jahre 1963 mit dem Titel *Chemotherapeutic Activity of 5-fluorocytosine* [61]. Die ursprüngliche Überlegung 5-FC als humanes Chemotherapeutikum einzusetzen wurde schnell verworfen, da kein therapeutisch toxischer Effekt erzielt werden konnte. Dies ist darin begründet, dass im menschlichen Organismus die Deaminierung aufgrund des fehlenden Enzyms nicht erfolgt [96]. Jedoch können Behandlungen mit 5-FC, die eine Serumkonzentration von $125 \mu\text{g}/\text{ml}$ überschreiten zur Knochenmarkstoxizität führen [89]. 5-FC wird erfolgreich als Antimykotikum bei Patienten mit Pilzkrankungen eingesetzt und unter den Namen *Ancobon* in den Vereinigten Staaten von Amerika und *Ancotil* in Kanada vertrieben.

3.2.3.2. Die Einzelkettenantikörper antiA33 und L19

Die stetige Weiterentwicklung der Antikörper führte auch bei den ADEPT-Fusionsproteinen zur Verknüpfung von scFv, F(ab')- und F(ab')₂-Fragmenten mit Enzymen [29, 4, 18, 130]. Ein Beispiel ist der monoklonale antiA33-Antikörper mAbA33, dessen Anreicherung bereits in Patienten mit metastasierendem Klonkarzinom gezeigt wurde [164]. Der mAbA33 bindet spezifisch an das humane Glykoprotein A33 (hgpA33), welches erstmals aus der Membran der humanen Kolonkarzinomzelllinie LIM1215 isoliert wurde [27]. Das hgpA33 ist ein Transmembranprotein mit einer molekularen Masse von etwa 43 kDa, dessen Funktion im menschlichen Organismus bisher noch unklar ist. Die Untersuchungen des murinen gpA33s (mgpA33), welches mit dem hgpA33 zu 62 % identisch ist, weisen darauf hin, dass mgpA33 an der Interaktion von Zellen durch Zell-Zell-Adhäsion [87] und *Cell Trafficking* [1] beteiligt ist. Die Untersuchungen von 450 humanen Tumorproben zeigte, dass hgpA33 in 95 % aller Kolonkarzinome exprimiert wird [57]. Die hgpA33-Expression trat auch in 50 % der getesteten Magenkarzinome auf, war jedoch auf Tumore des Gastrointestinaltraktes beschränkt. Immunhistochemische Untersuchungen des gesunden Darmgewebes belegten auch eine hgpA33-Expression in der intestinalen Mucosa. Wie Sakamoto et al. jedoch beschreiben, wird hgpA33 hauptsächlich an den Enden der Kolonkrypten und nur geringfügig an der

Kryptenbasis exprimiert [138]. Dadurch, dass die Stammzellen des Kolons in der Kryptenbasis vorkommen und die Zellen an der Kryptenspitze natürlicherweise regelmäßig ersetzt werden, kann davon ausgegangen werden, dass hgpA33 trotz des Vorkommens in gesundem Gewebe für die zielgerichtete Tumorthherapie geeignet ist.

Im Jahre 2000 stellten Rader et al. erstmals humanisierte Antikörperfragmente mit einer Affinität zu hgpA33 her. Zunächst wurden Kaninchen mit hgpA33 immunisiert und dann mittels *Phage Display* chimäre Fab-Fragmente generiert, deren konstanter Teil humanen Ursprungs war. Im Anschluss daran erfolgte die Humanisierung der variablen Anteile, wobei die Antigenaffinität erhalten blieb. Auf deren Grundlage wurde der scFv A33 entwickelt. Mit dem Ziel der Generierung eines diagnostischen Proteins zum Nachweis von hgpA33 in Tumoren wurde ein Fusionsprotein aus dem grün fluoreszierendem Protein und dem scFv antiA33 hergestellt [131]. Für die Generierung eines hgpA33-spezifischen ADEPT-Fusionsprotein wurde der scFv antiA33 von Deckert et al. mit CDy fusioniert [41]. Die Untersuchungen zur Bindungsaffinität mittels Oberflächenplasmonresonanz belegten, dass die hgpA33-Bindungsaffinität des Fusionsproteins im Vergleich zum ungebundenen scFv nur geringfügig kleiner war. Zudem wurde die anti-tumorale Wirkung des Fusionsproteins in Kombination mit dem *Prodrug* 5-FC in Untersuchungen mit den hgpA33 exprimierenden (hgpA33+) Zellen LIM1215 *in vitro* nachgewiesen. Es folgten die nähere Charakterisierung des Fusionsproteins und Biodistributionsstudien in athymischen Nacktmäusen [126, 127]. Die bisherigen Untersuchungen zum Fusionsprotein antiA33-CDy veranschaulichten dessen Potential, beinhalteten jedoch keine *In-vivo*-Versuche in immunkompetenten Mäusen. Letzteres hat in Hinblick auf den möglichen Einsatz von antiA33-CDy in der zielgerichteten Tumorthherapie aufgrund der potentiell immunogen wirkenden CDy eine entscheidende Bedeutung.

Als Zielstrukturen für ADEPT eignen sich, neben den tumorassoziierten Proteinen, auch Proteine in der extrazellulären Matrix des Tumorgewebes. Dies ist darin begründet, dass das gebildete *Drug* erst in die Tumorzellen diffundiert. Da die Diffusion nicht gerichtet stattfindet, sind auch Zellen in der direkten Umgebung der Zielstruktur betroffen. Dieser so genannte *Bystander Effect* bietet den Vorteil, dass die anti-tumorale Wirkung sowohl auf Zellen erfolgt, die eine geringere Expressionsrate des tumorassoziierten Proteins aufweisen, als auch auf solche, die an der Tumorversorgung beteiligt sind.

Ein Beispiel für eine solche Zielstruktur ist die *Extra Domain B* (ED-B). Diese Domäne tritt nur in einer Splicevariante des humanen fibronektins auf, welche erstmal von Kornblihtt et al. 1984 beschrieben wurde [97]. ED-B tritt bei Erwachsenen ausschließlich bei der Wundheilung, während der Menstruation oder bei Erkrankungen, die mit einer Teilung der Endothelzellen verbunden sind, auf. Die Bildung des Tumorgewebes geht einher mit der Angio-

genese, die mit der Aussprossung von Endothelzellen aus einem bereits bestehenden Gefäß beginnt. Die daran beteiligten Endothelzellen sezernieren neben einer Vielzahl anderer Matrixproteine die ED-B-Splicevariante des fibronektins. Wie Borsi et al. zeigten, tritt ED-B im Vergleich zu humanen fibroblasten bei Erwachsenen in Tumorzellen zehnmal häufiger auf [22].

Bereits 1971 postulierte Judah Folkman, dass I) die Angiogenese essentiell für den Tumor ist, II) der Tumor Angiogenesefaktoren produziert und III) die Angiogeneseinhibition eine potentielle Tumortherapie darstellen könnte [52]. Zu den Angiogenesefaktoren zählt der VEGF, der sowohl die Vaskulogenese als auch die Angiogenese reguliert und in einer Vielzahl von Tumoren exprimiert wird. Letzteres führte dazu, dass die Entwicklung von Angiogeneseinhibitoren für die Tumortherapie in den Vordergrund rückte. Ein Beispiel hierfür ist die Entwicklung des monoklonalen Antikörpers Bevacizumab, der bei Patienten mit rektalem Karzinom schon nach einmaliger Verabreichung zur Verringerung der Tumorperfusion und des interstitiellen Flüssigkeitsdruck führte [166]. Letzterer steigt mit dem Tumolvolumen an und kann in Verbindung mit verminderter Durchblutung den Erfolg antineoplastischer Therapien schmälern [63]. *In-vivo*-Untersuchungen in Ratten zeigten jedoch, dass eine Kombinationstherapie mit den herkömmlichen Therapeutika einer alleinigen Verabreichung von Bevacizumab vorzuziehen ist [116]. In klinischen Studien wurden in den letzten Jahren verschiedene Bevacizumab-Kombinationen für die Therapie des kolorektalen Karzinoms getestet. Therapieerfolge konnten hier bei Kombination von Bevacizumab mit Leucovorin und den Chemotherapeutika 5-FU und Oxaliplatin (FOLFOX) oder 5-FU und Irinotecan (FOLFORI) erzielt werden. Die klinischen Studien mit diesen Therapieansätzen zeigen eine Verbesserung des *Overall Survival*s, sind jedoch auch mit den bereits beschriebenen Nebenwirkungen verbunden. In diesem Zusammenhang entstand die Idee, die Angiogeneseinhibition durch ein ADEPT-Fusionsprotein zu erzielen. Der scFv L19 stellte sich als ein potentielles, zielgerichtetes Protein heraus, da er mit einer hohen Affinität an die ED-B-Splicevariante des fibronektins bindet [132]. Dieser scFv L19 wurde bereits mit vielen verschiedenen Proteinen fusioniert, wobei die Affinität gegenüber ED-B nicht beeinträchtigt wurde. Dies belegen unter anderem Fusionsproteine des scFv mit Zytokinen, wie Interleukin 2 und 12 oder dem *Vascular Endothelial Growth Factor* [25, 65, 66]. Riva et al. zeigten in einer klinischen Studie mit einem I^{123} markierten, dimeren scFv L19 dessen spezifische Anreicherung in verschiedenen Tumorgeweben [139]. Hierbei konnte auch zwischen ruhendem und wachsendem Tumorgewebe unterschieden werden. Hervorzuheben ist, dass keine unerwünschten Nebenwirkungen auftraten. Diese vielversprechenden Ergebnisse führten zur Generierung des Fusionsproteins L19CDy-His, welches die hohe ED-B-Bindungsaffinität des scFv L19 und die Deaminase-Aktivität der CDy in sich vereint.

Kapitel 4.

Zielsetzung

Das kolorektale Karzinom ist eine sehr ernstzunehmende Erkrankung, die in Deutschland jährlich bei durchschnittlich 30.000 Frauen und 35.000 Männern diagnostiziert wird (Robert-Koch-Institut, Stand 2008, [135]). In der Klinik erfolgt zunächst die Resektion des betroffenen Gewebes. Abhängig vom Entwicklungsstadium des Karzinoms schließt sich eine Chemotherapie an, die mit einer Immunotherapie kombiniert wird. Der Großteil der Patienten ist im fortgeschrittenen Alter ($\approx 50\%$, ≥ 70 Jahre). Um die Belastungen, die mit der Chemotherapie einhergehen, zu reduzieren, wird seit mehreren Jahrzehnten an der Entwicklung alternativer Therapien gearbeitet. In diesem Zusammenhang wurden die Fusionsproteine antiA33-CDy und L19CDy-His für die Antibody-directed Enzyme Prodrug Therapy (ADEPT) entwickelt. Das Enzym Cytosindeaminase (CDy) ist in beiden Fusionsproteinen identisch. Aufgrund unterschiedlicher Einzelkettenfragmente (scFv) unterscheiden sie sich jedoch in ihrer Bindungsspezifität.

Ziel dieser Arbeit ist die Charakterisierung der Fusionsproteine in Hinblick auf deren Einsatzmöglichkeit in der Therapie des kolorektalen Karzinoms. Die Eigenschaften des Fusionsproteins L19CDy-His sind bisher nicht erforscht, jedoch deren Proteinkomponenten unabhängig voneinander. Der scFv L19 bindet an die Extra Domäne B (ED-B), welche vermehrt während der Tumorangio-genese auftritt. Eine Voraussetzung für die Untersuchungen der Bindungsspezifität und -affinität ist die Herstellung der ED-B, die in dem Expressionsorganismus *Escherichia coli* erfolgen soll. Durch die Immobilisation der ED-B kann die Bindungsspezifität von L19CDy-His in einem enzymgekoppelten Immunadsorptionsassay nachgewiesen werden. In einer Oberflächenplasmonresonanz-Analyse soll ED-B eingesetzt werden, um die Bindungsaffinitätskonstanten von L19CDy-His zu bestimmen und mit denen des ungebundenen scFv L19 vergleichen zu können. Die enzymatische Aktivität der CDy ermöglicht in kürzester Zeit die Generierung einer Vielzahl therapeutisch wirksamer Moleküle. Diese Aktivität soll genutzt werden, um die Stabilität des Fusionsproteins in unterschiedlichen Medien und bei verschiedenen Lagertemperaturen zu testen. Der Einsatz von Humanplasma steht hierfür im Vordergrund, da die enzymatische Stabilität in diesem Medium von entscheidender Bedeutung für die *In-vivo*-Anwendung ist. Darüber hinaus sollen ED-B exprimierende Tumorzellen in einer ADEPT *in vitro* eingesetzt werden, um die untersuchten Eigenschaften des Fusionsproteins im erwarteten Zusammenspiel in der Zellkultur zu zeigen.

In-vitro-Untersuchungen zum Fusionsprotein antiA33-CDy zeigten dessen therapeutisches Potential, jedoch existieren bisher keine aussagekräftigen *In-vivo*-Untersuchungen. Daher

wurde angestrebt ein Maustumormodell zu entwickeln. Dieses bietet die Möglichkeit sowohl die therapeutische Wirksamkeit der ADEPT mit antiA33-CDy als auch dessen Wirkung auf das murine Immunsystem zu untersuchen. In diesem Zusammenhang wird zunächst angestrebt murine, BALB/c-syngene Kolonkarzinomzellen mit dem humanen Glykoprotein A33 (hgpA33) stabil zu transfizieren. Das antiA33-CDy besitzt eine hohe Affinität gegenüber hgpA33, welches in 95% aller humanen Kolonkarzinome überexprimiert wird [57]. Für die Generierung der hgpA33-Tumorzellen soll die cDNA mit einem Fluoreszenzmarker fusioniert werden, um die Expression und Lokalisation des Antigens mittels konfokaler Fluoreszenzmikroskopie zu ermöglichen. Zudem wird damit die Grundlage geschaffen die erfolgreich transfizierten Zellen mittels *Fluorescence-activated Cell Sorting* zu sortieren. Die Eignung der Tumorzellen für die ADEPT soll zunächst in einem Cytotoxizitätsassay *in vitro* erfolgen. Unter der Voraussetzung, dass eine Reduktion der Zellvitalität nach Behandlung der Zellen mit antiA33-CDy und dem *Prodrug* nachgewiesen werden kann, wird angestrebt die Zellen für die Etablierung eines Tumors in BALB/c-Mäusen zu verwenden. Die Effektivität der ADEPT mit antiA33-CDy soll anhand der Inhibition des Tumorwachstums gemessen werden. Vor dem Hintergrund, dass die in dem Fusionsprotein enthaltene CDy ein Hefeprotein ist und daher potentiell immunogen wirken könnte, ist geplant das murine Plasma in einem enzymgekoppelten Immunadsorptionsassay zu untersuchen. Das BALB/c-Mausmodell ermöglicht die Untersuchung der Immunogenität und der therapeutischen Effektivität des Fusionsproteins antiA33-CDy und stellt daher einen wichtigen Bestandteil für die Entwicklung einer Alternativtherapie des kolorektalen Karzinoms dar.

Kapitel 5.

Ergebnisse

5.1. Charakterisierung des Fusionsproteins L19CDy-His

5.1.1. Klonierung und Aufreinigung des Kontrollproteins

Cytosindeaminase und der Proteindomäne *Extra Domain B*

Der Vektor L19CDy-His-pPICZ α wurde für die L19CDy-His-Expression in *Pichia pastoris* von Dr. Hossein Panjideh kloniert. Für Untersuchungen zur Bindungsspezifität und Enzymaktivität des Fusionsproteins fehlte ein Kontrollprotein, das sich durch die Abwesenheit des scFv L19, der zielgerichteten Komponente, von L19CDy-His unterscheidet. Ziel war es daher, das enzymatisch aktive, unkonjugierte Enzym CDy herzustellen. Dies erfolgte durch die Klonierung des Vektors CDy-pPICZ α . Für die Amplifikation der CDy-cDNA wurden spezifische Primer verwendet, die die Generierung eines N-terminalen Histidin-tags (His-tag) für die Aufreinigung mit affinitätschromatographischen Methoden ermöglichen. Die Abbildung 5.1 zeigt die einzelnen Fraktionen der Nickel-Nitrilotriessigsäure-(Ni-NTA)-Chromatographie nach Größenaufreinigung im Natriumdodecylsulfat-(SDS)-Polyacrylamidgel mit anschließender Immunodetektion, die eindeutig die Anwesenheit der CDy im Eluat belegt. Das CDy-Monomer besitzt eine theoretische Größe von 17 kDa und tritt unter physiologischen Bedingungen als Homodimer auf. Die Immunodetektion zeigt die Größenaufreinigung der Fraktionen unter reduzierenden Bedingungen, wobei hier das CDy-Monomer bei etwa 20 kDa sichtbar ist.

Eine Splicevariante des Fibronectins enthält die *Extra Domain B* (ED-B), die als Target für die zielgerichtete Inhibition der Angiogenese mit L19CDy-His dient. Für die Untersuchungen in dieser Arbeit wurde die Proteindomäne ED-B verwendet, die mit 10 kDa im Vergleich zu Fibronectin (170 kDa) sehr klein ist. Durch IPTG-Induktion erfolgte die Expression der L19CDy-His-Proteindomäne ED-B in bereits transformierten *E. coli*. Das His-tag-Protein wurde nach Ultraschallbehandlung der Bakterien via Ni-NTA-Affinitätschromatographie isoliert. Das His-tag und stringentes Waschen mit Imidazol-PBS-Puffer ermöglichten eine sehr effiziente Separation der ED-B von bakteriellen Proteinen. Wie in Abbildung 5.2 veranschaulicht ist, wurde durch den ersten Waschschrift (20 mM Imidazol-PBS) ein Großteil der bakteriellen Proteine eliminiert. Der sich anschließende Waschschrift (60 mM Imidazol-PBS) führte bereits zur ED-B-Elution. Dieser war jedoch unumgänglich, um die größtmögliche Reinheit zu erlangen. Für die im Folgenden beschriebenen Versuche wurden ausschließlich die Eluatfraktionen (200 mM Imidazol-PBS) verwendet. Aufgrund der geringen Affinität

der gegen das His-Tag gerichteten Antikörper wurde für ED-B kein Westernblot gezeigt. Jedoch belegen die nachfolgenden Versuche die Anwesenheit der ED-B in der Eluatfraktion und lassen dadurch auf eine erfolgreiche Isolation des Proteins schließen.

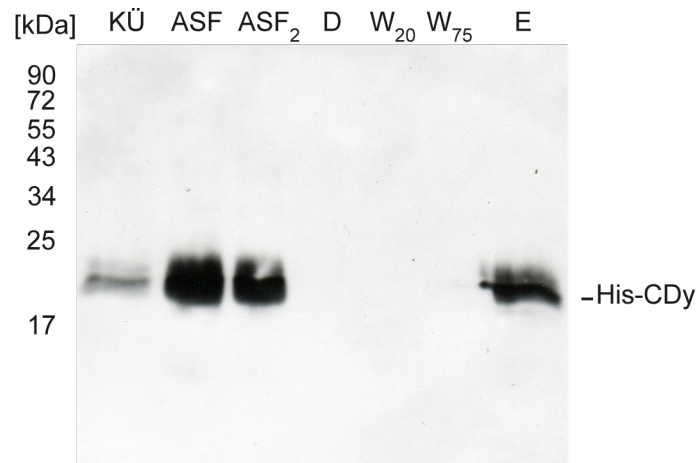


Abb. 5.1.: Die His-CDy-Aufreinigung erfolgte mittels Ni-NTA-Affinitätschromatographie. Die Abbildung zeigt den Westernblot nach Größenauftrennung der Proteine in einem 12%igen SDS-Gel. Aufgetragen wurden der Kulturüberstand (KÜ) des dritten Expressionstages, die gegen PBS dialysierte Ammoniumsulfatfällung (ASF), die mit 10 mM Imidazol-PBS verdünnte ASF (ASF₂), der Durchlauf (D), die Waschfraktionen mit 20 und 75 mM Imidazol-PBS (W₂₀, W₇₅) und das Eluat (E) mit 150 mM Imidazol-PBS. Die Immunodetektion erfolgte mit einem Mausantikörper gegen das His-tag und einem sekundären, Peroxidase gekoppelten Kaninchenantikörper gegen Maus-IgG.

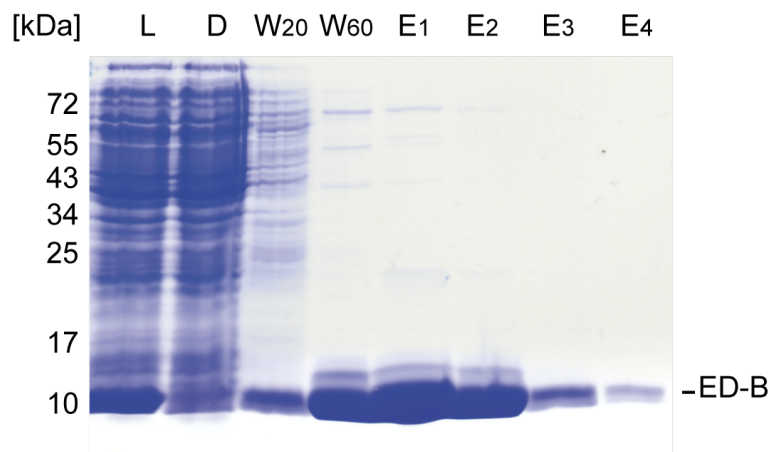


Abb. 5.2.: EDB-Aufreinigung mittels Ni-NTA-Affinitätschromatographie nach Größenauftrennung der Proteine in einem 12%igen SDS-Gel. Aufgetragen wurden das Bakterienlysate (L), der Durchlauf (D), die Waschfraktionen mit 20 und 60 mM Imidazol-PBS (W₂₀, W₆₀) und die Elutionsfraktionen (E₁₋₄) mit 200 mM Imidazol-PBS. Die Visualisierung erfolgte nach Färbung mittels Coomassie Brilliant Blue R-250.

5.1.2. Proteinaufreinigung und -stabilität von L19CDy-His

Das Fusionsprotein L19CDy-His besteht aus der CDy und dem scFv L19, der spezifisch an die Proteindomäne ED-B bindet. Die L19CDy-His-Proteinexpression erfolgte in bereits stabil transfizierten *Pichia pastoris* des Stammes KM71 und führte stets zu einer reproduzierbar hohen Proteinmenge von bis zu 5 mg/l Expressionsmedium. Die Aufreinigung des L19CDy-His erfolgte via Ni-NTA-Chromatographie. Um die Kulturvolumina für die Aufreinigung zu verringern wurde eine Ammoniumsulfatfällung durchgeführt. Die Abbildung 5.3 zeigt deutlich die Aufkonzentrierung des Proteins in der zu diesem Zeitpunkt bereits dialysierten Ammoniumsulfatfällung (Abb. 5.3, Probe ASF). Die Interaktion mit der Ni-NTA-Agarose erfolgte nahezu vollständig, da in der Durchlauf fraktion keine Fusionsproteine detektiert wurden. Der erste Waschschriff mit 20 mM Imidazol-PBS hatte keine Auswirkung auf die Interaktion von L19CDy-His mit dem Säulenmaterial, jedoch eluierte das Fusionsprotein bereits mit einem 75 mM Imidazol-PBS-Waschpuffer. Die Untersuchung der enzymatischen Aktivität dieser Waschfraktion zeigte eine verringerte Aktivität im Vergleich zum Eluat, weshalb diese Fraktion für die nachfolgenden Untersuchungen ungeeignet war und nicht verwendet wurde.

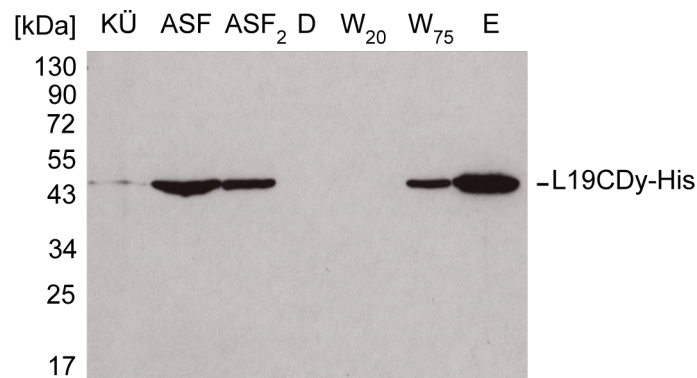


Abb. 5.3.: Die Abbildung veranschaulicht die Immunodetektion von L19CDy-His nach Ni-NTA-Affinitätschromatographie, Größenaufreinigung in einem 10%igen SDS-Gel und anschließendem Elektrobplot. Die Probenbezeichnungen entsprechen denen in Abbildung 5.1. Die Immunodetektion erfolgte mit einem Mausantikörper gegen das His-tag und einem sekundären, Peroxidase gekoppelten Kaninchenantikörper gegen Maus-IgG.

Die Stabilität des Fusionsproteins wurde in Hinblick auf die Lagerfähigkeit überprüft, wobei die Abnahme der Enzymaktivität als Kriterium für die Stabilität herangezogen wurde. Die Lagerung von L19CDy-His in PBS erfolgte mit und ohne Zusatz von 0,1 % bovinem Serumalbumin (BSA) bei 8°C. In beiden Ansätzen konnte über einen Zeitraum von 35 Tagen keine bemerkenswerte Veränderung der Enzymaktivität gemessen werden (ohne Abb.). Um die Eignung des Fusionsproteins für den *In-vivo*-Einsatz zu überprüfen, wurde L19CDy-

His mit frischem, humanem Plasma bei 37 °C inkubiert und als Maß für die Stabilität die Enzymaktivität im Abstand von sechs Stunden über einen Zeitraum von 72 Stunden bestimmt. Parallel dazu wurde L19CDy-His mit PBS inkubiert. Wie aus der Abbildung 5.4 entnommen werden kann, nimmt die Enzymaktivität nach sechsstündiger Inkubation mit humanem Plasma um 25 % ab, bleibt dann jedoch über einen Zeitraum von mindestens 72 Stunden stabil. Die Inkubation mit PBS zeigte anfänglich nur eine minimale Abnahme der Enzymaktivität, jedoch wurde nach 72 Stunden eine ähnlich hohe Enzymaktivität wie bei der Verwendung humanen Plasmas gemessen.

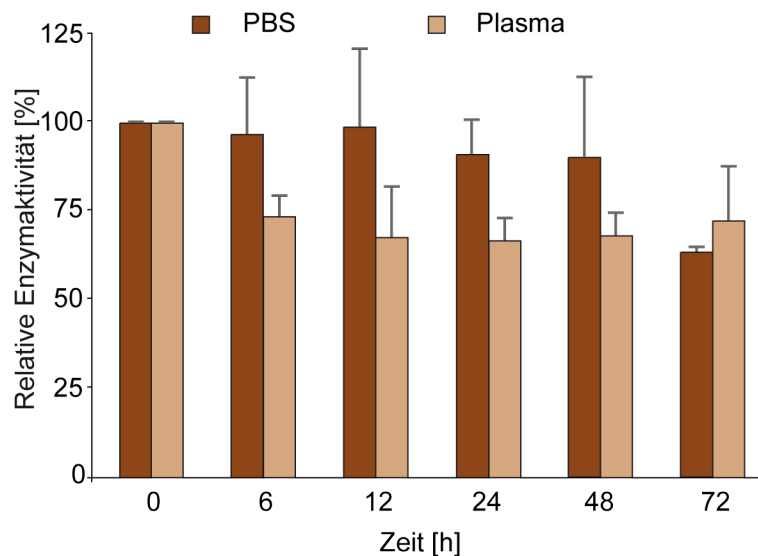


Abb. 5.4.: Die enzymatische Stabilität nach Inkubation von L19CDy-His mit humanem Plasma (beige) oder PBS (braun) wurde über einen Zeitraum von 72 h verfolgt. Die Absorptionsänderung bei 255 nm, die bei dem enzymatischen Umsatz des Substrates 5-FC zu 5-FU zu beobachten ist, wurde für die Ermittlung der enzymatischen Aktivität verwendet. Die Enzymaktivität zum Zeitpunkt null wurde als Referenzwert 100 % gleichgesetzt. Das Diagramm enthält Daten aus drei unabhängigen Enzymaktivitätsassays. Die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung des Mittelwertes.

5.1.3. Charakterisierung der L19CDy-His-ED-B-Interaktion

Der Bindungsnachweis des Fusionsproteins L19CDy-His an die Proteindomäne ED-B erfolgte durch einen Enzym gekoppelten Immunadsorptionsassay (ELISA), indem ED-B auf dem Trägermaterial immobilisiert und mit verschiedenen Mengen L19CDy-His inkubiert wurde. Die Durchführung der ELISAs führte stets zu reproduzierbaren Ergebnissen. Wie in der Abbildung 5.5 A veranschaulicht ist, bindet L19CDy-His eindeutig und reproduzierbar

konzentrationsabhängig an die Proteindomäne ED-B.

In einem weiteren ELISA wurden zur Kontrolle der Bindungsspezifität Proteine immobilisiert, die I) eine ähnliche molekulare Masse im Vergleich zu ED-B (10 kDa) aufweisen, II) mit dem gleichen Affinitäts-tag ausgestattet oder III) gleichen Ursprungs sind (Abb. 5.5 B). Die Ergebnisse belegen klar, dass L19CDy-His ausschließlich spezifisch an ED-B bindet, da die L19CDy-His-Inkubation mit dem epidermalen Wachstumsfaktor (EGF, 6,2 kDa), der N-Glykosidase Saporin (29,6 kDa) und BSA (66,5 kDa) nur zu geringen Absorptionswerten führte. Diese sind vergleichbar mit der Antikörperkontrolle, für die die Blocklösung (BSA + fetales Kälberserum (FKS)) immobilisiert wurde. Darüber hinaus wurde das Fusionsprotein antiA33-CDy als Negativkontrolle in gleicher Weise wie L19CDy-His (Abb. 5.5 A) in dem ELISA eingesetzt (ohne Abb.). Dieser ELISA belegt, dass antiA33-CDy keine Bindungsaffinität gegenüber ED-B aufweist, da gleichmäßig geringe Absorptionssignale unabhängig von der eingesetzten antiA33-CDy-Menge gemessen wurden und bestätigt damit die L19CDy-His-Bindungsspezifität gegenüber ED-B.

Zur näheren Charakterisierung der Bindung zwischen L19CDy-His und ED-B wurde die Oberflächenplasmonresonanz-Analyse herangezogen. In Vorbereitung dessen wurde die Proteindomäne ED-B auf einem Sensorchip (CM5-Chip, BIACORE) immobilisiert. Die Bindungsaffinität zu ED-B wurde unter gleichmäßigem Fluss mit verschiedenen L19CDy-His-Verdünnungen (25–600 nM) untersucht. Die 100-nM-Verdünnung wurde zweimal gemessen, um die Reproduzierbarkeit zu belegen. Da die Messwerte nahezu identisch zur ersten Messung waren, liegen die Kurven in der Abbildung 5.6 übereinander. Insgesamt wurden drei voneinander unabhängige Messungen durchgeführt und mit Hilfe der BIAcore Software die Assoziationsraten- und Dissoziationsratenkonstante sowie die Gleichgewichtskonstante bestimmt (Tab. 5.1, S. 31).

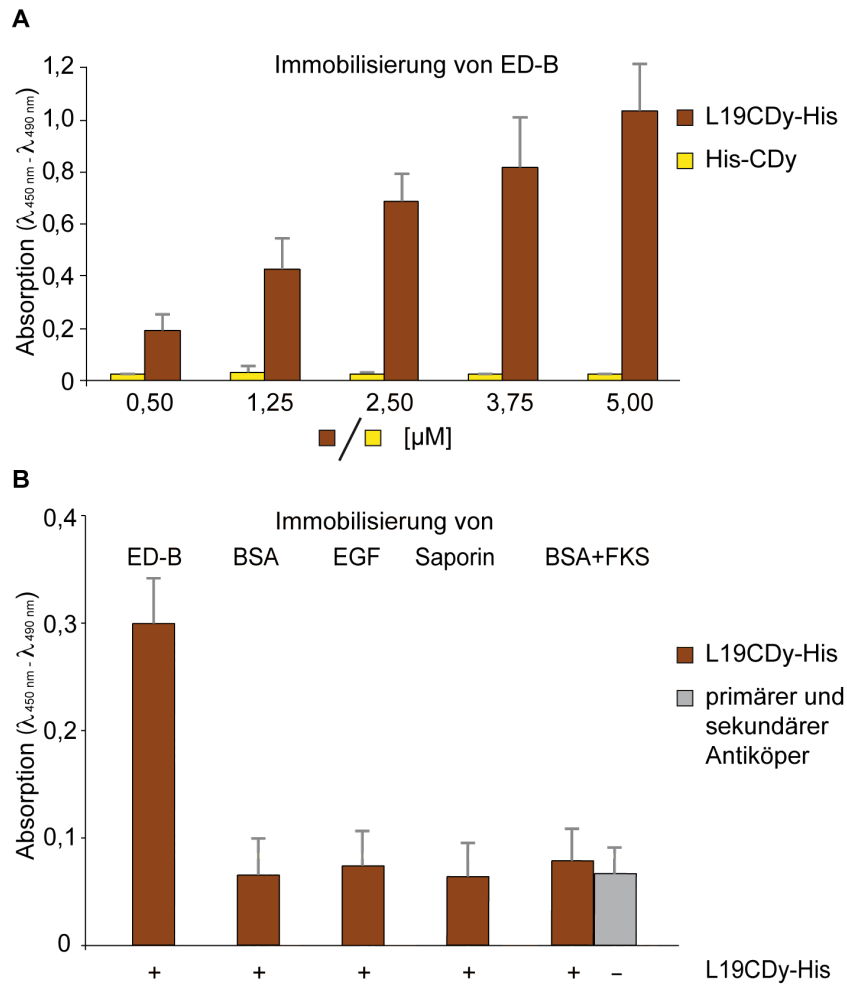


Abb. 5.5.: Die Abbildung zeigt zwei verschiedene Enzym gekoppelte Immunadsorptionsassays, in denen die Proteindomäne ED-B oder Kontrollproteine immobilisiert wurden. **(A)** Die Absorptionssignale verdeutlichen die konzentrationsabhängige L19CDy-His-ED-B-Interaktion. Der ELISA wurde in drei unabhängigen Versuchen durchgeführt und pro Fusionsproteinmenge wurden jeweils acht Absorptionswerte je ELISA gemittelt. Die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung der Mittelwerte der drei ELISA. **(B)** Die Spezifität der L19CDy-His Bindung wurde durch Immobilisierung verschiedener Proteine überprüft, die ED-B in molekularer Masse, Affinitäts-Tag oder Ursprung sehr ähnlich sind, wie der epidermale Wachstumsfaktor (EGF, 6 kDa) und die N-Glykosidase Saporin (29,6 kDa). Zudem wurde BSA und die Blockierlösung (BSA + FKS) untersucht.

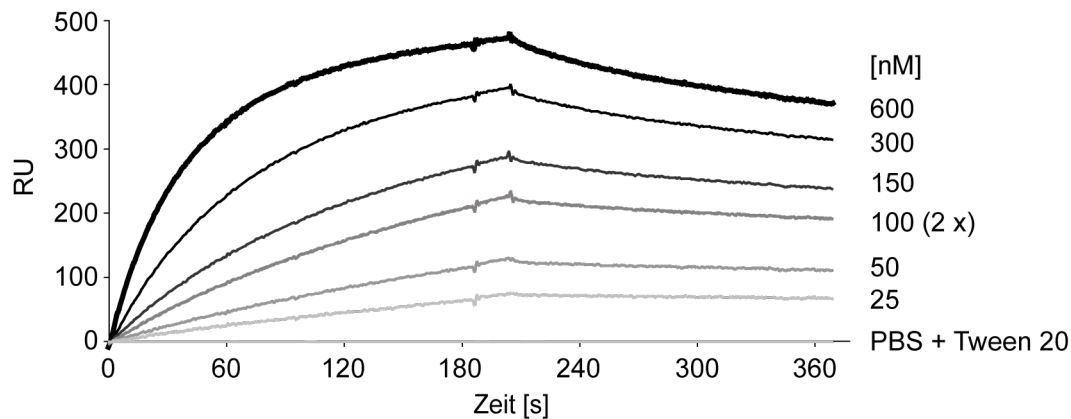


Abb. 5.6.: Für die Charakterisierung der Bindungsaffinität von L19CDy-His zur Proteindomäne ED-B wurde die Oberflächenplasmonresonanz-Analyse verwendet. ED-B wurde auf dem Sensorchip (CM5, BIACORE) immobilisiert und verschiedene L19CDy-His-Verdünnungen (25–600 nM) bei konstantem Fluss getestet. Die Messung für den 100-nM-Ansatz wurde zweimal durchgeführt. Die Abbildung zeigt exemplarisch eine von drei Messungen, die für die Ermittlung der Konstanten (siehe Tab.5.1, 31) herangezogen wurden.

Tab. 5.1.: Die Oberflächenplasmonresonanz-Analyse erfolgte mit einem BIACORE Sensorchip auf dem ED-B immobilisiert wurde und sechs verschiedenen L19CDy-His-Verdünnungen (25–600 nM). Für jede der drei voneinander unabhängigen Messungen (eine exemplarisch in Abb. 5.6 gezeigt) wurden die kinetischen Parameter Assoziations- und Dissoziationsratenkonstante (k_{on} und k_{off}) sowie die Dissoziationsgleichgewichtskonstante (KD) mit Hilfe der BIACore Software bestimmt. Zudem wurde der Standardfehler (SF) angegeben.

k_{on} [1/M × s]	SF (k_{on})	k_{off} [1/s]	SF (k_{off})	KD [M]
$3,67 \times 10^4$	$0,75 \times 10^2$	$2,65 \times 10^{-3}$	$2,58 \times 10^{-5}$	$72,3 \times 10^{-9}$
$3,77 \times 10^4$	$1,05 \times 10^2$	$3,21 \times 10^{-3}$	$3,74 \times 10^{-5}$	$85,2 \times 10^{-9}$
$3,76 \times 10^4$	$1,02 \times 10^2$	$3,16 \times 10^{-3}$	$3,57 \times 10^{-5}$	$84,0 \times 10^{-9}$

5.1.4. Die ADEPT mit L19CDy-His *in vitro*

Die vorangehenden Ergebnisse belegen einerseits die enzymatische Aktivität des Fusionsproteins L19CDy-His und andererseits die Fähigkeit der spezifischen Bindung an die Proteindomäne ED-B. Die Kombination beider Eigenschaften ist eine entscheidende Notwendigkeit für den erfolgreichen Einsatz des Fusionsproteins in der zielgerichteten Inhibition der Angiogenese. Um die Eignung von L19CDy-His für diese Therapieform zu untersuchen, wurde die ADEPT mit der murinen Teratokarzinomzelllinie F9 (ED-B+) und der murinen hypophysären Adenomazelllinie AtT-20 (ED-B-) durchgeführt. Letztere wurde als Negativkontrolle verwendet, nachdem mit Hilfe einer reversen Transkriptase Polymerasekettenreaktion (RT-

PCR) eine ED-B-Expression ausgeschlossen wurde (ohne Abb.). Neben L19CDy-His wurde auch His-CDy, welches ausschließlich die enzymatische Aktivität aufweist, in der ADEPT mit dem *Prodrug* untersucht.

Die Abbildung 5.7 A zeigt eindeutig, dass die aufeinander folgende Behandlung mit Fusionsprotein L19CDy-His und 5-FC zu einer konzentrationsabhängigen Reduktion der Zellvitalität in den ED-B+ Zellen führt, wobei der experimentell ermittelte Halbüberlebensindex (SI_{50}) $15 \mu\text{M}$ 5-FC beträgt.

Der SI_{50} -Wert wird bei der Behandlung der AtT-20-Zellen mit 5-FU bei Konzentrationen ab etwa $0,8 \mu\text{M}$ erreicht. Bei dieser Konzentration hat die Behandlung mit L19CDy-His und 5-FC, aufgrund der Abwesenheit der Proteindomäne ED-B keine toxische Wirkung auf die AtT-20-Zellen (Abb. 5.7 B). Die Verwendung gleicher 5-FC-Konzentrationen ohne L19CDy-His hatte keinen Einfluss auf die Vitalität der F9- und AtT-20-Zellen. Zudem führte die sukzessive Behandlung mit CDy-His und 5-FC in keiner der beiden Zelllinien zur Reduktion der Zellvitalität.

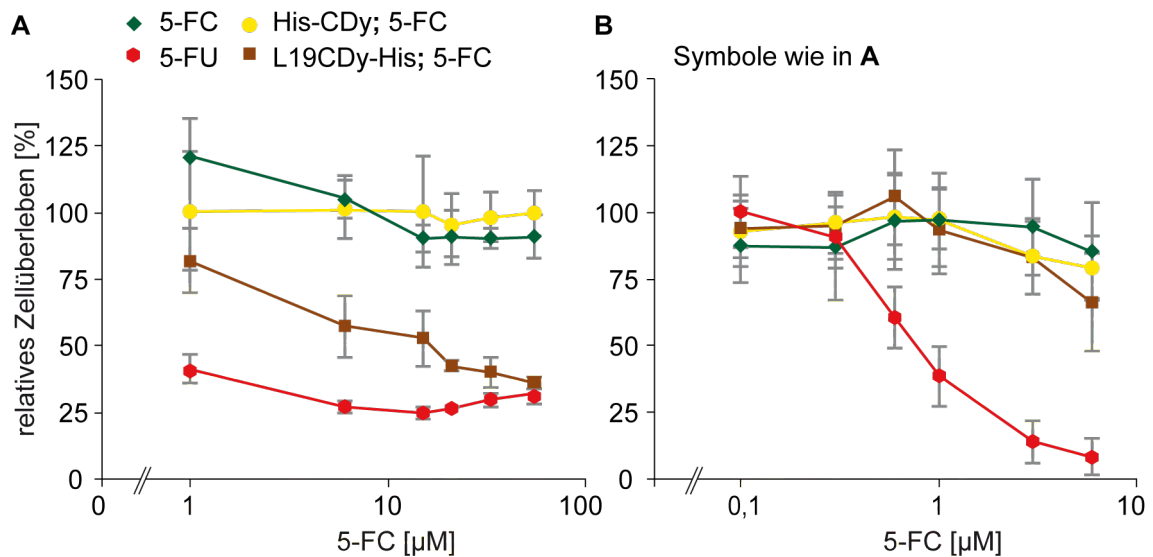


Abb. 5.7.: Die Abbildung zeigt zwei Cytoxizitätsassays, in denen (A) die F9-Zellen (ED-B+) und (B) die AtT-20-Zellen (ED-B-) mit L19CDy-His (Quadrat, braun) oder His-CDy (Kreis, gelb) und 5-FC behandelt wurden. Die Zellen wurden mit L19CDy-His oder His-CDy für 1 h inkubiert, gewaschen und anschließend mit verschiedenen 5-FC-Konzentrationen über einen Zeitraum von 36 h inkubiert. Zusätzlich wurden die Zellen nur mit dem *Prodrug* 5-FC (Raute, grün) und dem *Drug* 5-FU (Hexagon, rot) inkubiert. Die prozentuale Zellvitalität wurde im Vergleich zu Zellen, die nur mit Medium inkubiert wurden, ermittelt. Die Fehlerbalken basieren auf der Standardabweichung, die aus den Mittelwerten von vier Experimenten (A) und sieben Experimenten (B) für jede Konzentration errechnet wurden.

Die Inkubation der ED-B⁺ F9-Zellen und der ED-B⁻ AtT-20-Zellen mit L19CDy-His oder His-CDy ohne *Prodrug* führte wie erwartet zu keiner Reduktion der Zellvitalität. Dies unterstreicht die Spezifität der cytotoxischen Wirkung von L19CDy-His in Anwesenheit von 5-FC. Der Nachweis der tatsächlich vorhandenen Enzymaktivität erfolgte durch Zugabe des L19CDy-His oder His-CDy (ohne Auswaschung) gefolgt von der Zugabe des *Prodrugs* (jeweils höchste Konzentration) (Abb. 5.8).

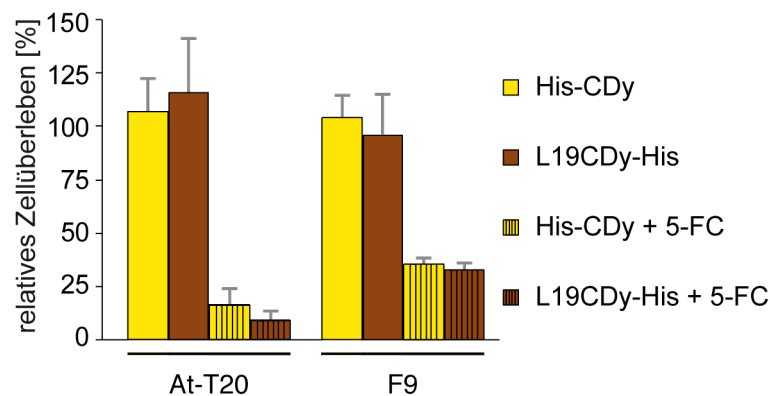


Abb. 5.8.: Die Bestimmung der Eigentoxizität der Proteine L19CDy-His und His-CDy erfolgte durch einstündige Inkubation auf F9- und AtT-20-Zellen, anschließendem Waschen und Inkubation mit Medium über einen Zeitraum von 36 h. Zur Kontrolle der enzymatischen Aktivität beider Proteine wurden jeweils beide Zelllinien mit den Proteinen behandelt und anschließend ohne Waschschrift mit dem *Prodrug* im Medium inkubiert. Die Fehlerbalken basieren auf der Standardabweichung, die aus den Mittelwerten von vier und sieben Experimenten für F9 bzw. AtT-20 errechnet wurden.

5.1.5. Nachweis des mit L19CDy-His erzielten *Bystander Effects*

Die Entfaltung einer lokal begrenzt auftretenden, cytotoxischen Wirkung, die nicht auf antigentragende Tumorzellen beschränkt ist, stellt einen entscheidenden Vorteil der ADEPT dar. Dieser sogenannte *Bystander Effect* bietet die Möglichkeit durch Diffusion der gebildeten, toxischen Substanz benachbarte, Nicht-Zielzellen in der extrazellulären Matrix zu erreichen und abzutöten. Für die Untersuchungen zum *Bystander Effect* wurden Tumorzellen räumlich getrennt voneinander kultiviert. Hierzu wurde eine Zellfraktion in den Vertiefungen einer Zellkulturplatte kultiviert und die andere Fraktion in einem *Insert*, dessen Boden mit einer Membran ausgestattet ist. Das *Insert* kann in die Vertiefung der Zellkulturplatte (vorzugsweise nach Anwachsen der Zellen) eingehangen werden, sodass ein Stoffaustausch zwischen beiden Zelllinien über das Medium stattfinden kann. Es wurden

die Zellfraktionen F9/F9 (ED-B+/+) und F9/AtT-20 (ED-B+/-) verwendet. Die Inkubation mit dem Fusionsprotein L19CDy-His erfolgte ausschließlich mit der ED-B+ Fraktion (F9-Zellen) und führte zur Bindung an ED-B in der extrazellulären Matrix. Nach dem Waschen und der Zugabe des *Prodrugs* wurden beide Zellfraktionen gemeinsam kultiviert, indem das *Insert* in die Vertiefung der Zellkulturplatte, die auch *Well* genannt wird, eingehangen wurde. Der cytotoxische Effekt der ADEPT spiegelte sich in der Reduktion der Zellvitalität wider. Diese Reduktion war sowohl in der Zellfraktion, die mit L19CDy-His behandelt wurde (*Well*), als auch der Fusionsprotein-freien Zellfraktion (*Insert*) sichtbar. Hierbei war es unerheblich, ob es sich um die Co-Kultivierung von F9/F9- oder F9/AtT-20-Zellen handelte. Wie aus der Abbildung 5.9 entnommen werden kann, ist die Reduktion der Zellvitalität von der Konzentration des *Prodrugs* abhängig. Diese Abhängigkeit kann sowohl für die mit L19CDy-His-behandelten Zellen, als auch für die unbehandelten Zellen im *Insert* beobachtet werden. Darüber hinaus zeigt dieser Versuch, dass die cytotoxische Wirkung aufgrund des *Bystander Effects* unabhängig von der in der Nachbarschaft befindlichen Zelllinie ist, solange diese 5-FU-sensitiv ist.

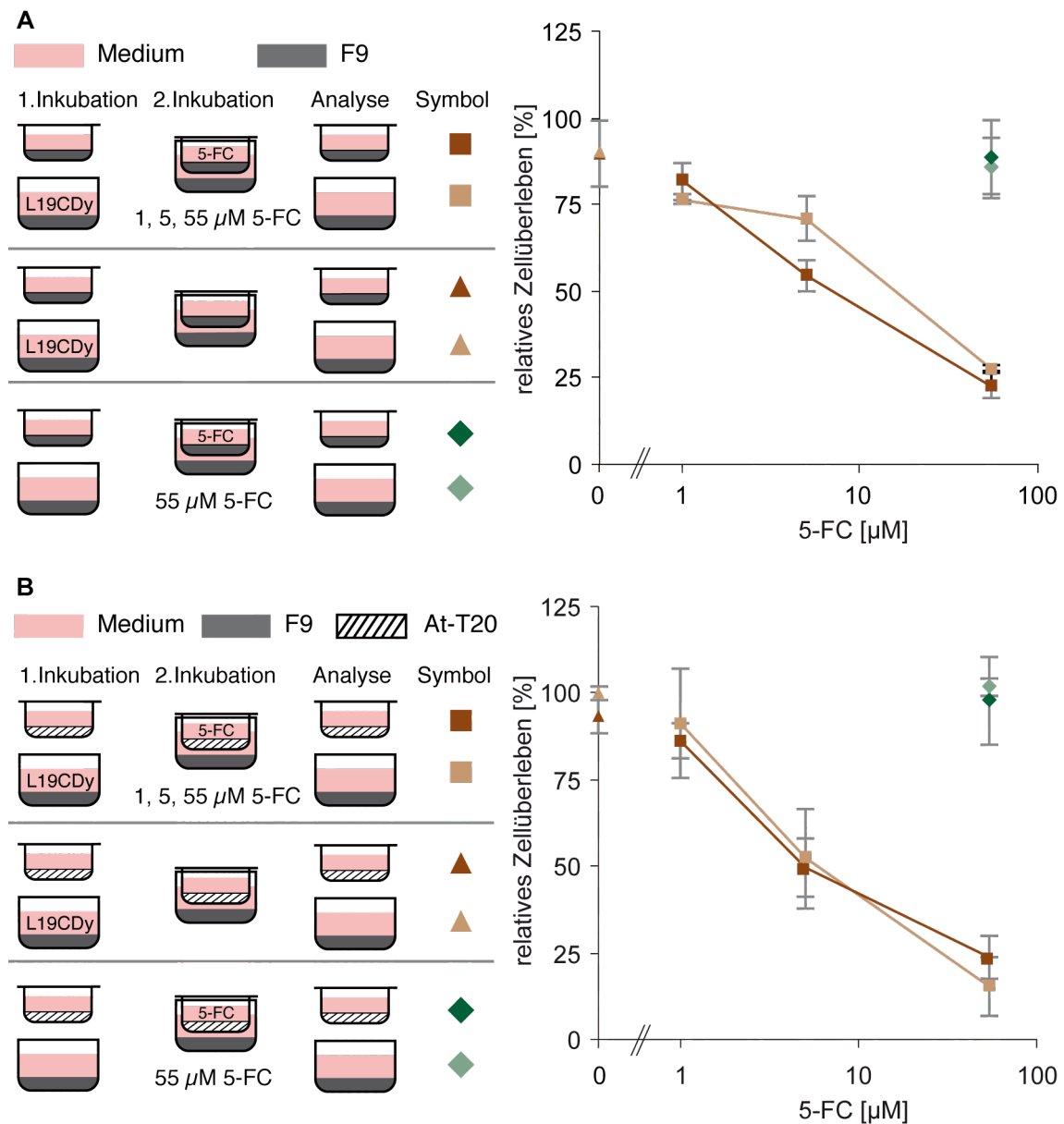


Abb. 5.9.: Für den *Bystander-Effect*-Cytotoxizitätsassay wurde eine Zellfraktion in einem *Well* einer Zellkulturplatte und eine andere in einem *Insert* getrennt voneinander kultiviert. ED-B+ F9-Zellen wurden für (A) sowohl im *Well* als auch im *Insert* kultiviert. Für (B) wurden die F9-Zellen im *Well* und die ED-B- AtT-20-Zellen im *Insert* kultiviert. Bei der 1. Inkubation wurden nur die Zellen im *Well* mit L19CDy-His inkubiert. Nach dem Auswaschen ungebundenen L19CDy-His wurde das *Insert* in die Zellkulturplatte eingehangen, sodass die Zellen im *Insert* über das Medium mit den Zellen im *Well* in Kontakt standen. Für diese 2. Inkubation (36 h) wurden drei verschiedene 5-FC-Konzentrationen verabreicht. Die prozentuale Zellvitalität basiert auf dem Vergleich mit Zellen, die nur mit Medium inkubiert wurden. Als Kontrollen wurde sowohl L19CDy-His (Dreieck) als auch die höchste 5-FC-Konzentration ohne L19CDy-His (Raute) eingesetzt. Die Fehlerbalken basieren auf der Standardabweichung, die aus den Mittelwerten der drei verschiedenen Assays errechnet wurden.

5.2. Etablierung eines murinen Kolonkarzinom-Modells

5.2.1. Klonierung und molekularbiologischer Nachweis der Transfektion

Das Fusionsprotein antiA33-CDy wurde von Hossein Panjideh kloniert und bereits erfolgreich in *P. pastoris* exprimiert. Es besteht aus der CDy und einem scFv, der spezifisch an das humane Glycoprotein A33 (hgpA33) bindet. Die bisher mit antiA33-CDy erfolgten Untersuchungen waren jedoch auf *In-vitro*-Untersuchungen und eine tierexperimentelle Pilotstudie mit athymischen Mäusen beschränkt.

Daher standen in dieser Arbeit Untersuchung zur antitumoralen Wirkung von antiA33-CDy und dessen potentielle Immunogenität in immunkompetenten BALB/c-Mäusen im Vordergrund. Zu diesem Zweck wurden zwei Transfektanten der murinen Kolonkarzinomzelllinie CT26 generiert, wovon eine als Kontrollzelllinie ausschließlich das *enhanced Green Fluorescent Protein* (eGFP) und die andere als Zielzelllinie ein Protein aus hgpA33 und eGFP exprimieren sollte. Das zur Fluoreszenz anregbare eGFP wurde sowohl als Kontrollprotein verwendet, als auch zur Lokalisation des hgpA33.

Die Klonierung erfolgte auf der Grundlage der von Katrin Dassler und Hossein Panjideh klonierten eGFP-pcDNA6 B- beziehungsweise hgpA33-pcDNA6 B-Vektoren. Durch Amplifikation der cDNA des hgpA33-Gens wurden mit spezifischen Primern neue Restriktionsendonuclease-Schnittstellen an die Sequenz angefügt, um die anschließende Ligation mit eGFP-pcDNA6 B zu ermöglichen. Zur vereinfachten Darstellung sind hgpA33-eGFP und eGFP in den folgenden Abbildungen in den Farben violett beziehungsweise grün dargestellt.

Die erfolgreiche Klonierung wurde nach Amplifikation der vektoruellen DNA in *E. coli* durch Sequenzierung mit vektor- und insertspezifischen Primern bestätigt (ohne Abb.). Die murine Kolonkarzinomzelllinie CT26 wurde für die Generierung von Ziel- und Kontrollzellen mit dem hgpA33-eGFP- beziehungsweise eGFP-pcDNA6 B-Vektor stabil transfiziert. Die Selektion der Transfektanten erfolgte durch Kultivierung in Gegenwart des vektor-spezifischen Antibiotikums Zeocin. Zur Kontrolle der Transfektion wurde zunächst die Gesamt-RNA isoliert und RT-PCRs mit cDNA- und speziesspezifischen Primern durchgeführt (Abb. 5.10 A), um unter anderem die humane von der murinen gpA33-Expression (mgpA33-) zu unterscheiden. Für die PCRs wurden RNA-Proben der Zelllinien LIM1215 (hgpA33+, mgpA33-), CT26 (hgpA33-, mgpA33-) und F9 (hgpA33-, mgpA33+) als Kontrollen eingesetzt. Zudem ist anzumerken, dass keine dieser Zelllinien eGFP *per se* exprimiert. Die Ergebnisse der verschiedenen RT-PCRs belegen, dass die artifizielle DNA in den Transfektanten erfolgreich transkribiert wird. Da die Transkription der DNA jedoch keine Schlussfolgerung über die Translation und Translokation von Proteinen zulässt,

wurde zudem eine Membranpräparation der CT26-, LIM1215-Zellen und der Transfektanten durchgeführt (Abb. 5.10 B). Die Immunodetektion der Membranpräparation erfolgte mit einem polyklonalen Antikörper gegen hgpA33 und belegt die erfolgreiche Expression und Translokation des hgpA33-eGFPs in die Zellmembran der CT26-hgpA33-eGFP-Zellen durch charakteristische Proteinbanden bei etwa 55 und 80 kDa. Die molekulare Masse des nicht glykosylierten hgpA33 beträgt etwa 43 kDa, die des hgpA33-eGFP, aufgrund der Fusion mit eGFP, etwa 70 kDa. Die Abbildung belegt die Glykosylierung von hgpA33, die zu einer Vergrößerung der molekularen Masse führt.

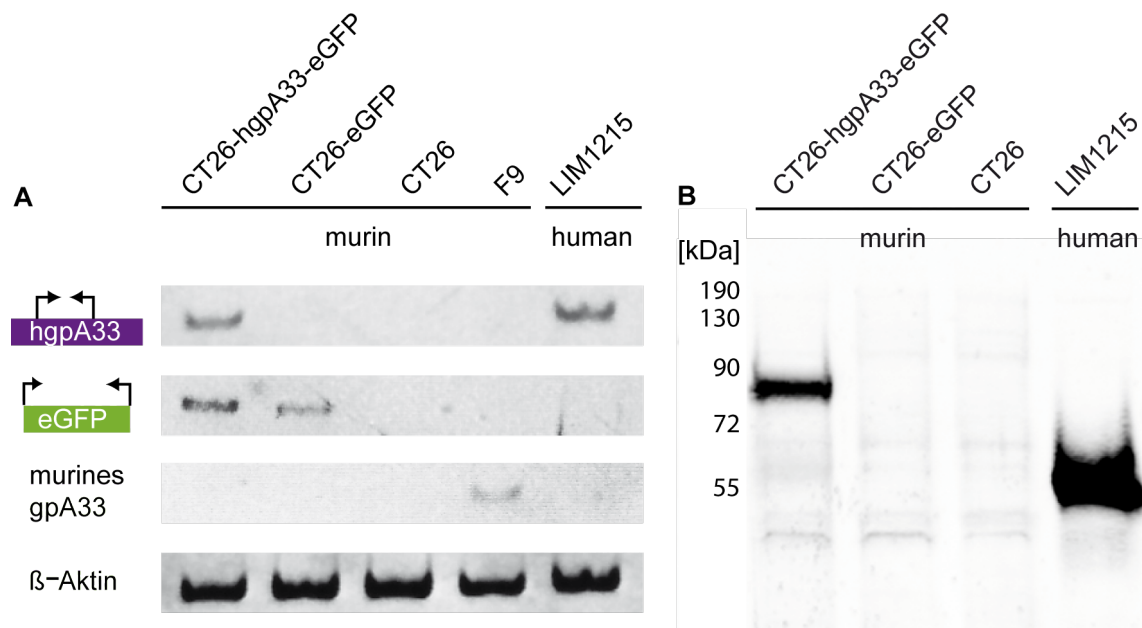


Abb. 5.10.: Zur Kontrolle der Transfektion wurde (A) eine reverse Transkriptase-Polymerasekettenreaktion und (B) eine Membranpräparation durchgeführt. (A) Es wurden die sequenzspezifischen Primer für das murine und humane Glykoprotein A33 (mgpA33 und hgpA33), das *enhanced Green Fluorescent Protein* (eGFP) und das murine oder humane β -Aktin verwendet. Die RNA der Zelllinien F9 und LIM1215 wurden als Kontrolle für die Anwesenheit muriner beziehungsweise humaner gpA33-RNA eingesetzt. (B) Die in der Membranpräparation isolierten Proteine wurden mittels SDS-PAGE (7,5 %) aufgetrennt und nach einem Westernblot mit einem polyklonalen Ziegenantikörper gegen hgpA33 und einem sekundären Kaninchenantikörper gegen Ziegen-IgG detektiert.

Es ist deutlich erkennbar, dass die hgpA33-RNA ausschließlich in den Proben der humanen Kolonkarzinomzelllinie LIM1215 und den CT26-hgpA33-eGFP-Zellen vorhanden ist. Mit den eGFP-spezifischen Primern wurde die Anwesenheit der eGFP-RNA ausschließlich in den CT26-Transfektanten detektiert. Die erleichterte Detektion und auch Sortierung der hgpA33⁺ Transfektanten stand bei der Fusion der cDNA des hgpA33s und des eGFPs

im Vordergrund. Der Expressionsnachweis erfolgte am Fluoreszenzmikroskop (Ex 488 nm, Em 510 nm), wobei eine auffällig breit gestreute eGFP-Fluoreszenzintensität innerhalb der Zellpopulationen zu beobachten war (ohne Abb.).

Für die Detektion der hgpA33-Expression wurden die Transfektanten, die CT26- und auch LIM1215-Zellen mit zwei Antikörpern inkubiert und das Fluoreszenzsignal des Phycoerythrin (PE) markierten, sekundären Antikörpers in der Durchflusszytometrie untersucht (Abb. 5.11). PE und eGFP können mit der gleichen Wellenlänge angeregt werden, emittieren jedoch bei etwa 510 beziehungsweise 575 nm. Die stark hgpA33-exprimierenden LIM1215-Zellen zeigen eine eindeutige Rechtsverschiebung der Kurve in den Bereich höherer PE-Fluoreszenzintensität, jedoch keine eGFP-Expression (Abb. 5.11 B). Für die CT26-hgpA33-eGFP-Zellen wurde sowohl bei der Detektion von eGFP, als auch PE eine eindeutige Rechtsverschiebung beobachtet (Abb. 5.11 A und B). Die Kontrollzelllinie CT26-eGFP zeigt ausschließlich eine erhöhte Fluoreszenzintensität im eGFP-Signal, wohingegen bei den nativen CT26-Zellen keines der beiden Fluoreszenzsignale gemessen wurde. Die Verwendung einer Isotyp-Kontrolle, hier des konstanten Teils des Ratten IgGs 2a, zeigte bei keiner der verwendeten Zelllinien eine Bindung (Abb. 5.11 C und D) und eine zu unbehandelten Zellen vergleichbare Fluoreszenzintensität (Abb. 5.11 E und F). Dies unterstützt die Aussage, dass es sich bei den Proben mit dem anti-hgpA33 Antikörper um eine spezifische Bindung der variablen Fragmente an das hgpA33 handelt.

Die Etablierung der Durchflusszytometrie mit den genannten Zelllinien hatte die Sortierung der stark hgpA33eGFP-exprimierenden Zellen mittels *Fluorescence-activated Cell Sorting* (FACS) zum Ziel. Die Sortierung der Zellen erfolgte direkt nach Inkubation mit den oben genannten Antikörpern in der *Flow Cytometry Core Facility*, die im Deutschen Rheuma-Forschungszentrum in Berlin ansässig ist. Die aufgrund ihrer hohen eGFP- oder hgpA33-eGFP-Expression selektierten Transfektanten wurden vermehrt und zwei weiteren Sortierungen unterzogen. Neben den CT26-hgpA33-eGFP-Zellen wurden auch die CT26-eGFP-Zellen sortiert, wobei hier ausschließlich diejenigen Zellen ausgewählt wurden, die eine hohe eGFP-Fluoreszenzintensität bei etwa 510 nm, jedoch keine bei 575 nm aufwiesen. Die Abbildung 5.12 zeigt die beiden Zellpopulationen der zweiten Sortierung. Hierbei wird deutlich, dass eine Antikörperbindung ausschließlich an die CT26-hgpA33-eGFP stattfand, da nur hier (Abb. 5.12 A) eine hohe PE-Fluoreszenzintensität detektiert wurde.

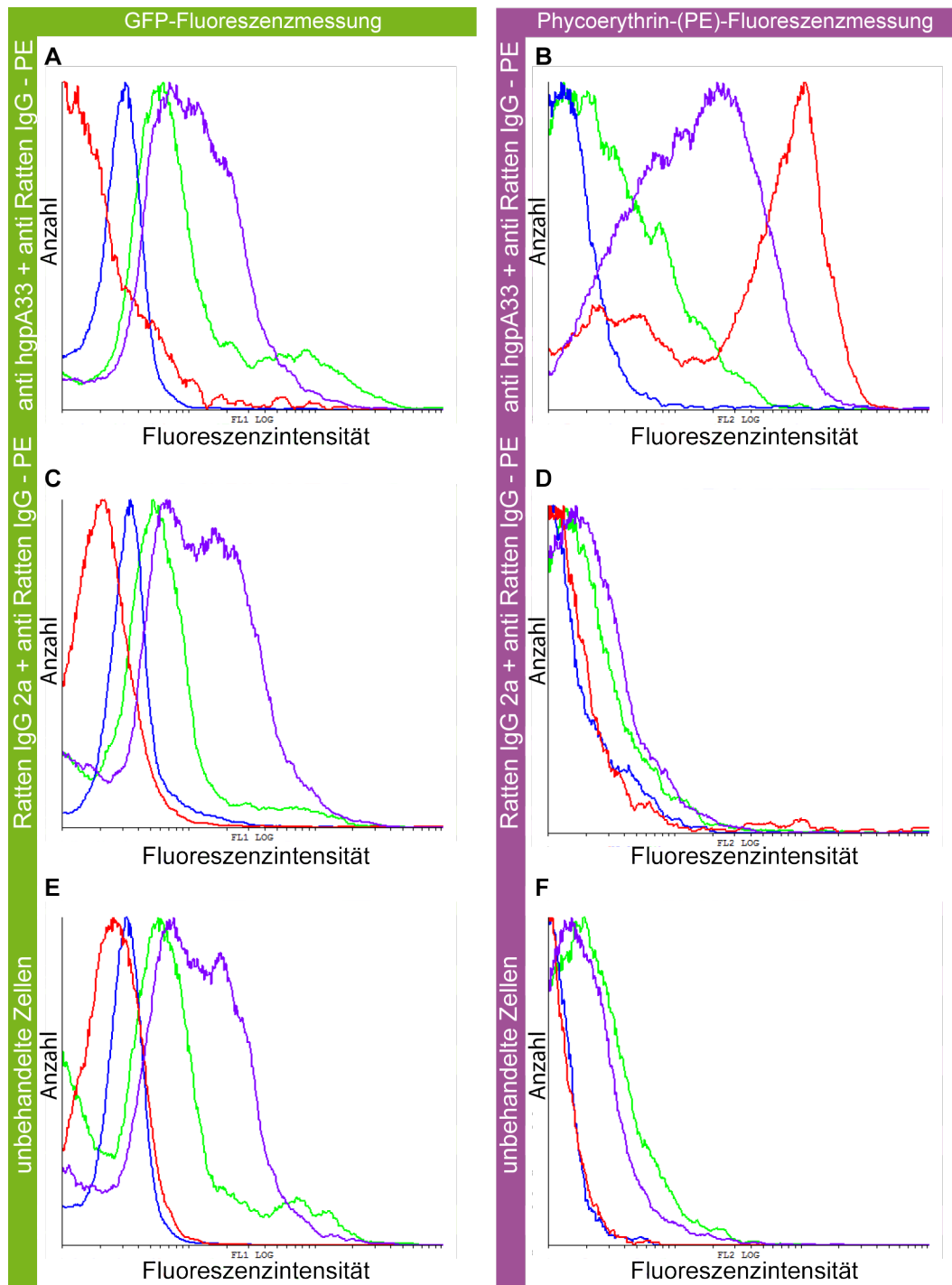


Abb. 5.11.: In der Durchflusszytometrie wurden die Zelllinien LIM1215 (rot), CT26 (blau) und dessen Transfektanten CT26-hgpA33-eGFP (violett) und CT26-eGFP (grün) eingesetzt. Die Zellen wurden mit einem spezifischen anti-hgpA33 Antikörper (**A**, **B**) der Isotyp-Kontrolle Ratten IgG 2a (**C**, **D**) inkubiert oder gar nicht behandelt (**E**, **F**). Die Inkubation der Zellen mit Antikörpern (**A**–**D**) wurde in Kombination mit einem sekundären PE gekoppelten Antikörper durchgeführt.

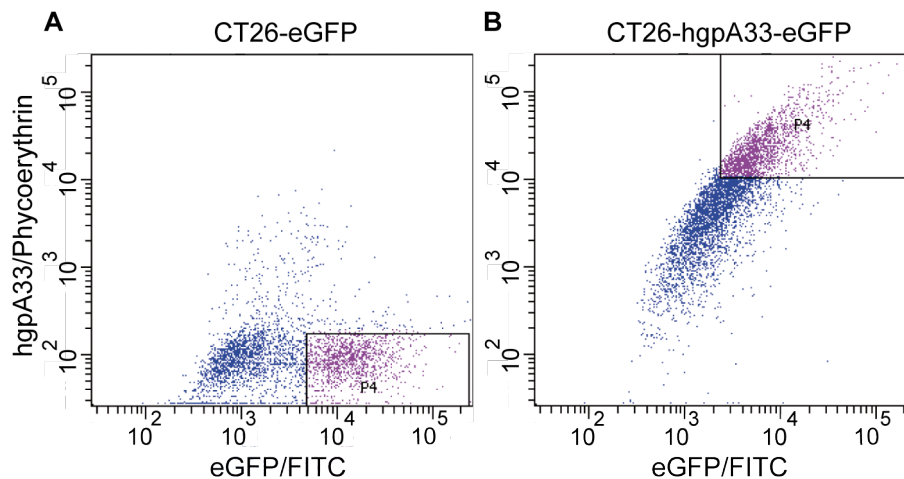


Abb. 5.12.: Die Sortierung der hgpA33-eGFP- und eGFP-exprimierenden Zielzellen beziehungsweise Kontrollzellen wurde mittels *Fluorescence-activated Cell Sorting* erreicht. Die Zellen wurden mit einem polyklonalen Antikörper gegen hgpA33 und einem Phycoerythrin (PE) gekoppelten, sekundären Antikörper behandelt. **(A)** zeigt die Kontrollzellpopulation, die keine PE-Fluoreszenz jedoch eine erhöhte eGFP-Fluoreszenz aufweist. **(B)** veranschaulicht den zweifachen Fluoreszenznachweis, einerseits der Antikörperbindung (PE-Fluoreszenz) und andererseits des in den Zellen exprimierten eGFPs in der Zielzellpopulation. Das Rechteck (P4) zeigt den Teil der Zellpopulation, der für die weitere Verwendung separiert wurde.

Die Lokalisation des hgpA33-eGFP und dessen Fluoreszenzaktivität wurde mit der Membranpräparation beziehungsweise in der Durchflusszytometrie erfolgreich nachgewiesen. Um die Distribution des hgpA33-eGFP in den transfizierten Zellen zu visualisieren wurden die oben genannten Antikörper in der konfokalen Fluoreszenzmikroskopie eingesetzt. In Vorbereitung auf die Antikörperinkubation wurden die Zelllinien LIM1215, CT26-hgpA33-eGFP und CT26-eGFP auf speziellen Objektträgern ausgesät, die mit einzelnen Kammern für die Inkubation mit Flüssigkeiten ausgestattet sind.

Die am Mikroskop aufgenommenen Bilder wurden weder in ihrer Intensität noch im Kontrast nachbearbeitet, um einen eindeutigen Vergleich zu ermöglichen. Für die Darstellung der PE-Fluoreszenz wurde jedoch die Farbe gelb gewählt, da diese im Vergleich zu rot (Originalfarbe) einen höheren Kontrast zum schwarzen Hintergrund aufweist. hgpA33 ist eindeutig in der Zellmembran der LIM1215- und den CT26-hgpA33-eGFP-Zellen lokalisiert (Abb.5.13 D, F). Dahingegen unterscheiden sich die beiden Zelllinien in der eGFP-Fluoreszenz, die ausschließlich bei CT26-hgpA33-eGFP-Zellen auftritt (Abb.5.13 A, C). Die CT26-eGFP-Zellen weisen kein PE-Fluoreszenzsignal auf (Abb.5.13 E), zeigen jedoch eine homogenverteilte eGFP-Fluoreszenz. Die Isotyp-Kontrolle des verwendeten Antikörpers belegt dessen Spezifität, da in keiner der untersuchten Zelllinien ein PE-Fluoreszenzsignal detektiert wurde (G, H, I).

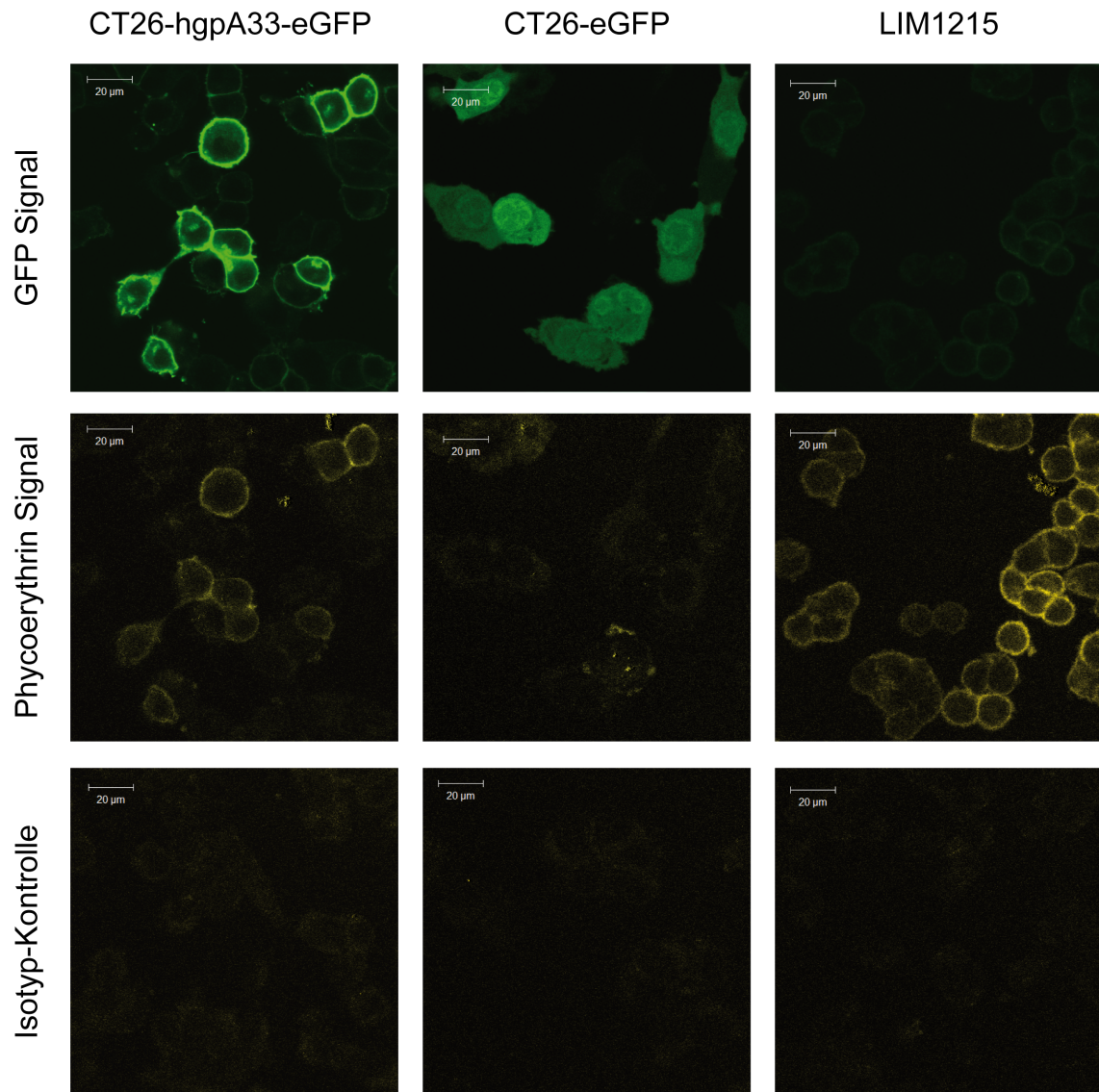


Abb. 5.13.: Mittels konfokaler *Laser-Scanning*-Mikroskopie wurde die Emission der Fluorophore eGFP (1. Reihe, grün) und Phycoerythrin (2. und 3. Reihe, gelb als Falschfarbendarstellung) in den Transfektanten CT26-hgpA33-eGFP und CT26-eGFP und der humanen Zelllinie LIM1215 nach Inkubation mit einem monoklonalen Antikörper gegen hgpA33 und einem PE gekoppelten, sekundären Antikörper detektiert. Als Isotyp-Kontrolle wurde ein Ratten IgG_{2a} und als Sekundärantikörper der PE gekoppelte Antikörper verwendet (3. Reihe).

5.2.2. AntiA33-CDy in der ADEPT

Die Expression artfremder Proteine kann zu Veränderungen im Zellwachstum führen, insbesondere wenn die Expression aufgrund starker Promotoren (hier aus dem Zytomegalavirus) auf sehr hohem Niveau erfolgt. Um einen möglichen Einfluss in den Transfektanten zu bestimmen, wurde die Zellvermehrung der Transfektanten im Vergleich zu nativen CT26-Zellen untersucht. Hierfür wurden die Zellen parallel ausgesät und deren Vitalität nach jeweils 24 h in einem MTT-Assay überprüft (Abb. 5.14). Die Zellvermehrung führt bei gleichbleibend hoher Vitalität zum Anstieg des Absorptionssignals über den Zeitverlauf (24, 48, 72, 96 h). Der Kurvenverlauf zeigt eindeutig ein stetiges Wachstum der Zellen innerhalb der ersten 72 h, wobei die CT26-eGFP-Zellen eine geringfügig langsamere Zellvermehrung zeigen. Da zwischen den nativen CT26-Zellen und den Transfektanten kein erheblicher Unterschied auftrat, wurden die sortierten Zellen, wie beabsichtigt, als Ziel- und Kontrollzellen zunächst für *In-vitro*-Versuche eingesetzt.

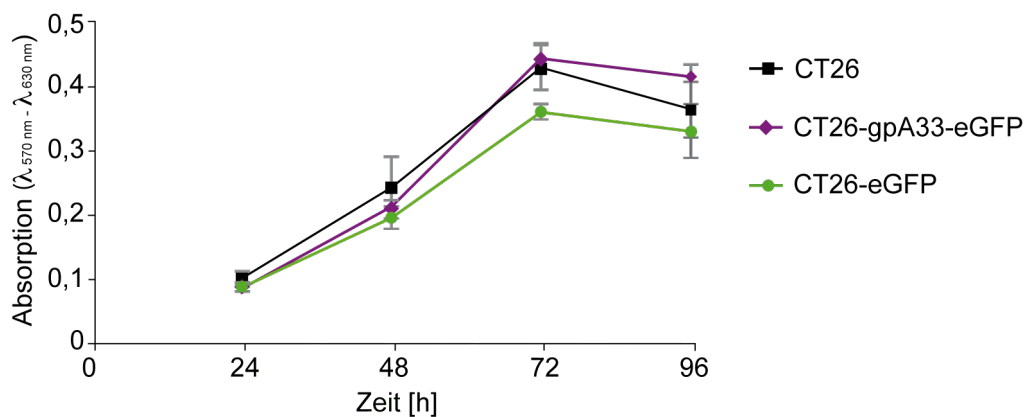


Abb. 5.14.: Für die Analyse der Zellvermehrung wurden die Zellen CT26 (schwarz), CT26-hgpA33-eGFP (violett) und CT26-eGFP (grün) parallel kultiviert. Der Nachweis der Zellvermehrung erfolgte indirekt über die Zellvitalität, die mit dem enzymatischen Umsatz des MTTs korreliert. Der MTT-Assay wurde insgesamt dreimal durchgeführt, wobei die Messungen alle 24 h über einen Zeitraum von 96 h erfolgten.

Für die ADEPT mit den Ziel- und Kontrollzellen CT26-hgpA33-eGFP beziehungsweise CT26-eGFP wurde das Fusionsprotein antiA33-CDy, das spezifisch an das hgpA33 bindet, eingesetzt. Für die *In-vitro*-Therapie wurden die Zellen zuerst mit dem Fusionsprotein inkubiert, ungebundenes Protein entfernt und anschließend das *Prodrug* mit den Zellen inkubiert. Der Ablauf gleicht den *In-vitro*-Untersuchungen zur Effektivität des Fusionsproteins L19CDy-His, nur dass hier das auf den murinen Kolonkarzinomzellen exprimier-

te hgpA33 als molekulares Ziel diente. Die Untersuchung der cytotoxischen Wirkung von antiA33-CDy in Kombination mit dem *Prodrug* 5-FC erfolgte sowohl für die Ziel- als auch die Kontrollzellen in separaten Cytotoxizitätsassays (Abb. 5.15). Die Bestimmung der Zellvitalität erfolgte mittels MTT-Assay, wobei unbehandelte Zellen für die Generierung des Referenzwertes verwendet wurden. Die Therapie entfaltete eindeutig eine konzentrationsabhängige, cytotoxische Wirkung auf die Zielzellen, die sich durch die Reduktion der Zellvitalität darstellt (Abb. 5.15 A). Dieser cytotoxische Effekt trat bei Verwendung gleicher 5-FC-Konzentrationen ohne Fusionsprotein nicht auf, sodass hier auf eine spezifische Wirkung, durch die Umwandlung von 5-FC in 5-FU geschlossen werden kann. Die Behandlung der Kontrollzellen hatte keine cytotoxische Wirkung zur Folge. Hier war lediglich bei der höchsten 5-FC-Konzentration eine Reduktion der Zellvitalität zu beobachten (Abb. 5.15 B). Beide Zelllinien wiesen jedoch erwartungsgemäß eine starke, konzentrationsabhängige Reduktion der Zellvitalität bei direkter Inkubation mit 5-FU auf.

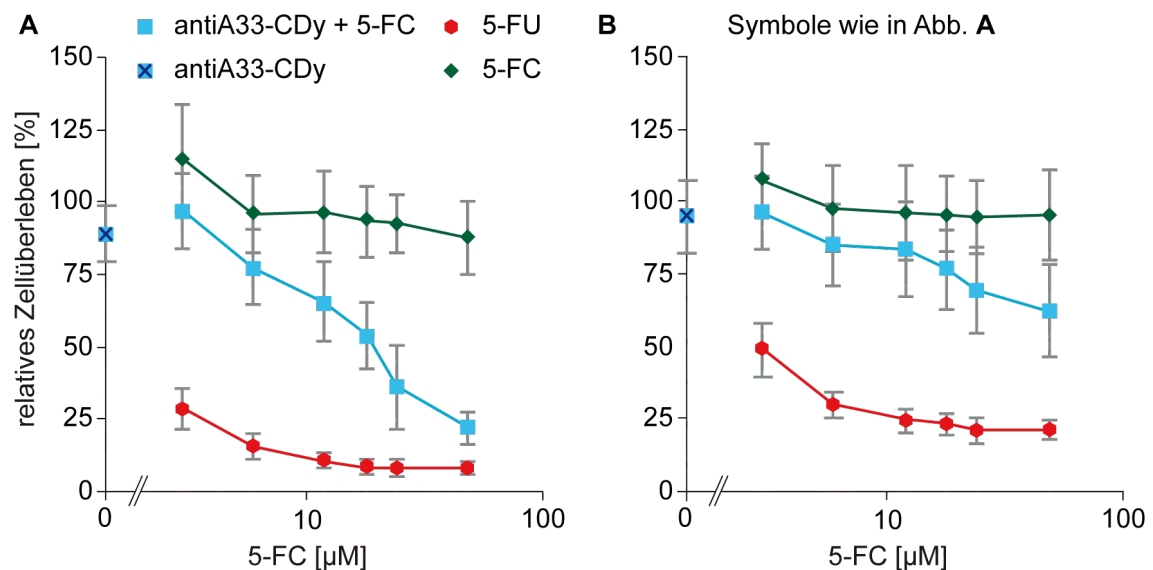


Abb. 5.15.: Die Untersuchungen zur cytotoxischen Wirkung der ADEPT mit dem Fusionsprotein antiA33-CDy und dem *Prodrug* 5-FC erfolgten sowohl für die Zielzellen CT26-hgpA33-eGFP (A) als auch für die Kontrollzellen CT26-eGFP (B). Die Fehlerbalken basieren auf der Standardabweichung, die aus den Mittelwerten von zehn unabhängigen Experimenten für beide Zelllinien errechnet wurde.

ADEPT zeichnet sich im Besonderen dadurch aus, dass die cytotoxische Substanz außerhalb der Zielzellen gebildet wird und dadurch auch in die umliegenden, tumorversorgenden Zellen diffundieren und dort eine cytotoxische Wirkung erzielen kann. Die Untersuchung

dieses so genannten *Bystander Effect* erfolgte ebenfalls *in vitro* in einem Cytotoxizitätsassay. Die Therapie wurde sowohl mit den Ziel- als auch den Kontrollzellen durchgeführt. Die Abbildung 5.16 A veranschaulicht den Cytotoxizitätsassay, für den die Zielzellen in den *Wells* kultiviert, mit dem Fusionsprotein behandelt und anschließend mit den Nicht-Zielzellen co-kultiviert wurden. Die deutliche Reduktion der Zellvitalität der nicht mit antiA33-CDy-behandelten Kontrollzellen (grün) bei gemeinsamer Kultivierung mit den antiA33-CDy-behandelten Zielzellen (violett) veranschaulicht überzeugend den bereits für das Fusionsprotein L19CDy-His beschriebenen *Bystander Effect*. Als Kontrollversuch wurden die Nicht-Zielzellen in den *Wells* kultiviert, der antiA33-CDy-Inkubation unterzogen und anschließend mit den Kontrollzellen ohne antiA33-CDy-Inkubation gemeinsam kultiviert (Abb. 5.16 B). Der cytotoxische Effekt konnte nicht beobachtet werden, wenn die Kontrollzellen zunächst der antiA33-CDy-Inkubation unterzogen und die Zielzellen anschließend co-kultiviert wurden. Dies unterstreicht die Voraussetzung einer spezifischen Bindung des Fusionsproteins an die Zielstruktur hgpA33, um einen erfolgreichen Therapieeffekt, wie er in Abb.5.16 A deutlich wird, zu ermöglichen.

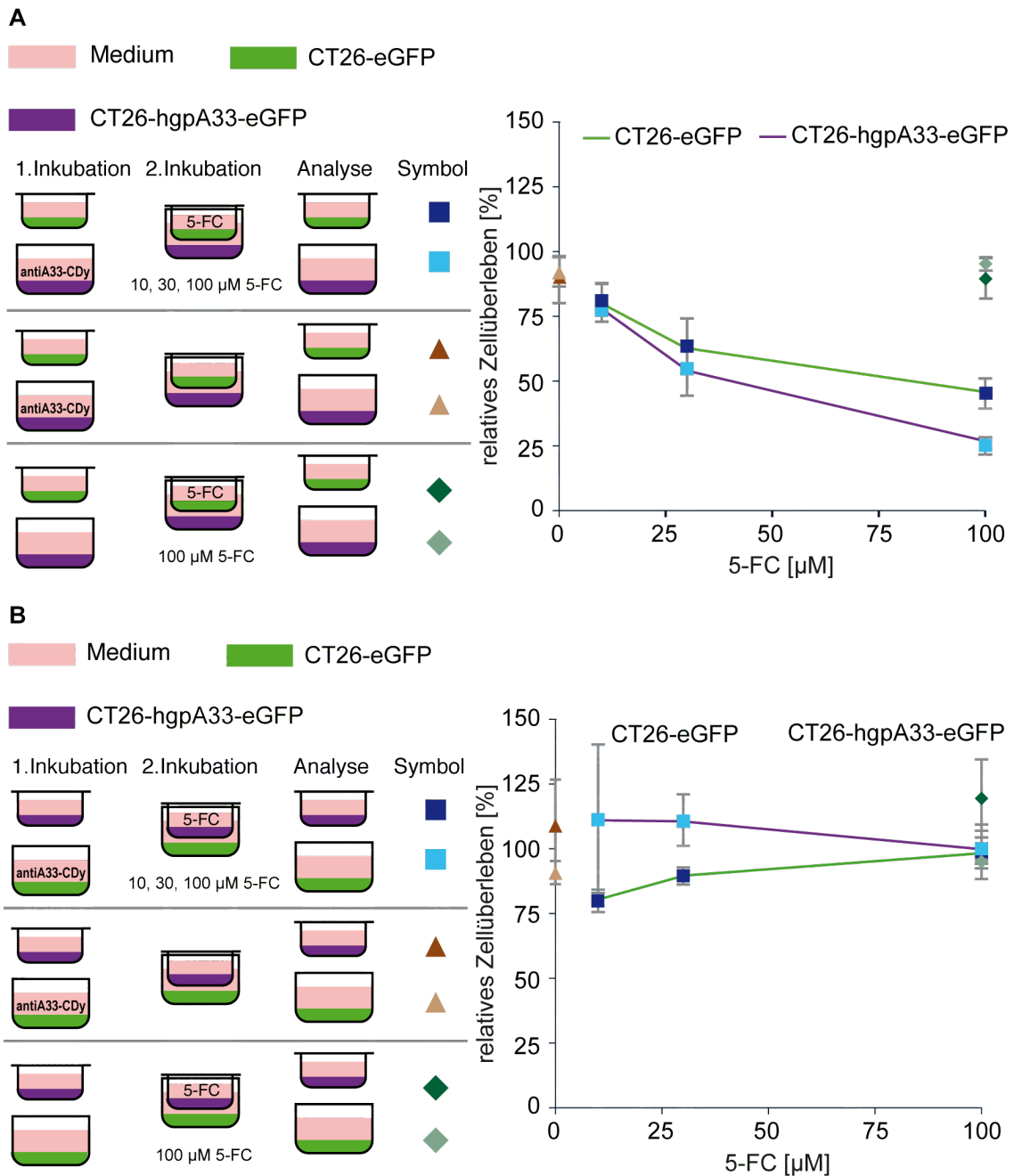


Abb. 5.16.: Diese Abbildung veranschaulicht den *Bystander Effect* der Therapie mit antiA33-CDy und 5-FC. **(A)** Die Zielzellen CT26-hgpA33-eGFP (violett) wurden in *Wells* kultiviert und mit antiA33-CDy behandelt. Nachdem ungebundenes antiA33-CDy ausgewaschen wurde, erfolgte die Co-Kultivierung mit den Kontrollzellen CT26-eGFP (grün) durch das Einsetzen des *Inserts*, in dem die CT26-eGFP-Zellen zuvor kultiviert wurden, und die Zugabe des *Prodrugs*. **(B)** Für diesen Assay wurden die CT26-eGFP-Zellen in den *Wells* kultiviert, mit antiA33-CDy behandelt und anschließend mit den CT26-hgpA33-eGFP-Zellen co-kultiviert. Es wurden drei verschiedene 5-FC-Konzentrationen (Quadrat) nach antiA33-CDy-Inkubation, das Fusionsprotein allein (Dreieck) und die höchste 5-FC-Konzentration ohne Fusionsprotein (Raute) eingesetzt. Die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung der Mittelwerte drei voneinander unabhängiger Assays.

5.2.3. Untersuchungen zur Immunogenität von antiA33-CDy in BALB/c-Mäusen

Die in ADEPT eingesetzten Fusionsproteine unterliegen der Voraussetzung, dass das enthaltene Enzym nicht in dem zu behandelnden Organismus vorkommt. Wenn das *Prodrug* systemisch verabreicht wird, kann unter dieser Voraussetzung eine unbeabsichtigte, enzymatische Umsetzung in tumorfernen Geweben verhindert werden. AntiA33-CDy enthält die CDy, deren cDNA aus *Saccharomyces cerevisiae* abgeleitet wurde und in Säugern nicht vorkommt. Demzufolge kann CDy potentiell immunogen in murinen und humanen Organismen wirken. Für die Untersuchung zur Immunogenität des Fusionsproteins wurden zweimal 100 μg antiA33-CDy in einem Abstand von sieben Tagen subkutan in BALB/c-Mäuse injiziert und das Plasma 12 und 26 Tage nach der ersten Injektion auf die Anwesenheit muriner Antikörper gegen die Proteine antiA33-CDy, His-CDy, antiA33-GFP und Fibronectin in einem ELISA untersucht. Die Abbildung 5.17 A zeigt den Nachweis muriner Antikörper, die eine Affinität zu antiA33-CDy aufweisen. Es wird deutlich, dass die Menge der im Plasma zirkulierenden Antikörper nach 26 Tagen im Vergleich zur ersten Blutabnahme am 12. Tag bei allen immunisierten Tieren (blau unterlegt) abnimmt und von Tier zu Tier variiert, da die Immunantwort individuell verschieden ist.

Die Immobilisierung der Proteine His-CDy, antiA33-eGFP und Fibronectin diente zur Identifikation der murinen Antikörperspezifitäten. Die Abbildung 5.17 B belegt, dass die Injektion von antiA33-CDy initial zur Bildung muriner Antikörper führt, die gegen den enzymatischen Teil des Fusionsproteins gerichtet sind, da ausschließlich für das Volllängenprotein antiA33-CDy (Abb. 5.17 A) und His-CDy (Abb. 5.17 B) die Anwesenheit muriner Antikörper nachgewiesen wurde. Das murine Plasma unbehandelter Kontrollmäuse enthält keine Immunglobuline, die eine Affinität für antiA33-CDy, His-CDy, antiA33-GFP oder Fibronectin aufweisen.

Dieselben Mäuse wurden 42 Wochen nach der ersten antiA33-CDy-Injektion zwei weitere Male mit antiA33-CDy immunisiert. Plasmaproben, die vor der erneuten Immunisierung genommen wurden, enthielten keine nachweisbaren antiA33-CDy-affinen Antikörper mehr (ohne Abb.). Die Abbildung 5.17 C belegt jedoch im Plasma aller mehrfach immunisierten Mäuse die Anwesenheit muriner Antikörper, die sowohl eine Affinität für antiA33-CDy (blau), als auch His-CDy (gelb) aufwiesen. Die Antikörper traten schon nach sieben Tagen auf und sind vermutlich auf antiA33-CDy-spezifische Gedächtniszellen (engl. *memory B cells*) zurückzuführen. Solche affinitätsgereiften, nicht sekretorisch aktiven Gedächtniszellen sind Vorläufer der antikörperproduzierenden Zellen, die eine schnelle Antwort auf einen erneuten Antigenkontakt ermöglichen [114].

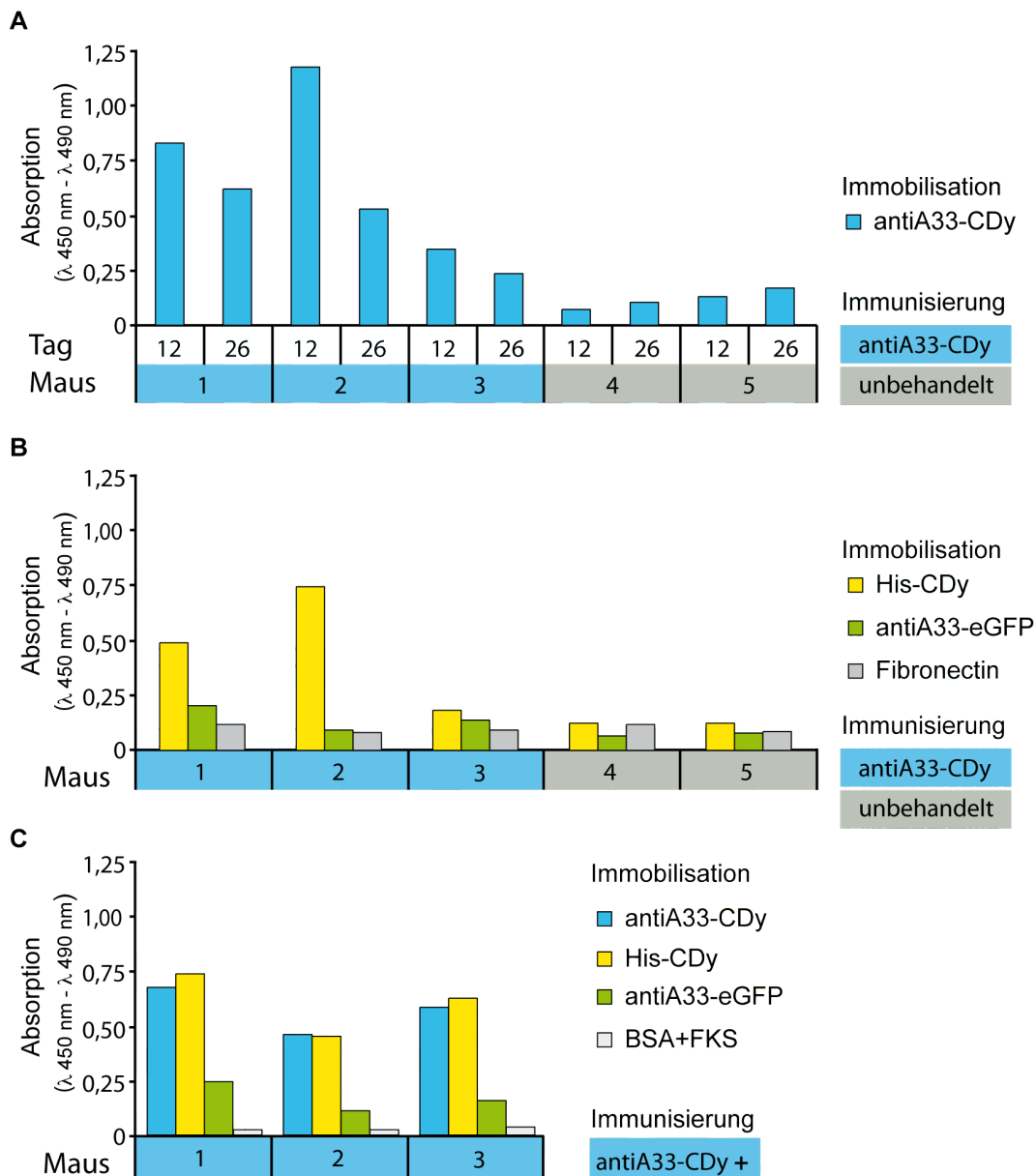


Abb. 5.17.: Das Plasma antiA33-CDy-immunisierten (blau unterlegt) und nicht immunisierten BALB/c-Mäuse (grau unterlegt) wurde in einer 1:200 Verdünnung mit PBS mittels ELISA untersucht, wobei die Menge der murinen, an die immobilisierten Proteine gebundenen Antikörper mit der Absorption korreliert. **(A)** Die Immunisierung erfolgte am Tag 0 und 7 und die Blutabnahme am Tag 12 und 26. AntiA33-CDy wurde für den ELISA immobilisiert und das Plasma in einer 1:200 Verdünnung auf die Anwesenheit muriner Antikörper, die gegen antiA33-CDy gerichtet sind, getestet. **(B)** Zur Kontrolle der Antikörperspezifität wurden His-CDy, antiA33-eGFP und Fibronectin immobilisiert und das murine Plasma (Tag 12) in gleicher Weise eingesetzt. **(C)** Die selben immunisierten Mäuse wurden 42 Wochen nach dem letzten Kontakt mit antiA33-CDy erneut zweimal mit 50 mg antiA33-CDy im Abstand von sieben Tagen immunisiert. Für den ELISA wurden antiA33-CDy, His-CDy, antiA33-eGFP und BSA-FKS immobilisiert.

Die gebildeten Antikörper könnten den Erfolg der Tumorthherapie verringern, wenn die Bindung an das Fusionsprotein zu dessen Degradation, zur Blockierung des scFvs oder zur enzymatischen Inaktivierung führen würde. Um letzteres zu überprüfen, wurde antiA33-CDy mit dem murinen Plasma der immunisierten Mäuse inkubiert und anschließend die enzymatische Aktivität bestimmt (5.18). Hierfür wurden das Plasmavolumen und die antiA33-CDy-Menge so gewählt, dass das Verhältnis beider dem einer *In-vivo*-Therapie mit der maximalen Menge von 75 μg pro Maus entspricht. Die Ergebnisse belegen, dass das murine Plasma nur bei einer von vier getesteten Proben zur Verringerung der enzymatischen Aktivität führt. Der Vergleich der Mittelwerte (rote Linie) der relativen enzymatischen Aktivität zeigt eine geringfügige Abnahme von etwa 8,5 %, sodass nicht auszuschließen ist, dass die individuell gebildeten Antikörper die Therapie beeinflussen könnten.

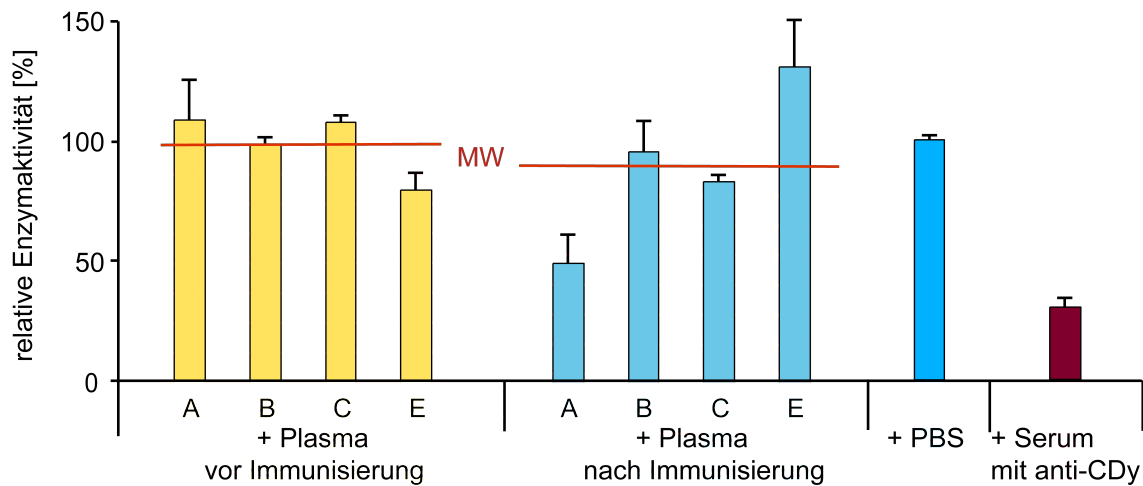


Abb. 5.18.: Die Abbildung veranschaulicht die relative enzymatische Aktivität von antiA33-CDy nach Inkubation mit murinem Plasma vor und nach der antiA33-CDy-Immunisierung. Das murine Plasma wurde mit antiA33-CDy 30 min vorinkubiert, gefolgt von einem Enzymaktivitätsassay mit 5-FC. Die Reaktionsgeschwindigkeit der Substratumsetzung durch antiA33-CDy nach PBS-Inkubation wurde 100 % gesetzt und die anderen Werte damit verglichen. Die jeweiligen Mittelwerte errechnen sich aus voneinander unabhängigen Messungen ($n = 5$ für antiA33-CDy; $n = 3$ für A, B, C; $n = 2$ für E und Serum).

5.2.4. Das murine Kolonkarzinom-Modell *in vivo*

Die hervorragende cytotoxische Wirkung der ADEPT mit antiA33-CDy und 5-FC auf die CT26-hgpA33-eGFP-Zellen (Abschnitt 5.2.2, S. 42) bildete die Grundlage für die Entscheidung des Einsatzes dieser Zelllinie *in vivo*. Für die Etablierung subkutaner hgpA33+ Tumore wurden 2×10^6 CT26-hgpA33-eGFP-Zellen in die rechte Flanke der BALB/c-Mäuse injiziert. In den Kontrollgruppen wurden die CT26-eGFP-Zellen in gleicher Anzahl und Weise injiziert. Die Zellen wuchsen innerhalb von wenigen Tagen zu einem tastbaren etwa 4 mm^3 großen Tumor heran, sodass am fünften Tag die Therapie mit der Verabreichung des Fusionsproteins antiA33-CDy begonnen wurde. Um eine antitumorale Wirkung von antiA33-CDy in immunkompetenten BALB/c-Mäusen zu erreichen, wurde eine Mehrfachinjektion des Fusionsproteins angestrebt. Trotz der positiven Ergebnisse zur stabilen Enzymaktivität von antiA33-CDy nach Inkubation mit dem Plasma immunisierter Mäuse wurde auf eine mehrfache Gabe von antiA33-CDy für die Therapie mit 5-FC verzichtet, um einen etwaigen negativen Einfluss von Antikörpern, die gegen antiA33-CDy gebildet werden könnten vorzubeugen. Um die vollständige, renale *Clearence* ungebundenen Proteins zu gewährleisten, wurde das *Prodrug* 48 h später verabreicht. Dieser Zeitpunkt wurde von Dr. Hossein Panjideh mit radioaktiv markiertem antiA33-CDy ermittelt und diente als Grundlage für die *In-vitro*-Versuche. Die Abbildung 5.19 veranschaulicht die einzelnen Gruppen und deren Therapieansatz.

	CT26-hgpA33-eGFP-Tumore					CT26-eGFP-Tumore	
	I	II	III	IV	V	VI	VII
antiA33-CDy	-	50 µg	25 µg	50 µg	75 µg	75 µg	-
5-FC	5 mg	-	5 mg	5 mg	5 mg	5 mg	-
	<i>Kontrollgruppen</i>		<i>Therapiegruppen</i>				<i>Kontrollgruppe</i>

Abb. 5.19.: Für die ADEPT *in vivo* wurden sieben Gruppen mit je sechs Mäusen zusammengestellt. Die Gruppen I-V erhielten eine subkutane Injektion mit 2×10^6 Zielzellen CT26hgpA33-eGFP (violett) und die Gruppen VI und VII 2×10^6 Kontrollzellen CT26-eGFP (grün). Die Tiere wurden vor der antiA33-CDy-Behandlung zufällig, jedoch nach Zelllinie getrennt sortiert, auf die Kontroll- (I, II, VII) und Therapiegruppen (III, IV, V, VI) verteilt. Die Therapie startete mit der subkutanen Verabreichung von antiA33-CDy oder NaCl (symbolisiert durch -) in die Flanke in Tumornähe. Das *Prodrug* 5-FC oder NaCl wurde im Abstand von 48 h ebenfalls subkutan injiziert.

Das Gewicht der Mäuse und die jeweilige Tumorgröße wurden in regelmäßigen Abständen kontrolliert. Ein frühzeitiger Therapieabschluss erfolgte bei Tieren, bei denen der Tumor die maximale Länge von 12 mm überschritt oder nachdem der Tumor invasiv durch die Haut hindurchwuchs. Letztere Beobachtung wird als Tumordurchbruch bezeichnet, ist jedoch nicht intendiert und in den folgenden Abbildungen (Abb.5.22; Abb.5.23) durch ein blaues Dreieck gekennzeichnet, um zu verdeutlichen, dass die gemessene Tumormasse oder das Gesamtüberleben eventuell größer beziehungsweise verlängert sein könnte, als dargestellt werden kann.

Die Tumorzellen wuchsen in der rechten Flanke bei fast allen Tieren oberhalb des Injektionsortes zu einem von der Subkutis gut abgrenzbaren Tumorgewebe heran. Die Abbildung 5.20 A dient der Orientierung und zeigt den Ort der Tumorentstehung (weißes Rechteck), der in der Abbildung 5.20 unter B und C und auch in folgenden Abbildungen (Abb. 5.21) als Ausschnitt gezeigt ist. Das auf der Subkutis wachsende Tumorgewebe wurde durch Resektion vollständig entfernt und anschließend sofort die Tumormasse bestimmt (Abb. 5.22).

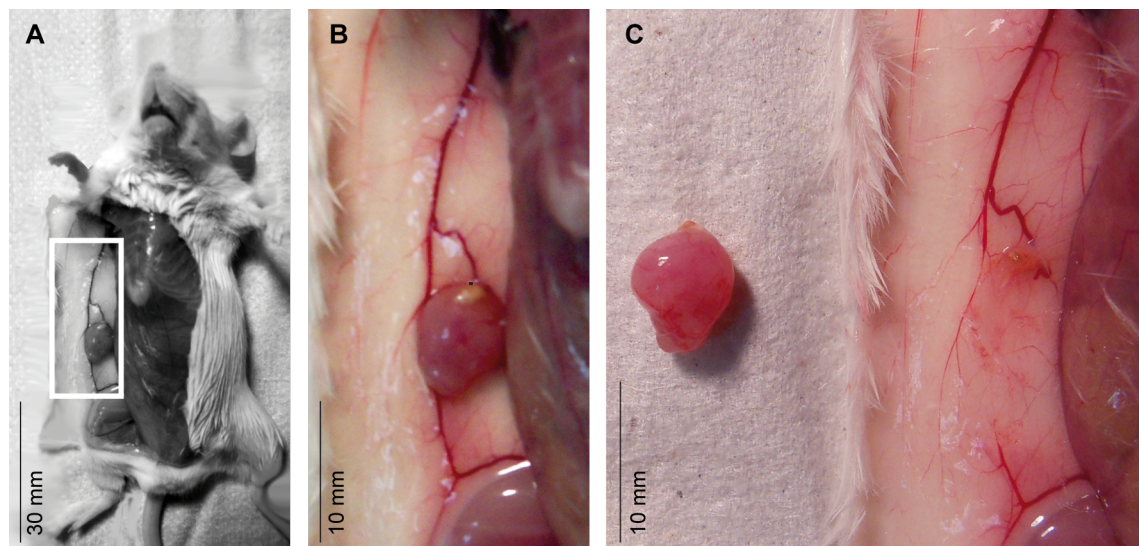


Abb. 5.20.: Die Tumorsektion erfolgte nach Tötung und nachfolgender Überstreckung des Tieres. **(A)** Das weiße Rechteck verdeutlicht den im Folgenden dargestellten Bereich mit Tumor *in vivo*. **(B)** Tumorgewebe *in situ* **(C)** Vollständige makroskopische Entfernung des Tumorgewebes im Bereich der Subkutis.

Die folgende Abbildung 5.21 verdeutlicht den Unterschied in der Ausprägung des Kapillarsystems erfolgreich behandelter (Abb. 5.21 A, B, S. 51) und tumortragender Tiere (C, D). Die Therapie wurde bei allen Tieren, die makroskopisch kein Tumorgewebe aufwiesen (Abb. 5.21 A, B), als erfolgreich eingestuft, wobei bei manchen Tieren eine bräunliche Ver-

färbung der Subkutis (Abb. 5.21 B, grauer Pfeil) zurückblieb. Die Abbildung verdeutlicht, dass das starke Tumorstadium mit einer ausgeprägten Arteriogenese der in der Subkutis vorliegenden Gefäße (C, D, schwarze Pfeile) einherging. Die Angiogenese im Tumorgewebe, die für dessen Versorgung essentiell ist, wird hier durch ein fein verzweigtes Kapillargeflecht augenscheinlich (D, weiße Pfeile).

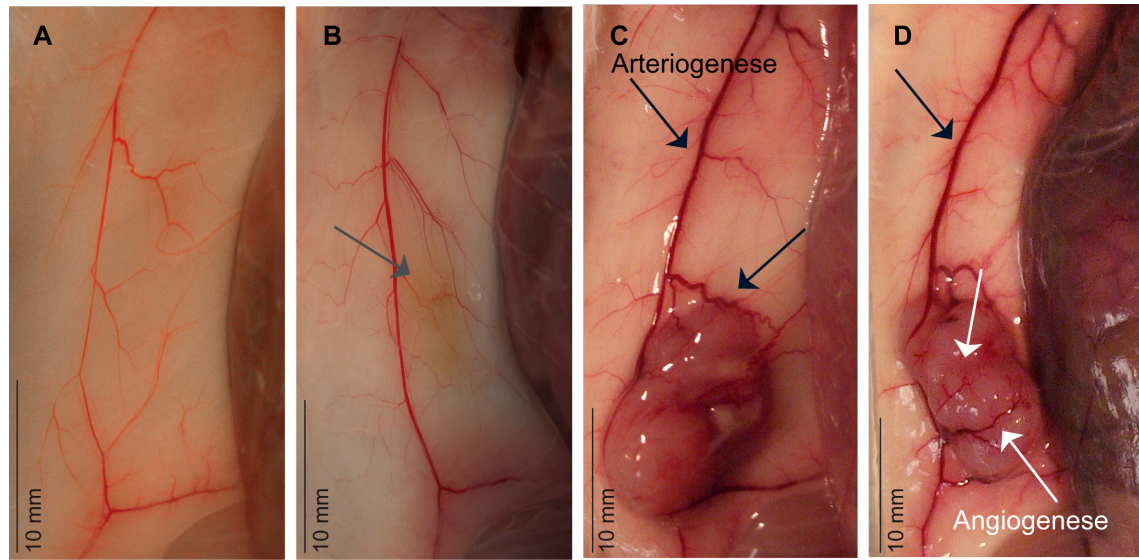


Abb. 5.21.: Die Abbildung verdeutlicht den Unterschied der Ausprägung des Kapillarsystems in Tumornähe. Die vollständige Tumorremission ist in (A) und (B) gezeigt, wobei in B eine bräunliche Färbung der Subkutis auftritt (grauer Pfeil). Die Arteriogenese wird in (C) und (D) (schwarze Pfeile) deutlich. Angiogenese liegt im Tumorgewebe vor und ist auf dessen Oberfläche sichtbar (D, weiße Pfeile).

Die Abbildung 5.22 zeigt die Tumormassen in den verschiedenen Gruppen am Todestag der Tiere. In den Kontrollgruppen I und II, die jeweils keine vollständige Therapie erhielten, wurden Tumormassen im Bereich von 180–810 mg bestimmt. In Gruppe I wies eine von sechs Mäusen zum Zeitpunkt des Therapiebeginns keinen Tumor auf, sodass hier nur fünf Werte abgebildet werden können. Die verabreichte antiA33-CDy-Menge wurde in den Therapiegruppen III bis V von 25 μg auf 75 μg erhöht, um den Einfluss der Fusionsproteinmenge auf den Therapieerfolg zu untersuchen. Die Beobachtungen zeigen, dass eine Abhängigkeit zwischen der verabreichten antiA33-CDy-Menge und dem Tumorstadium besteht, da geringere Tumormassen mit ansteigender antiA33-CDy-Menge auftraten. Bemerkenswerterweise führte die Injektion von 75 μg antiA33-CDy je Maus bei allen Tieren in Gruppe V zu einem vollständigen Rückgang des Tumorgewebes. Die Auswertung der Tumormassen erfolgte mit dem nicht-parametrischen Mann-Whitney U-Test. Das Tester-

gebnis belegte signifikante Unterschiede in den Tumormassen zwischen den Gruppen I und V ($p = 0,007$), II und V ($p = 0,007$) und III und V ($p = 0,022$).

In den Gruppen VI und VII, in denen Kontrollzellen verwendet wurden, traten Tumormassen im Bereich von 400–1070 mg auf, wobei es bei drei von zwölf Mäusen zu einem Tumordurchbruch (blaues Dreieck) kam. Die Ergebnisse zeigten signifikante Unterschiede in den Tumormassen zwischen der Gruppe I und VI ($p = 0,045$) und V und VI ($p = 0,009$).

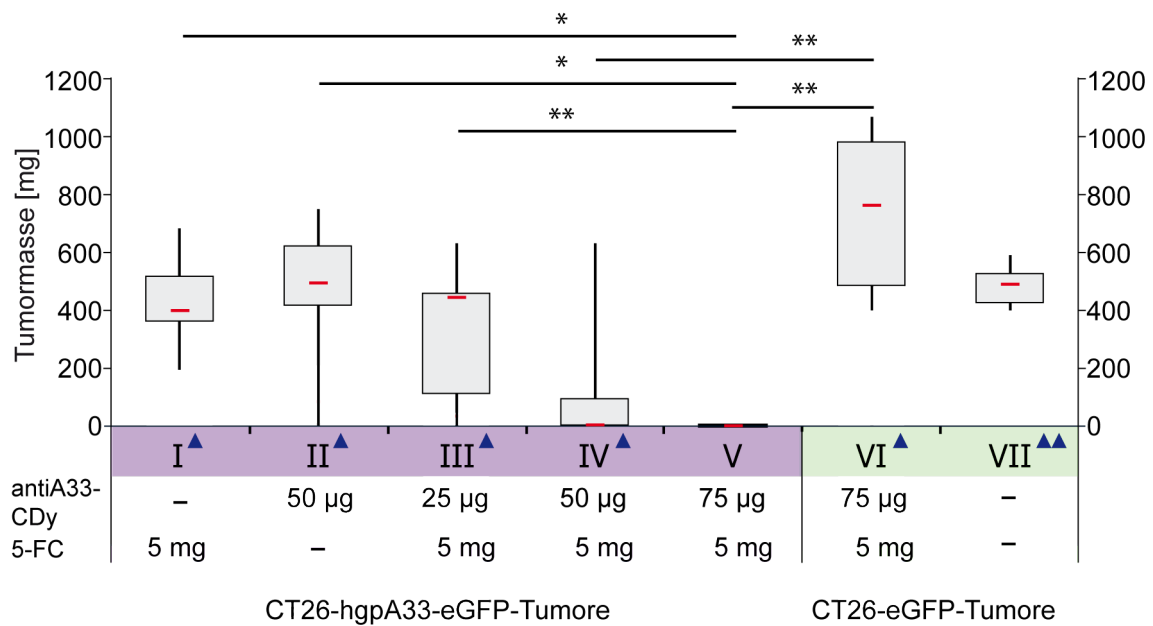


Abb. 5.22.: Die hier gezeigten Tumormassen wurden nach dem Tod des jeweiligen Tieres bestimmt, wobei ein frühzeitiger Therapieabschluss aufgrund eines Tumordurchbruchs oder durch Größenüberschreitung (> 12 mm) erfolgte. Gruppen mit hgpA33-eGFP- oder eGFP-exprimierenden Tumoren sind violett beziehungsweise grün unterlegt. Die Abbildung enthält neben der Darstellung des Bereichs aller aufgetretenden Tumormassen einer Gruppe (vertikaler Strich), die obere und untere Quartile (Box) und den Median (rot). Frühzeitige Versuchsbeendigungen aufgrund eines Tumordurchbruchs sind jeweils mit einem Dreieck für jede aus dem Versuch ausgeschiedene Maus gekennzeichnet. Signifikanzwerte $< 0,05$ und $0,001$ sind mit einem Stern (*) beziehungsweise zwei Sternen (**) gekennzeichnet.

Das Tumorwachstum hatte einen entscheidenden Einfluss auf die Überlebensrate, die in Abbildung 5.23 dargestellt ist. Hierbei wird deutlich, dass vor allem Tiere mit CT26-hgpA33-eGFP-Tumoren (violett), die der vollständigen Therapie unterzogen wurden ein verlängertes Überleben aufwiesen. Dahingegen ist die Überlebensrate bei den Tieren aus der Kontrollgruppe II (grau) und der Therapiegruppe VI (grün) deutlich verringert. Dieser Verlauf entspricht den Erwartungen, da die Tiere der Gruppe II nur antiA33-CDy ohne *Prodrug* erhielten und in der Gruppe VI ein CT26-eGFP-Tumor heranwuchs, dessen Zellen hgpA33 nicht exprimierten.

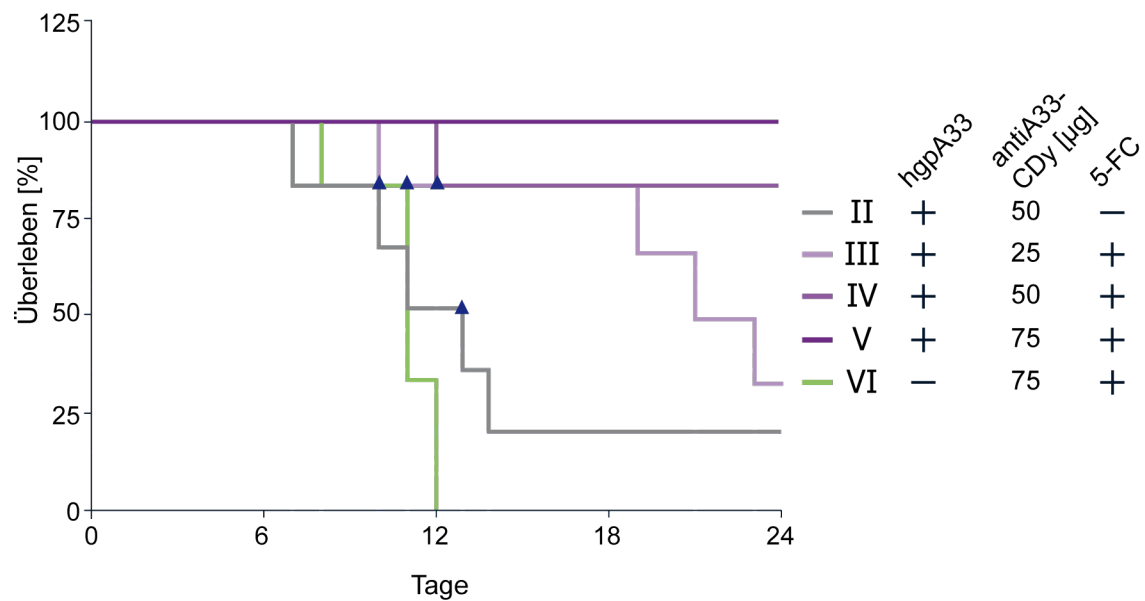


Abb. 5.23.: Das Gesamtüberleben der Tiere der Gruppen II bis VI ist hier bis zum 24. Tag dargestellt. Ein Tumordurchbruch (blaues Dreieck) führte zur sofortigen Beendigung der Therapie des betroffenen Tieres. Die Therapiegruppen mit den hgpA33-eGFP-(III, IV, V) oder eGFP-exprimierenden Tumoren (VI) sind violett beziehungsweise grün dargestellt.

Wie auch für L19CDy-His gezeigt werden konnte, führte die Fusion der CDy mit einem scFv zu einem enzymatisch aktiven ADEPT-Fusionsprotein. Dessen therapeutische Wirksamkeit wurde auf Zielzellen und durch den *Bystander Effect* auch auf benachbarte Zellen mit Erfolg *in vitro* nachgewiesen. Darüber hinaus bestätigen die Ergebnisse des Kolonkarzinom-Modells eindeutig die Annahme, dass antiA33-CDy trotz der immunogenen Wirkung mit einer Einmaldosis in ausreichender Menge erfolgreich für die Reduktion von hgpA33+ Tumoren eingesetzt werden kann.

Kapitel 6.

Diskussion

6.1. *In-vitro*-Untersuchungen zur ADEPT mit L19CDy-His

6.1.1. Das Fusionsprotein L19CDy-His

Der Expressionsorganismus *Pichia pastoris* wurde bereits erfolgreich für die Expression einer Vielzahl verschiedener, rekombinanter Proteine verwendet. *P. pastoris* führt als eukaryontischer Organismus co- und posttranslationale Modifikationen durch, weist im Vergleich zur Expression in Säugerzellen eine hohe Proteinausbeute auf [34] und ist besonders für die Expression von Proteinen geeignet, bei denen bei der Expression in Bakterien *Inclusion Bodies* gebildet werden [51]. Für das Fusionsprotein antiA33-CDy wurde die hohe Proteinausbeute und erfolgreiche Aufreinigung bereits publiziert [126]. In Anlehnung an diese erfolgreichen Ergebnisse wurde *P. pastoris* auch für die L19CDy-His-Expression verwendet. Zudem wurde die cDNA der CDy separat in den Hefeexpressionsvektor pPICZ α integriert, um das Enzym in *P. pastoris* zu exprimieren und als Negativkontrolle in den *In-vitro*-Versuchen einzusetzen. Die Abbildungen der Westernblots belegen sowohl für L19CDy-His, als auch für His-CDy die erfolgreiche Expression in *P. pastoris* (Abb. 5.1, S. 26; Abb. 5.3 S. 27). Durch die Anwesenheit des Signalpeptids α -factor erfolgt die Proteinsekretion in den Kulturüberstand. Für die Aufkonzentrierung der Proteine wurde daher eine Ammoniumsulfatfällung durchgeführt, die es ermöglicht die exprimierten Proteine in einem kleineren Volumen aufzunehmen und sie anschließend in der Affinitätschromatographie aufzureinigen. Das stringente Waschen der Ni-NTA-Agarose mit 75-mM-Imidazol-PBS-Lösung führte bereits zur L19CDy-His-Elution. Die Überprüfung der enzymatischen Aktivität dieser Waschfraktion zeigte jedoch eine geringere Aktivität im Vergleich zur Elutionsfraktion. Dies ist vermutlich auf Verunreinigungen in der Waschfraktion mit anderen Proteinen des Kulturüberstandes zurückzuführen. Da die Enzymaktivität auf die Gesamtproteinkonzentration einer Probe bezogen wurde, verringern Verunreinigungen den Anteil CDy-His in der Waschfraktion und damit auch deren Aktivität. Die Proteinausbeute ist von vielen verschiedenen Faktoren abhängig, unter anderen von dem Expressionsorganismus und -vektor und der cDNA selbst. Der Vergleich der Proteinausbeute von sehr ähnlichen rekombinanten Fusionsproteinen zeigt, dass die erzielten Proteinnengen je Liter Hefeexpressionsmedium mit 8 mg L19CDy-His in dieser Arbeit und 1–3 mg scFvA33 α sarcin in der Arbeit von Carreras-Sangrà et al. [26] sich nur geringfügig unterscheiden. Andere rekombinante Proteine weisen bei der Expression in *P. pastoris* eine deutlich höhere Proteinausbeute auf, jedoch ist hier nicht nur

zu berücksichtigen, dass es sich um ein gänzlich anderes Protein handelt, sondern auch, in welchen Vektor die cDNA integriert wurde. Ein Beispiel hierfür ist die Expression der α -Amylase. Die Proteinausbeuten betragen mit dem herkömmlichen Signalpeptid des pPS7-Vektors 0,9 g/l und mit dem Sucil-Signalpeptid 2,5 g/l [125].

6.1.1.1. *In-vitro*-Untersuchungen zur Proteinstabilität in humanem Plasma

Die enzymatische Aktivität des Fusionsproteins bildet eine entscheidende Grundlage für den Therapieerfolg. Um die Eignung von L19CDy-His für die zielgerichtete Tumorthherapie zu testen, wurde die Enzymaktivität nach Inkubation mit humanen Plasma *ex vivo* bestimmt. Die Ergebnisse belegen, dass die Enzymaktivität nach sechs Stunden abnimmt, jedoch über einen Zeitraum von 72 Stunden mit etwa 75 % der Ausgangsaktivität stabil bleibt. Dieser Zeitraum wurde gewählt, da das *Prodrug* erst 48 Stunden später verabreicht wird und es daher notwendig ist, dass die Enzymaktivität über diesen Zeitraum im Wesentlichen erhalten bleibt [126, 127].

6.1.1.2. Untersuchungen zur Bindungsaffinität des Fusionsproteins

Der scFv L19 bindet spezifisch an die Proteindomäne ED-B, die in einer speziellen Splicevariante des Fibronectins vorkommt. Für die durchgeführten Arbeiten wurde ausschließlich diese Domäne (10 kDa) exprimiert. Die ED-B-Expression erfolgte nach IPTG-Induktion in *E. coli* BL21, mit denen Ye et al. ebenfalls hohe Proteinausbeuten bei der Expression eines Fusionsproteins aus den Fibronectindomänen ED-A und ED-B erzielten [167]. Die intrazelluläre Expression setzte einen Zellaufschluss voraus, sodass hier keine zusätzliche Aufkonzentrierung wie für die sekretorische Hefeproteinexpression erforderlich war. Entgegen den häufig publizierten Problemen bei der Expression rekombinanter Proteine in *E. coli*, die in Form von *Inclusion Bodies* auftreten [33, 146, 168], wurde die Proteindomäne ED-B als lösliches Protein exprimiert. Die Abbildung des Coomassiegeles veranschaulicht die sehr effiziente ED-B-Aufreinigung (Abb. 5.2, S. 26).

Der scFv L19 wurde 1998 von Pini et al. etabliert und dessen hohe Affinität zu ED-B erfolgreich nachgewiesen [132]. Da die Fusion von scFv L19 mit CDy oder auch die Eigenschaft von CDy zu dimerisieren [150] zur Modulation der ED-B-Affinität führen kann, wurde die L19CDy-His-ED-B-Interaktion zunächst mittels ELISA untersucht (Abb. 5.5, S. 30). Hierfür wurde die ED-B, der epidermale Wachstumsfaktor (EGF), die N-Glykosidase Saporin, BSA und eine Blocklösung (BSA + FKS). L19CDy-His interagierte nicht mit der Blocklösung oder anderen Proteinen, die als Negativkontrollen ausgewählt wurden. Die Auswahl der Proteine erfolgte aufgrund deren Ähnlichkeit zu ED-B, wobei diese Proteine eine ähnliche Größe, das gleiche Affinitäts-tag, den gleichen Ursprung oder Aufreinigungsprozess

aufweisen. Mit keiner dieser Kontrollen konnte eine unspezifische Bindung von L19CDy-His nachgewiesen werden (Abb. 5.5 B, S. 30), während die L19CDy-His-ED-B-Interaktion abhängig von der eingesetzten L19CDy-His-Menge erfolgte und damit die Spezifität der Antikörperbindung unterstrich (Abb. 5.5 A, S. 30). Dass nach der scFv-Fusion mit anderen Proteinen die Bindungsfähigkeit zu ED-B erhalten bleibt, wurde bereits mit einer Vielzahl verschiedener Proteine gezeigt [25, 66, 65]. Zur detaillierten Charakterisierung der Affinität wurde eine Oberflächenplasmonresonanz-Analyse mit immobilisiertem ED-B durchgeführt (Abb. 5.6, S. 31). Diese Methode ermöglicht die Bestimmung des KD-Wertes, der den Vergleich der Affinität gegenüber ED-B mit anderen L19-Fusionsproteinen oder dem unkonjugierten scFv ermöglicht. Viti et al. untersuchten die scFv E1 und L19, welche beide durch Selektion von Antikörpern gegen das Antigen ED-B generiert wurden. Dennoch weisen beide scFvs mit einem KD-Wert von 41 nM beziehungsweise 0,054 nM eine sehr unterschiedlich hohe Affinität zu ED-B auf [159]. Der in dieser Arbeit bestimmte KD-Wert von 81 nM (± 7) ist im Vergleich zum unkonjugierten scFv höher (Tab. 5.1, S. 31). Dies ist vermutlich auf die Fusion mit CDy zurückzuführen, die zur Modifikation der Gesamtkonformation der Polypeptidkette aus L19 und CDy führen könnte. Die für ADEPT einzusetzenden Fusionsproteine müssen neben einer hohen Affinität gegenüber ihrem Zielprotein auch eine hohe Enzymaktivität aufweisen. Da die Bindung eines Moleküls die Umwandlung einer Vielzahl von *Prodrugs* in *Drugs* ermöglicht [142], ist dieser Fusionsproteinbestandteil essentiell und eine moderate Verringerung der Affinität im Vergleich zum unkonjugierten scFv akzeptabel. Zudem kann die Distribution im Gewebe durch die Affinität des Antikörpers beeinflusst werden. Wie die Untersuchungen von Kievit et al. zeigen, erfolgt die Distribution einer monoklonalen Antikörperchimäre mit einer geringeren Affinität zum Zielprotein im Tumorgewebe homogener als bei einem Antikörper mit einer fünffach größeren Affinität [92]. In Hinblick auf die Anwendung in ADEPT kann diese Eigenschaft zu einem großen Vorteil gereichen, da das gebildete *Drug* in der extrazellulären Matrix nur über kurze Strecken diffundiert, sodass eine homogene Verteilung des Fusionsproteins entscheidend für die Effektivität der Therapie sein kann. Dies belegte auch die Verabreichung der oben beschriebenen Antikörper im Maus-Xenograftmodell, in dem die Antikörperchimäre mit der geringeren Affinität zu einer effizienteren Inhibition des Tumorwachstums führte [92].

6.1.1.3. Die cytotoxische Wirkung der ADEPT *in vitro*

Die spezifische Bindung des Fusionsproteins L19CDy-His an die Proteindomäne ED-B konnte erfolgreich im ELISA nachgewiesen werden (Abb. 5.5, S. 30). Um die Spezifität der Bindung von L19CDy-His an das in der extrazellulären Matrix vorliegende ED-B auch auf zellulärer Ebene zu belegen, wurden Cytotoxizitätsassays mit den murinen Zielzellen F9

(ED-B+) und den murinen, hypophysären Nicht-Zielzellen At-T20 (ED-B-) durchgeführt (Abb. 5.7, S. 32).

Beide Assays belegen eindeutig, dass ein ED-B-spezifischer Effekt in der ADEPT (L19CDy-His mit 5-FC) mit den ED-B+ F9-Zellen beobachtet wurde (Abb. 5.7 A, S. 32). Die cytotoxische Wirkung erfolgte konzentrationsabhängig, sodass eine erhöhte 5-FC-Konzentration zu einer stärkeren Reduktion der Zellvitalität führte.

Die gewonnenen Ergebnisse zeigen auch, dass die Zellvitalität der AtT-20-Zellen bei den verwendeten Konzentrationen durch die Inkubation mit dem *Prodrug* allein oder zusammen mit L19CDy-His erhalten bleibt (Abb. 5.7 B, S. 32). Im Vergleich zum SI_{50} von 5-FU führt etwa erst die zehnfache 5-FC-Konzentration in Kombination mit L19CDy-His zu einer geringfügigen Reduktion der AtT-20-Zellvitalität.

Sowohl die Pseudo-ADEPT mit dem antikörperfreiem CDy-His und 5-FC als auch die Verwendung des Fusionsproteins L19CDy-His, jedoch ohne 5-FC-Zugabe führte in keiner der beiden Zelllinien zur Reduktion der Zellvitalität. Dies verdeutlicht, dass ausschließlich L19CDy-His, basierend auf der spezifischen Bindung des scFv L19, nach Zugabe von 5-FC eine erfolgreiche Therapie ermöglicht, deren Wirkung und Ausmaß durch Anpassung der 5-FC-Konzentration variiert werden kann.

Die Zellvitalität wurde jedoch drastisch reduziert, wenn die Proteine nicht ausgewaschen wurden, bevor die Zellen mit dem *Prodrug* inkubiert wurden. Obwohl hier die höchste 5-FC-Konzentration verwendet wurde, konnte die Zellvitalität nicht vollständig reduziert werden, da eine Konzentration gewählt wurde, die *per se* nicht toxisch ist, um ausschließlich den cytotoxischen Effekt des *Drugs* 5-FU zu zeigen. Die Untersuchungen Ferrás et al. mit *super-CD*, einem Fusionsprotein aus CDy und der Uracil-Phosphoribosyltransferase, bestätigen die Beobachtung, dass die Verabreichung äquimolarer *Prodrug*- und *Drug*-Konzentrationen nicht die gleiche cytotoxische Wirkung erzielen [49]. Die Zellvitalität der mit *super-CD* viral transfizierten F₂₉₃T L α -Zellen sank bei Verwendung von 1 μ M 5-FC auf etwa 85 %, wohingegen nach Verabreichung der gleichen 5-FU-Menge nur noch eine 60-prozentige Vitalität gemessen werden konnte.

6.1.1.4. Der durch L19CDy-His hervorgerufene *Bystander Effect*

Eine spezielle Form der bifunktionellen Fusionsproteine sind bispezifische Moleküle, die aus zwei verschiedenen scFv [48] oder einem svFv und einem Liganden, wie zum Beispiel TRAIL, bestehen. Das Fusionsprotein scFv62-TRAIL wurde am Max-Planck-Institut für experimentelle Medizin von Hartung et al. untersucht [71]. Es besitzt durch den scFv62 eine Affinität gegenüber dem Kaliumkanal K(V)10.1, der im zentralen Nervensystem und in 70 % aller Tumore unterschiedlichen Ursprungs exprimiert wird [39], jedoch nicht in anderen Geweben.

Die Arbeitsgruppe zeigte durch Co-Kultivierung K(V)10.1-negativer und -positiver Zelllinien, dass durch scFv62-TRAIL ein *Bystander Effect* erzielt werden kann. Hierbei handelt es sich um eine autokrine Wirkung wenn der scFv62 an K(V)10.1 und den TRAIL-Rezeptor gleichzeitig bindet. Eine parakrine Wirkung, die Hartung et al. als *Bystander Effect* beschreiben, kann auf K(V)10.1-negative Zellen erzielt werden, wenn TRAIL an den Rezeptor auf diesen Zellen und der scFv62 an eine benachbarte Tumorzelle binden. Für diesen Effekt ist jedoch entscheidend, dass das bispezifische Molekül unmittelbar zwischen der Tumor- und Nachbarzelle mit zwei verschiedenen Bindungspartnern, dem K(V)10.1 einerseits und dem TRAIL-Rezeptor andererseits, interagiert. Im Gegensatz dazu hat die in dieser Arbeit verwendete Methode den im letzten Kapitel beschriebenen Vorteil, dass der *Bystander Effect* mit den Fusionsproteinen antiA33-CDy und L19CDy-His nur von der Bildung des *Drugs* abhängig ist, da dieses membrangängige Molekül durch Diffusion in der extrazellulären Matrix der Tumor- beziehungsweise Endothelzellen auch in den tumorversorgenden Zellen eine cytotoxische Wirkung erzielen kann. Der durch ADEPT-Fusionsproteine erreichte *Bystander Effect* konnte anschaulich für L19CDy-His gezeigt werden (Abb. 5.9, S. 35). Afshar et al. untersuchten den *Bystander Effect* des Fusionsproteins hDM- α H-C6.5, welches spezifisch an den EGF-Rezeptor Her2/neu bindet und das *Prodrug* 2-Fluoro-2-desoxyadenosin in 2-Fluoroadenin umwandelt [4]. Die Untersuchungen zeigten, dass die Co-Kultivierung von nativen CT26-Zellen und Her2/neu-exprimierenden CT26-Zellen zu einer vollständigen Inhibition der Zellvitalität führte, wenn die nativen CT26-Zellen nur einen Anteil von 35 % ausmachten. Bis zu einem Anteil nativer CT26-Zellen von 75 % konnte eine 50-prozentige Inhibition der Zellvitalität gemessen werden. Vergleicht man diesen Ansatz mit den in dieser Arbeit beschriebenen Untersuchungen, so wird deutlich, dass durch die Verwendung getrennter Inkubationsräume (*Well* und Einsatz) zwei entscheidende Vorteile bestehen. Die verschiedenen co-kultivierten Zelllinien können getrennt voneinander mit dem Fusionsprotein inkubiert werden und die Auswertung der Vitalität beider Zelllinien kann getrennt voneinander erfolgen. Mit diesen Möglichkeiten wurde deutlich, dass die Anwesenheit des Zielproteins ED-B Voraussetzung für die Bindung des Fusionsproteins ist und damit indirekt auch für die Bildung des *Drugs*. Die Reduktion der Zellvitalität belegte anschaulich wie die ADEPT mit L19CDy-His und 5-FC auf ED-B+ Zellen wirkt (5.9 A, S. 35). Neben dem direkten cytotoxischen Effekt auf die Zielzellen F9 wurde ein *Bystander Effect* auf die unbehandelten Zellen im Insert erzielt, dessen Wirkung vergleichsweise stark und ebenfalls konzentrationsabhängig war. Den Erwartungen entsprechend war der erzielte *Bystander Effect* unabhängig davon, welche unbehandelte Zelllinie (F9 (A) oder AtT-20 (B)) co-kultiviert wurde. Dies unterstreicht den Vorteil einer ADEPT in Bezug auf einen effektiven *Bystander Effect*, unabhängig von der Expression des Zielproteins.

Die für L19CDy-His *in vitro* gewonnenen Daten belegen, dass alle gewünschten Eigenschaften der einzelnen Proteinkomponenten, wie die enzymatische Aktivität und die Targetaffinität im Fusionsprotein vereint wurden. Zudem kann aus den Aktivitätsbestimmungen nach Plasmakubation, den Cytotoxizitätsassays und dem beobachteten *Bystander Effect* geschlossen werden, dass der beabsichtigte Einsatz von L19CDy-His *in vivo* in der zielgerichteten Tumorthherapie sehr erfolgversprechend ist.

6.2. Immunogenität des Fusionsproteins antiA33-CDy

Die ersten *In-vitro*-Untersuchungen zum ADEPT-Fusionsprotein antiA33-CDy wurden von Hossein Panjideh durchgeführt [127]. Die gewonnenen Erkenntnisse deuten darauf hin, dass das gegen das hgpA33 gerichtete Fusionsprotein antiA33-CDy ein geeigneter Kandidat für die *In-vivo*-Therapie des Kolonkarzinoms ist. In diesem Zusammenhang wurde in der vorliegenden Arbeit die Immunogenität von antiA33-CDy untersucht, da sie einen Einfluss auf den Therapieerfolg haben kann. Im Gegensatz zu ADEPT ist die Aktivierung des Immunsystems bei der Verwendung therapeutischer Antikörper gewünscht, jedoch nicht durch die Bildung neutralisierender Antikörper, sondern durch die Aktivierung des Komplementsystems oder durch Aktivierung cytotoxischer T-Zellen. Ein in Bezug auf das Kolonkarzinom bekanntes Beispiel ist Rituximab, dessen Wirkung durch die Stimulation der Komplementkaskade erzielt wird [165]. Die Verwendung des Vollängenproteins anti-A33 zeigte eine immunogene Wirkung im murinen Organismus, die durch PEGylierung deutlich verringert werden konnte [40], jedoch betrug die Anreicherung im Tumorgewebe nur noch 75 %. Die Generierung humanisierter scFv kann die Immunogenität der Fusionsproteine herabsetzen [129] und hat den Vorteil, dass scFv, wie anti-A33 und L19, *per se* keine konstanten Antikörperfragmente (F_c) aufweisen, die durch Bindung an F_c -Rezeptoren im Besonderen auf Makrophagen eine Immunreaktion auslösen können [7]. ADEPT basiert jedoch auf Fusionsproteinen, die in der Regel ein organismenfremdes Enzym aufweisen [15], sodass die potentiell immunogene Wirkung dieser Enzyme, insbesondere durch relevante B-Zellepitope und anschließende Antikörperbildung, eine Herausforderung für die Therapie darstellen kann [140].

Die Immunogenität von antiA33-CDy wurde in BALB/c-Mäusen untersucht, indem Plasma-
proben 12 und 26 Tage nach der ersten Injektion auf die Anwesenheit muriner Antikörper, die eine Affinität gegenüber antiA33-CDy aufweisen, untersucht wurden. Die Ergebnisse belegen die Anwesenheit solcher murinen Antikörper mit einer Affinität zu antiA33-CDy (Abb. 5.17 A, S. 47). Zudem konnte durch verschiedene ELISA mit den Fusionsproteinen antiA33-CDy, anti-A33-eGFP, His-CDy und auch Fibronectin im Ausschlussverfahren ge-

zeigt werden, dass die gebildeten murinen Antikörper nur eine Affinität gegenüber CDy aufweisen (Abb. 5.17 B, S. 47). Die Kontrolle des murinen Plasmas zeigte, dass der Antikörpertiter nach 26 Tagen im Vergleich zu den Messwerten vom 12. Tag abnimmt. Nach 42 Wochen erfolgte eine wiederholte Immunisierung mit antiA33-CDy. Im Vergleich zur initialen Immunisierung ist zu beobachten, dass die wiederholte antiA33-CDy-Injektion auch zur Bildung muriner Antikörper mit einer Affinität zu CDy führt (Abb. 5.17 C, S. 47). Die Bildung CDy-spezifischer, muriner Antikörper entsprach den Erwartungen, da CDy ein *Saccharomyces-cerevisiae*-Protein ist [83] und damit eine hohe potentielle Immunogenität aufweist. Wie gezeigt werden konnte, beschränkt sich die Antikörperbildung auf CDy, den enzymatischen Teil des Fusionsproteins, sodass davon ausgegangen werden kann, dass die Bindungsdomäne (der scFv) nicht als immunogen erkannt wurde und daher keine Antikörperantwort induziert hat. Zur Bestimmung der Relevanz der gebildeten Antikörper gegen CDy wurde die enzymatische Aktivität von antiA33-CDy nach Inkubation mit antikörperenthaltendem Plasma getestet. Die Ergebnisse zeigten, dass nach Inkubation in dem Plasma nur bei einer Maus die Enzymaktivität reduziert wurde (Abb. 5.4, S. 28). Dieses Resultat geht einher mit den Beobachtungen Mallanos et al., die mittels *Phage Display* humane scFv mit einer Affinität zu CDy generierten und zeigten, dass die Enzymaktivität von CDy trotz Inkubation mit CDy-spezifischen scFv erhalten blieb [108]. Das Bindungsepitop der CDy-spezifischen Antikörper kann einen entscheidenden Einfluss auf die Inhibition der enzymatischen Aktivität haben. In dem Enzymaktivitätsassay wurde deutlich, dass ein Kaninchen-Antiserum, welches als Kontrolle verwendet wurde, die Reduktion der enzymatischen Aktivität zur Folge hatte. Die Generierung dieses Antiserums erfolgte durch Immunisierung mit einem CDy-Peptid (AS 111-124). Die gebildeten CDy-spezifischen, polyklonalen Antikörper zeigen eine ausgezeichnete Affinität sowohl im Westernblot als auch im ELISA. Das Bindungsepitop (AS 111-124) enthält keine der Aminosäuren, die für die Substratbindung verantwortlich sind [147]. Jedoch ist die Aminosäure Phe¹¹⁴ in diesem Peptid enthalten. Phe¹¹⁴ ist eine von drei Aminosäuren, die für die Ausbildung einer speziellen Proteinkonformation, die als *Lid* beschrieben wird, verantwortlich sind. Die Antikörperbindung könnte in dieser Region zu einer leicht veränderten Konformation der Polypeptidkette führen. Dadurch besteht die Möglichkeit, dass die CDy-Dimerisierung nicht erfolgt und damit kein enzymatisch aktives Molekül gebildet wird.

In welchem Ausmaß die Therapie mit dem Fusionsprotein durch das Immunsystem des jeweils therapierten Organismus beeinflusst wird, kann stark variieren und sollte stets durch *In-vivo*-Untersuchungen überprüft werden. In einer klinischen Studie der Phase I wendeten Mayer et al. eine Einzeldosis des Fusionsproteins MFECp1, gefolgt von drei Dosen des *Prodrugs*, an [113]. Das in *P. pastoris* exprimierte MFECp1 bindet spezifisch an CEA, welches

stark in Adenokarzinomen wie dem Kolonkarzinom exprimiert wird [117]. Die Überprüfung des Plasmas erfolgte vor der Behandlung und jede Woche nach der Behandlung über einen Zeitraum von 8 Wochen. Die Ergebnisse belegen, dass in 36 % aller Patienten (11/30) humane anti-chimäre Antikörper (HACA) gebildet wurden. Im Mittel trat die Immunantwort gegen die im Fusionsprotein enthaltene Carboxypeptidase G2 nach 14 Tagen auf. Zu ähnlichen Ergebnissen kam eine klinische Studie mit einem Fusionsprotein aus Carboxypeptidase G2 und einem anti-CEA-F(ab')₂-Fragment, in der nach 14 Tagen bei allen Patienten (10/10) HACA detektiert wurden [118]. Die Antikörperbildung spielt vor allem eine Rolle bei Therapieansätzen, die einen längeren Zeitraum zwischen der Gabe des Fusionsproteins und des *Prodrugs* bedürfen, sodass eine Mehrfachverabreichung in den Zeitraum des Auftretens der ersten anti-Fusionsprotein-Antikörper fallen könnte. Aufgrund dieser raschen Antikörperbildung konnte in der beschriebenen klinischen Studie auch nur bei zwei von zehn Patienten eine weitere ADEPT-Behandlung mit dem Fusionsprotein und *Prodrug* erfolgen [118]. Es ist sowohl für ADEPT-Proteine als auch therapeutische Antikörper notwendig, deren immunogene Wirkung im Patienten zu überprüfen, um den Therapieerfolg abschätzen zu können und zum Schutz des Patienten etwaige Strategieänderungen vorzunehmen. Dies belegt die retrospektive Untersuchung von 155 Morbus-Crohn- und Colitis-Ulzerosa-Patienten, von denen 23 % nach Therapie mit Infliximab, einem chimären monoklonalen IgG1 Antikörper mit Affinität zum Tumornekrosefaktor, HACA entwickelten [3]. Nach dem HACA-Auftreten wurden diesen Patienten andere anti-Tumornekrosefaktor-Agenzien verabreicht, die mit Erfolg bei 92 % aller Patienten zu einer vollständigen oder partiellen Therapieantwort führten, wohingegen die Steigerung der Infliximab-Dosis lediglich bei 17 % der Patienten erfolgreich war.

6.3. Etablierung einer murinen Kolonkarzinomzelllinie

Die Untersuchung der cytotoxischen Wirksamkeit der antiA33-CDy-5-FC-Kombinationstherapie in athymischen Nacktmäusen zeigte nur eine geringfügige antitumorale Wirkung [127]. Das langsame Wachstum der LIM1215-Zellen führte jedoch dazu, dass der therapeutische Effekt im Vergleich zur Kontrollgruppe weniger deutlich wurde. Ein schnelleres Wachstum der Tumore führt zu deutlicheren und besser messbaren Unterschieden. Außerdem ermöglicht die Verwendung von Nacktmäusen keine Analyse einer Immunantwort, die für rekombinante Fusionsproteine von erheblicher Relevanz ist. Mit diesen Erkenntnissen wurde daher angestrebt eine murine Kolonkarzinomzelllinie (CT26) zu generieren, die analog zur humanen Zelllinie LIM1215 hgpA33 stabil exprimiert, um die ADEPT in immunkompetenten BALB/c-Mäusen zu untersuchen.

Mit diesem Ziel wurde die cDNA des hgpA33s, die erstmals aus LIM1215 isoliert wurde [73], mit der des *enhanced Green Fluorescent Protein* (eGFP) fusioniert und in CT26 transfiziert, um die Visualisierung der transfizierten Zellen zu ermöglichen. Neben dieser Transfektante, die im Folgenden als Zielzelllinie CT26-hgpA33-eGFP beschrieben wird, wurde eine Kontrollzelllinie generiert, die ausschließlich eGFP cytosolisch exprimiert. Die erfolgreiche Transfektion wurde auf verschiedenen Ebenen bestätigt. Zunächst wurde die Transkription der cDNA mittels RT-PCR nachgewiesen (Abb. 5.10, S. 37). Die humane und murine gpA33-cDNA sind zu 62 % identisch, wobei eine 77 %ige Homologie im kodierenden Bereich vorliegt [87]. Das Ergebnis der RT-PCR verdeutlicht, dass die Anwesenheit der murinen von der humanen gpA33-RNA – im Rahmen der hier möglichen Sensitivität – eindeutig unterschieden werden kann. Die hgpA33- und eGFP-spezifischen Amplifikate waren in der RNA-Probe der transfizierten CT26-hgpA33-eGFP-Zellen eindeutig sichtbar und auch die Probe der CT26-eGFP-Zellen enthielten das gewünschte eGFP-Amplifikat.

Die erfolgreiche Translation der mRNA und die Translokation des hgpA33-eGFPs in die Zellmembran wurden mittels Immunodetektion nach der Membranpräparation visualisiert (Abb. 5.10, S. 37). Die Membranpräparation zeigt eindeutig, dass nur in den Proben der LIM1215- und der CT26-hgpA33-eGFP-Zellen charakteristische Proteinbanden sichtbar sind. Der Unterschied in der molekularen Masse zwischen dem nativen hgpA33 und dem hgpA33-eGFP belegt die vollständige Expression und Translokation des hgpA33-eGFPs in die Zellmembran der Transfektanten. Zudem weist die experimentell bestimmte, geringfügig größere, molekulare Masse darauf hin, dass die drei potentiellen N-Glykosylierungsstellen (Asn⁹¹, Asn¹⁷⁹, Asn²⁰²) in den verwendeten Zelllinien glykosyliert werden [73].

Mit Hilfe eines monoklonalen Antikörpers konnte in der Durchflusszytometrie durch die erfolgreiche Detektion hgpA33s gezeigt werden, dass hgpA33 trotz der Verknüpfung mit eGFP in richtiger Orientierung in der Zellmembran vorlag (Abb. 5.11, S. 39). Zudem lässt das eindeutige eGFP-Fluoreszenzsignal die Schlussfolgerung zu, dass die Fusion beider cDNAs keinen negativen Einfluss auf die Faltung des eGFPs hat.

Die gewonnenen Ergebnisse belegen, dass die erste Voraussetzung für die Generierung des Kolonkarzinom-Modells geschaffen wurde. Die Selektion der Zellen, die eine besonders große Zahl an hgpA33-eGFP-Molekülen auf ihrer Zelloberfläche präsentieren, erfolgte mit den gleichen Antikörpern im *Fluorescence-activated Cell Sorting* (FACS). Die Möglichkeit zwei verschiedene Fluoreszenzsignale – hier Phycoerythrin (PE) für hgpA33 und eGFP *per se* – für die Sortierung zu nutzen, erhöht die Wahrscheinlichkeit, stark hgpA33-exprimierende Zellen zu selektieren. Für diese Methode werden oft mehrere fluoreszenzmarkierte Antikörper verwendet, um die Spezifität, wie zum Beispiel bei der Detektion zirkulierender Tumorstammzellen [78] oder bei der Unterscheidung zwischen zirkulierenden Epithelzellen

und epithelialen Mikropartikeln [104], zu erhöhen. Der Vorteil der in dieser Arbeit verwirklichten Idee liegt darin, dass nur eine Antigen-Antikörper-Interaktion notwendig ist, da eGFP autofluoreszent ist und damit eine zweifarbige Sortierung ermöglicht (Abb. 5.12, S. 40). Zudem ermöglicht die eGFP-Fluoreszenz eine einfache Unterscheidung der Transfektanten im konfokalen *Laser-Scanning*-Mikroskop. Wie die Abbildung 5.13 (S. 41) zeigt, können die hgpA33⁻ und hgpA33⁺ Zellen aufgrund ihrer eGFP-Distribution in der Zelle beziehungsweise in der Zellmembran unterschieden werden.

Die nativen hgpA33⁺ LIM1215-Zellen wiesen im Vergleich zu den CT26-hgpA33-eGFP-Zellen ein stärkeres hgpA33-Signal auf, sodass hier auf eine höhere hgpA33-Moleküldichte auf der Zelloberfläche der LIM1215-Zellen geschlossen werden kann. LIM1215 gehört zu den häufig verwendeten hgpA33⁺ Zelllinien, wie auch LS174T und SW1222 [133, 93] und wird beispielsweise für den Nachweis der hgpA33-Lokalisation in der Zellmembran [73] oder dessen Co-Lokalisation mit Transmembranproteinen, wie dem *Tight-Junction*-assoziierten Protein ZO-1, verwendet [2].

Mit der *In-vitro*-Therapie der CT26-hgpA33-eGFP- und CT26-eGFP-Zellen wurde die prinzipielle Eignung von antiA33-CDy für ADEPT gezeigt. Die gewonnenen Ergebnisse belegen, dass die Bindung von antiA33-CDy hgpA33-spezifisch erfolgt, sodass durch Zugabe des *Prodrugs* in den Zielzellen CT26-hgpA33-eGFP eine cytotoxische Wirkung erzielt wird. Die enorme Reduktion der Zellvitalität in beiden Transfektanten bei der direkten Inkubation mit dem *Drug* 5-FU zeigt, dass beide 5-FU-sensitiv sind und die Untersuchung zur cytotoxischen Wirkung der ADEPT in einem angemessenen Konzentrationsbereich durchgeführt wurde. Da bei den Kontrollzellen CT26-eGFP nur bei der höchsten 5-FC-Konzentration in Kombination mit antiA33-CDy ein geringfügiger cytotoxischer Effekt beobachtet wurde, kann auf eine spezifische Wirkung geschlossen werden. Die hgpA33-Spezifität des scFvA33 wurde bereits von mehreren Arbeitsgruppen mit verschiedenen scFvA33-Konstrukten belegt [127, 131, 26, 155, 94] und unterstreicht dessen vielfältige Einsetzbarkeit.

Ein großer Vorteil der ADEPT ist die extrazelluläre Umsetzung des *Prodrugs* in das *Drug*, wodurch die cytotoxische Wirkung auch auf Nicht-Zielzellen (hgpA33⁻) erfolgen kann. Dieser so genannte *Bystander Effect* wurde bereits für die L19CDy-His-5-FC-Therapie beschrieben (6.1.1.4, S. 57) und konnte für antiA33-CDy ebenfalls gezeigt werden (Abb. 5.16, S. 45). Die Ergebnisse belegen, dass die Zellvitalität der hgpA33⁻ und hgpA33⁺ Transfektanten im gleichen Maße reduziert wurde, wenn die hgpA33⁺ Zellen der Therapie unterzogen wurden und anschließend eine Co-Kultivierung beider Zelllinien erfolgte. Im umgekehrten Fall, wenn die hgpA33⁻ Zellen mit dem Fusionsprotein inkubiert und nach dem Waschen mit den hgpA33⁺ Zellen und 5-FC co-kultiviert wurden, war keine Reduktion der Zellvitalität sichtbar. Dies bestätigt die Ergebnisse der Cytotoxizitätsassays (Abb. 5.15, S. 43)

und verdeutlicht die hgpA33-Abhängigkeit des Therapieerfolges.

Dies entsprach den Erwartungen und verdeutlicht die Wirkweise des *Drugs* 5-FU, welches durch Diffusion in die Nicht-Zielzellen den *Bystander Effect* bewirkt. Die Membranpermeabilität ist zum Beispiel bei der *Gene-directed Enzyme Prodrug Therapy* eine Grundvoraussetzung. Für diese Therapie werden Zellen stabil mit dem Gen für das *Prodrug* aktivierende Enzym, hier CDy, transfiziert. Kucerova et al. untersuchten den *Bystander Effect* durch direkte Co-Kultivierung CDy-transfizierter und nativer humaner mesenchymaler Stromazellen [102]. Die Ergebnisse zeigen einen eindeutigen *Bystander Effect*, jedoch wurde die cytotoxische Wirkung nur in ihrer Gesamtheit betrachtet. Im Gegensatz dazu hat die in dieser Arbeit verwendete Methode den Vorteil, dass die Zellvitalität der hgpA33– und hgpA33+ Zellen separat voneinander bestimmt werden kann.

6.4. *In-vivo*-Untersuchungen zur cytotoxischen Wirkung von antiA33-CDy

Die murine Zelllinie CT26 induziert undifferenzierte Kolonkarzinome [31] und wird häufig für die Etablierung BALB/c syngener subkutaner Tumore für verschiedene Therapieansätze verwendet. Die Spanne der verwendeten Zellzahl reicht von 2×10^3 bis zu 2×10^6 Zellen je Maus [99, 123, 170, 46]. Für die *In-vivo*-Untersuchungen in dieser Arbeit wurde zunächst die optimale Zellzahl in Wachstumsversuchen bestimmt. Für den Therapieversuch erfolgte die Injektion subkutan mit jeweils 2×10^6 Zellen. Die Tumorzellen bildeten innerhalb weniger Tage einen tastbaren, etwa 8 mm^3 großen Tumor, dessen Behandlung am fünften Tag mit antiA33-CDy gestartet wurde. Aufgrund der für antiA33-CDy *in vivo* gewonnenen Ergebnisse zur Immunogenität des Fusionsproteins wurde angestrebt ADEPT mit einer Einmaldosis antiA33-CDy durchzuführen, um einen möglichen Einfluss des murinen Immunsystems zu umgehen. Um einen möglichen Einfluss des Immunsystems auf den Therapieerfolg nachweisen zu können wurde bewusst auf den Einsatz von Immunsuppressiva, wie zum Beispiel Cyclophosphamid oder Cyclosporin A verzichtet, da diese die Immunantwort auf artfremde, therapeutische Proteine verzögern [84, 118, 111]. Das Immunsuppressivum Cyclosporin A besitzt eine enge therapeutische Breite und führte in klinischen Studien bereits zu Endothelzellschädigungen bis hin zur Mikroangiopathie [120, 77].

Die Verabreichung des *Prodrugs* erfolgte zwei Tage nach der antiA33-CDy-Injektion, basierend auf der Grundlage der Biodistributionsuntersuchungen, für die Panjideh et al. das Fusionsprotein antiA33-CDy mit I^{131} markierten und deren Distribution in Mäusen mit hgpA33+ und hgpA33– Tumoren untersuchten. Die maximale Anreicherung des Proteins (87%) wurde im Tumorgewebe 47 Stunden nach der antiA33-CDy-Injektion ermittelt. Die-

ser Zeitpunkt erwies sich in Hinblick auf das Tumor-Blut-Verhältnis mit etwa 9:1 als optimal. Im Vergleich zum Volllängenprotein anti-A33 mit einem maximalen Tumor-Blut-Verhältnis von etwa 2,5:1 nach 21 Stunden [8] wies antiA33-CDy damit ein weitaus besseres Verhältnis auf. Bei der Verwendung radioaktiv markierter Fusionsproteine muss immer berücksichtigt werden, dass sich die renale *Clearance* der Radioaktivität durch im Blutkreislauf zirkulierende, radioaktive Abbauprodukte, die wahrscheinlich keine enzymatische Aktivität aufweisen, von der eigentlichen *Clearance* des enzymatisch aktiven Fusionsproteins unterscheidet. Darüber hinaus können sowohl die verwendete Nachweismethode als auch der untersuchte Organismus zu deutlichen Unterschieden bei der Bestimmung des optimalen Zeitpunkts der Verabreichung des *Prodrugs* führen. Wie Mayer et al. zeigten, kam es zu Unterschieden beim Nachweis des Fusionsproteins MFECP1 im Tumorgewebe, das bis zu 19 oder 24 Stunden durch immunohistochemische Färbungen von Biopsien beziehungsweise der *Single Photon Emission Computed Tomography* nachgewiesen werden konnte [113]. Die Übertragbarkeit der in verschiedenen Organismen gewonnenen Ergebnisse stellt ebenfalls eine Herausforderung dar [35]. Dies zeigte eine Studie mit einem ADEPT-Fusionsprotein, bei der das *Prodrug* sechs Stunden nach einer Einmaldosis des Fusionsproteins verabreicht wurde, da dieser Zeitabstand sich in Mäusen als optimal erwies [143]. Dieser Therapieansatz führte in der klinischen Untersuchung mit Patienten zu unvorhersehbaren Nebenwirkungen, die zuvor bei der gleichen Menge und Gabe zu einem späteren Zeitpunkt nicht auftraten [113].

Neben dem Zeitpunkt der Verabreichung des *Prodrugs* kann auch der Injektionsort und die Darreichungsform eine entscheidende Rolle spielen. Wie Bachran et al. zeigten, konnten die Nebenwirkungen einer anti-Tumorthherapie mit einem Fusionsprotein aus Saporin und dem epidermalen Wachstumsfaktor in Kombination mit dem Triterpenoid Saponin drastisch reduziert werden, wenn das Fusionsprotein in die Flanke und das Triterpenoid in die Nackenfalte der Tiere injiziert wurde [11]. Die Auswirkung der Darreichungsform des *Prodrugs* zeigte sich beispielsweise in einer Studie mit dem Cytidinanalogon Gemcitabin. Dort führte die kontinuierliche Infusion Gemcitabins durch Verwendung einer subkutan implantierten, osmotischen Pumpe zu einer verstärkten antitumoralen Wirkung in zwei von drei BALB/c-Mausmodellen [157]. Ebenso belegte die Auswertung einer klinischen Studie der Phase III mit dem monoklonalen Antikörper Bevacizumab, der gegen den *Vascular Endothelial Growth Factor Ligand* (VEGF-A) gerichtet ist, die Abhängigkeit des Therapieverlaufs von der Darreichungsform des Therapeutikums [55].

Die subkutane Verabreichung des *Prodrugs* 5-FC wurde aufgrund des Löslichkeitsverhaltens, welches die maximal zu verabreichende 5-FC-Menge einschränkt, ausgewählt. Die Löslichkeit von 5-FC in Wasser beträgt 15 mg/ml und kann durch die Zugabe von Dime-

thylsulfoxid erhöht werden. Dennoch begrenzen die *Empfehlungen zur Substanzapplikation bei Versuchstieren* die einsetzbare 5-FC-Menge durch maximal zu verabreichende Volumina je nach Injektionsort. Die orale Verabreichung ist bei der Maus auf maximal 1 ml begrenzt [53]. Obwohl 5-FC nach oraler Gabe im Gastrointestinaltrakt schnell und nahezu vollständig aufgenommen wird [17], ist dies eine sehr seltene Form der Verabreichung einer Einmaldosis bei der Maus. Die weitaus häufiger verwendeten Injektionsformen unterscheiden sich vor allem in den Volumina, wobei mit der intravenösen Injektion mit 5 ml/kg Maus weniger 5-FC im Vergleich zur subkutanen oder intraperitonealen Injektion mit maximal 10 ml/kg Maus verabreicht werden kann [53].

Über den Therapieverlauf wurde die Toxizität der Behandlung über äußere Parameter wie Gewicht, Fellzustand und Entzündungen am Injektionsort beobachtet. Die Substanzen antiA33-CDy und 5-FC wurden *in vivo* separat getestet und zeigten in dem Kolonkarzinom-Modell in den verwendeten Mengen weder eine Toxizität, noch eine antitumorale Wirkung (Vgl. Abb. 5.22 Gruppe I bzw. II, S. 52). Die vollständige ADEPT zeigte hingegen eine erfolgreiche und von der antiA33-CDy-Menge abhängige, antitumorale Wirkung, die in der Gruppe mit der größten antiA33-CDy-Menge zum vollständigen Rückgang des Tumorgewebes führte (Abb. 5.22 Gruppe III, IV, V, S. 52). Das Wachstum der Tumorzellen führte in beiden Tumorgruppen (hgpA33– und hgpA33+) zu vier beziehungsweise drei Tumordurchbrüchen, die das Therapieende für die jeweilige Maus induzierten. Der Vergleich der einzelnen Gruppen zeigte dennoch bei Berücksichtigung aller Tiere, dass signifikante Unterschiede zwischen den behandelten und nicht behandelten Gruppen, und auch den Gruppen mit hgpA33– und hgpA33+ Tumoren bestehen. Darüber hinaus verdeutlicht das Gesamtüberleben den Therapieerfolg der antiA33-CDy-Therapie (Abb. 5.23, S. 53), welcher auch für ein Glioma-Modell in der Ratte mit der Kombination von CDy exprimierenden, mesenchymalen Stammzellen und 5-FC gezeigt werden konnte [98].

Die nach dem Therapieende aufgenommenen Bilder der tumortragenden Mäuse zeigen eindeutig, dass das Blutgefäß, welches in der Kutis von der oberen zur unteren Extremität führt, in seinem Durchmesser vergrößert ist (Abb. 5.21 C, S. 51). Diese Gefäßerweiterung, die als Arteriogenese beschrieben wird, steht im Zusammenhang mit dem erhöhten Versorgungsbedarf des Tumors. Dies hat zur Folge, dass in dem Gefäß verstärkt Scherkräfte auftreten, die dessen Erweiterung forcieren [75]. Darüber hinaus wird in der Abbildung 5.21 C deutlich, dass es neben der einfachen Erweiterung des Gefäßdurchmessers auch zu einem Längenwachstum der Gefäße kommt, wodurch die typische Korkenzieherform gebildet wird [76]. Diese Modulation der bereits vorhandenen Gefäße beruht auf der erhöhten Menge an Wachstumsfaktoren. Diese werden vermehrt aus dem Tumorgewebe sezerniert, um der mit der Volumenvergrößerung einhergehenden Hypoxie entgegen zu wirken [106].

Die Versorgung des Tumorgewebes bedarf auch einer Gefäßneubildung, die als Angiogenese beschrieben wird [52]. Diese Form der Neovaskularisation ist auch auf der Oberfläche des Tumorgewebes in der Abbildung 5.21 D (S. 51) sichtbar. Die während der Angiogenese gebildeten Gefäße weisen eine erhöhte Permeabilität auf, die es ermöglicht, zielgerichtete Proteine in höheren Konzentrationen im Tumorgewebe anzureichern [7]. Dies ist darin begründet, dass die *Tight Junctions* in den Gefäßen des Tumorgewebes zwischen den benachbarten Endothelzellen nicht ausgebildet werden [72]. Die Einschränkung der Tumorversorgung durch Inhibition der Angiogenese kann ebenfalls mit einer zielgerichteten Therapie erfolgen, da die Tumorblutgefäße sich stark von normalen Gefäßen unterscheiden [136]. Um diese Inhibition zu erreichen, wurde eine Vielzahl verschiedener Substanzen entwickelt, wie zum Beispiel der humanisierte anti-VEGF-A Antikörper Bevacizumab oder die Tyrosinkinaseinhibitoren Sorafenib [90] und Sunitinib [50]. Das in dieser Arbeit vorgestellte Fusionsprotein L19CDy-His gehört ebenfalls in die Kategorie der auf die Angiogenese inhibitorisch wirkenden Proteine. Die gezielte Anreicherung eines radioaktiv markierten scFv L19 konnte bereits im Maustumormodell mit F9-Zellen durch Zardi et al. gezeigt werden [152].

L19CDy-His stellt ein geeignetes zielgerichtetes Protein dar, durch das die ausgezeichnete antitumorale Wirkung von antiA33-CDy ergänzt werden kann. Hierfür sollte eine gestaffelte Kombinationstherapie erfolgen, bei der zunächst das Fusionsprotein antiA33-CDy verabreicht wird, welches sich aufgrund der bereits beschriebenen, erhöhten Permeabilität im Tumorgewebe anreichert [7, 127]. Die Verabreichung des *Prodrugs* führt zur Bildung 5-FUs, das seine antitumorale Wirkung sowohl direkt, als auch indirekt durch den *Bystander Effect* im Tumorgewebe entfaltet. Sobald 5-FC im Blutkreislauf nicht mehr nachgewiesen werden kann, wird das Fusionsprotein L19CDy-His verabreicht. Dieses reichert sich spezifisch in der extrazellulären Matrix der Tumorgefäße an und ermöglicht dort die Umsetzung des erneut verabreichten *Prodrugs* in das cytotoxische 5-FU. Die gewählte Reihenfolge basiert auf der Annahme, dass die Inhibition der Angiogenese durch L19CDy-His die Blutversorgung des Tumorgewebes einschränkt. Dadurch würde antiA33-CDy, welches das Tumorgewebe direkt adressiert, schlechter in das Tumorgewebe eindringen können, wenn es als zweites verabreicht werden würde.

Die Kombination des Angiogeneseinhibitors Bevacizumab mit 5-FU, Folinsäure und Oxaliplatin (FOLFOX4) führte bei Patienten mit kolorektalen Karzinomen zur Verlängerung des Gesamtüberlebens [59]. Die Therapieerfolge, die seit der Zulassung von Bevacizumab erzielt wurden, sind jedoch nicht frei von Nebenwirkungen. Diese zeigen sich hauptsächlich durch therapiebedingtes Ableben aufgrund von Darmperforation oder kardiovaskulären Ereignissen [81]. Im Gegensatz zu FOLFOX4 beinhaltet der hier vorgestellte Therapieansatz

mit antiA33-CDy und L19CDy-His mehrere Vorteile. Zum Einen werden zwei verschiedene tumorspezifische Antigene in einer Therapie adressiert, jedoch ist nur ein *Prodrug* erforderlich. Dieses *Prodrug* zeigt eine sehr gute und konzentrationsabhängige Verträglichkeit ($< 100 \text{ mg/L}$) [158] und wird bereits seit 1968 erfolgreich als Antimykotikum im Menschen eingesetzt [153]. Zum Anderen beschränkt sich die Anzahl der immunogen wirkenden Proteinanteile auf CDy, die in beiden Proteinen vorhanden ist. Da es sich um einen mehrtägigen Prozess bei der Antikörperbildung handelt, der bei HACA im Durchschnitt bei 14 Tagen liegt [113, 118], kann davon ausgegangen werden, dass die gestaffelte Kombinationstherapie uneingeschränkt durchgeführt werden kann. Behandlungszyklen über einen Zeitraum von 14 Tagen werden in klinischen Studien mit 5-FU nach dem FOLFOX4-Schema oft angewendet [5, 20]. Im Vergleich zu Studien, die bisher mit ADEPT-Fusionsprotein durchgeführt wurden, werden diese Behandlungszyklen jedoch unterschiedlich oft wiederholt. In einer klinischen Studien mit dem ADEPT-Fusionsprotein MFECP1 führte die einmalige Verabreichung bei 11 von 28 Patienten zu einem stabilen Krankheitsbild und bei einem Patienten zu einer Reduktion des Tumordurchmessers um 10 % [113]. Dieses Resultat belegt das Potential der Therapie, jedoch fehlen hier überzeugende Ergebnisse, die die therapeutische Wirksamkeit aufzeigen. Dies ist darauf zurückzuführen, dass sowohl in der genannten als auch in allen bisher durchgeführten Studien zu ADEPT-Fusionsproteinen [54, 118, 109], zunächst die Pharmakokinetik und Toxizität der verwendeten Substanzen im Vordergrund stand.

In dieser Arbeit wurde das therapeutische Potential der untersuchten Fusionsproteine sowohl *in vitro* als auch *in vivo* gezeigt. Die Untersuchungen zum *Bystander Effect* sind hier im Besonderen hervorzuheben, da sie den entscheidenden Vorteil der ADEPT gegenüber anderen zielgerichteten Therapieansätzen darlegen. Im Hinblick auf die therapeutische Anwendung beider Fusionsproteine, könnte das etablierte Kolonkarzinom-Modell für die Entwicklung eines dualen *In-vivo*-Therapiemodells genutzt werden. Bezogen auf die Immunogenität der CDy-Komponente sollte dabei untersucht werden, ob die Verabreichung der Fusionsproteine in Kombination mit Immunsuppressiva mehrere Behandlungszyklen ermöglicht. Die Umsetzung dieser Strategie würde den Grundstein für eine duale ADEPT legen und damit das therapeutische Potential beider Proteine gleichzeitig ausnutzen.

Kapitel 7.

Materialien und Methoden

Die in dieser Arbeit verwendeten Bezeichnungen für Geräte und Materialien sind nicht mit dem geschützten Warenzeichen gekennzeichnet; dies schließt jedoch nicht aus, dass der jeweilige Produktname frei von Rechten Dritter ist.

Die im Folgenden aufgelisteten Methoden wurden bei Raumtemperatur durchgeführt, sofern keine anderen Angaben vorhanden sind. Das Wasser für die Herstellung von Puffern und Medien wurde mit dem ELIX Wasseraufbereiter und der MilliQ Anlage der Firma Millipore gereinigt und für die Verwendung bei molekularbiologischen Arbeiten zusätzlich autoklaviert.

7.1. Material

7.1.1. Chemikalien

Chemikalien, die im Folgenden nicht gelistet sind, wurden von den Firmen Carl Roth GmbH & Co. KG (Karlsruhe) oder Merck KGaA (Darmstadt) bezogen.

- Acrylamid (30 %, 37,5 Acrylamid : 1 Bisacrylamid); AppliChem GmbH, Darmstadt
- Bromphenolblau; Serva electrophoresis GmbH, Heidelberg
- Isopropylthiogalactopyranosid; AppliChem GmbH, Darmstadt
- Lithiumchlorid; Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
- Polyethylenglycol 3350; Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
- *Yeast Nitrogen Base*; Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München

7.1.2. Geräte

- Entwickler *Optimax Typ TR*; MS Laborgeräte, Wiesloch
- Biacore XL; GE Healthcare, Little Chalfont, UK
- Durchfluscytometer Epics XL; Beckman Coulter, Krefeld
- Potter; Janke & Kunkel, heute IKA, Staufen
- *Semi-Dry*-Blotgerät; Bio-Rad, München
- Sequenziergerät *ABI Prism 310*; Perkin Elmer, Waltham, USA
- Spektrophotometer *Nanodrop ND-1000*; PEQLAB Biotechnologie, Erlangen
- Thermocycler *Biometra TRIO-Thermoblock*; Biometra, Göttingen
- Ultraschallgerät *Branson*; G. Heinemann, Schwäbisch Gmünd

- Ultrazentrifuge *Optima L-90 K mit Ti 45-Rotor*; Beckman-Coulter, Krefeld
- Zelfuge *Heraeus Sepatech Megafuge 2.0 R*; Heraeus GmbH, Hanau
- Zentrifuge *Sorvall RC5C mit GSA-Rotor*; Sorvall, Bad Homburg v. d. Höhe

7.1.3. Kits

- ABI Prism BigDye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit; Applied Biosystems, Foster City, USA
- *DNA Clean and Concentrator-5-Kit*; Zymo Research, Orange, USA
- *Lipofectamine LTX and PLUS Reagents*; Invitrogen GmbH, Karlsruhe
- NucleoBond Xtra Midi; Macherey-Nagel GmbH & Co. KG, Düren
- NucleoSEQ-Kit; Macherey-Nagel GmbH & Co. KG, Düren
- NucleoSpin RNA II; Macherey-Nagel GmbH & Co. KG, Düren
- OneStep RT-PCR Kit; Qiagen GmbH, Hilden
- pJET1.2/blunt cloning Kit; Fermentas GmbH, St. Leon-Rot
- Zymoclean Gel DNA Recovery Kit; Zymo Research, Orange, USA
- Zyppy Plasmid Miniprep Kit; Zymo Research, Orange, USA

7.1.4. Zellen

- *E. coli*, *XL1-blue*; Stratagene, heute Agilent Technologies, Waldbronn
- *E. coli*, BL21(DE3); Novagen, Merck KGaA, Darmstadt
- *P. pastoris*, GS115; Invitrogen GmbH, Karlsruhe
- *P. pastoris*, KM71; Invitrogen GmbH, Karlsruhe
- LIM1215; (CellBank Australia-Nr. CBA-0161), CellBank Australia, Westmead, AU
- CT26; (ATTC-Nr. CRL-2638), ATTC, Manassas, USA
- F9; (DSMZ-Nr. ACC-112), DSMZ, Braunschweig
- AtT-20; (ATTC-Nr. CCL-89), ATTC, Manassas, USA

7.1.5. Enzyme

- BigDye Polymerase; Applied Biosystems, Foster City, USA
- Phusion Polymerase; Thermo Scientific, Finnzymes, Vantaa, Finnland
- Qiagen OneStep RT-PCR Enzyme Mix; Qiagen GmbH, Hilden
- Restriktionsenzyme und Puffer; Fermentas GmbH, St. Leon-Rot und New England BioLabs, Ipswich, UK
- T4 DNA ligase; Fermentas GmbH, St. Leon-Rot

7.1.6. Antikörper

- Polyklonaler Kaninchenantikörper gegen CDy; BioGenes, Berlin (Auftragsleistung)
- Polyklonaler Eselantikörper gegen GFP, *horseradish peroxidase* (HRP)+; Rockland, Gilbertsville, USA
- Monoklonaler Mausantikörper gegen His-Tag; Qiagen GmbH, Hilden
- Monoklonaler Rattenantikörper gegen Glykoprotein A33 (MAB3080)¹
- Polyklonales Ziegen-F(ab')₂-fragment gegen Ratten -IgG, Phycoerythrin+ (F0195B)¹
- Polyklonaler Ziegenantikörper gegen Glykoprotein A33 (AF3080)¹
- Polyklonaler Kaninchenantikörper gegen Ziegen-Ig, HRP+ (P0449); Dako, Hamburg
- Polyklonaler Kaninchenantikörper gegen Maus-Ig, HRP+ (P0260); Dako, Hamburg
- Polyklonaler Ziegenantikörper gegen Kaninchen-Ig, HRP+ (P0448); Dako, Hamburg

7.1.7. Primer

Alle folgenden Primer wurden von Metabion international AG (Martinsried) generiert.

- 3'-AOX1-Primer; 5'-GCA AAT GGC ATT CTG ACA TCC-3'
- 5'-AOX1-Primer; 5'-GAC TGG TCC CAA TTG ACA AGC-3'
- 5'- α -Faktor-Primer; 5'-TAC TAT TGC CAG CAT TGC TGC-3'
- 5'-T7-Primer; 5'-TAA TAC GAC TCA CTA TAG GG-3'
- 3'-BGH-Primer; 5'-TAG AAG GCA CAG TCG AGG-3'
- 5'-Fibro Exon 24 forw; 5'-ACT GGC TAC AGA ATA ACT AC-3'
- 5'-Fibro Exon forw; 5'-TGT GGA CTC CTC AGT AGG AT-3'
- 5'-Fibro Exon 26-rev; 5'-TTA GGA CCA CGG CAT TGT CT-3'
- 3'-CDy rev NotI; 5'-TTT GCG GCC TCA CCA ATA TCT TCA AAC CAA TC-3'
- 5'-EcoRI-HisTag-CDy forw;
5'-GAA TTC CAC CAT CAT CAC CAT CAT GTG ACA GGG GGA ATG GCA-3'
- 5'-gpA33-IgG-Nr.2; 5'-AGT TCT GCA ACA TCA CGG TG-3'
- 5'-gpA33full*T-eGFP cloning forw;
5'-ACC TCG ACC GGA TCC ACG CCA CCA TGG TGA GC-3'
- 5'-humaner β -Aktin-Primer for; 5'-CTG GGA CGA CAT GGA GAA AA-3'
- 5'-humaner β -Aktin-Primer rev; 5'-AAG GAA GGC TGG AAG AGT GC-3'
- 5'-muriner β -Aktin-Primer for; 5'-ATA TCG CTG CGC TGG TCG TC-3'
- 5'-muriner β -Aktin-Primer rev; 5'-AGG ATG GCG TGA GGG AGA GC-3'
- 5'-mgpA33 for P2; 5'-GAA CCG TTA TGA GAA TCG AGT G-3'

¹R&D Systems, Wiesbaden

- 3'-mgpA33 rev P2; 5'-GAT CTT TGT CAT CCT TTT CC-3'
- 5'-hgpA33 for;P2 5'-TGA GCT TTA TAA GAA TCG CGT C-3'
- 3'-hgpA33 rev P2+; 5'-AAT TAT GGT CTC TCC CTC G-3'

7.1.8. Vektoren

- pPICZ α ; Invitrogen GmbH, Karlsruhe
- pPIC9K; Invitrogen GmbH, Karlsruhe
- pJET1.2/blunt; Fermentas GmbH, St. Leon-Rot
- pcDNA6 B; Invitrogen GmbH, Karlsruhe
- pQE-12; Qiagen GmbH, Hilden

7.1.9. Kulturmedien

Für die Kultivierung der *P.-pastoris*-Zellen wurden unterschiedliche Kultur- und Expressionsmedien nach dem Handbuch *Pichia Expression Kit Version F* hergestellt. Die mit dem pPICZ α - oder dem pQE-12-Vektor transformierten *E. coli* wurden in Luria Broth-Medium (LB_{low}-Medium, Tab. 7.1, S. 72) beziehungsweise 2YT (Tab. 7.1) kultiviert. Die Kultivierung nativer *P.-pastoris*-Zellen erfolgte in *Yeast extract peptone dextrose*-Medium (YPD-Medium, Tab. 7.1). Die transgenen *P.-pastoris*-wurden in *Buffered-glycerol-complex*-Medium (BMGY-Medium, Tab. 7.2) kultiviert. Für die Proteinexpression wurde *Buffered-methanol-complex*-Medium (BMMY-Medium, Tab. 7.2) verwendet. Beiden Medien wurde Biotin (4 $\mu\text{g/l}$) hinzugesetzt.

Tab. 7.1.: Zusammensetzung des YPD- 2YT- und LB_{low}-Medien/Agar

Reagenz	Medien			Agar	
	LB _{low}	YPD	2YT	LB _{low}	YPDS
Hefeextrakt	5,0 g	10,0 g	10,0 g	5,0 g	10,0 g
Pepton	10,0 g	20,0 g	16,0 g	10,0 g	20,0 g
NaCl	5,0 g	—	5,0 g	5,0 g	—
Glukose	—	20,0 g	—	—	—
Sorbitol	—	—	—	—	182,2 g
Agar	—	—	—	15,0 g	20,0 g
H ₂ O	ad 11	ad 11	ad 11	ad 11	ad 0,9l

Yeast extract peptone sorbitol-Agarplatten (YPDS-Agarplatten, Tab. 7.1) mit 50–150 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Zeocin wurden für die *P.-pastoris*-Selektion eingesetzt. Ein 180-ml-Aliquot des YPDS-Agars wurde in der Mikrowelle durch Erwärmen geschmolzen, unter Rühren abgekühlt und 20 ml einer 20%igen (w/v) Glukoselösung und Zeocin (50–150 $\mu\text{g}/\text{ml}$) hinzugegeben. Für die GS115-Zellen wurden dem YPDS-Agar 0,4 mg/l Histidin zugesetzt.

Tab. 7.2.: Zusammensetzung des BMGY- und BMMY-Mediums

Reagenz	BMGY	BMMY
Hefeextrakt	10,0 g	10,0 g
Pepton	20,0 g	20,0 g
<i>Yeast Nitrogen Base</i>	3,4 g	3,4 g
Glycerol	10,0 g	—
5 %ige Methanollösung	—	100 ml
Ammoniumsulfat	10,0 g	10,0 g
1 M Kaliumphosphatpuffer (pH 6)	100 ml	100 ml
H ₂ O	ad 1 l	ad 1 l

7.1.10. Sonstiges

- 96-Well-Zellkulturplatten mit flachem Boden; Sarstedt, Nümbrecht
- CM5-Sensorchip; Biacore, GE Healthcare, Little Chalfont UK
- DNA-Marker 1-kb-DNA Ladder GibcoBRL; Invitrogen GmbH, Karlsruhe
- Econo Column (8 ml, 1 × 10 cm); Bio-Rad Laboratories GmbH, München
- High performance chemiluminescence Film *Hyperfilm ECL*;
Amersham Biosciences, Little Chalfont, UK
- Immobilized Protein L; Thermo Fisher Scientific / Pierce, Rockford, USA
- Kanülen, 26G × 0,5"; Becton, Dickinson, Franklin Lakes, USA
- Kapillarblutröhrchen mit Li-Heparin-Gel; KABE Labortechnik, Nümbrecht
- Nickel-Nitrioltriessigsäure-Agarose; Qiagen GmbH, Hilden
- Nitrocellulosemembran Hybond *enhanced chemiluminescence*, 0,4 μm ;
Amersham Biosciences, Little Chalfont, UK
- Proteinmarker Page Ruler Prestained Ladder; Fermentas GmbH, St. Leon-Rot
- ThinCert 12-Well-Zellkulturplatte, 3 μm ; Greiner bio-one, Frickenhaus
- U16 Maxisorp NUNC Immuno Modules; Thermo Fisher Scientific, Rockford, USA

7.2. Molekularbiologische Methoden

7.2.1. Restriktionsverdau

Für die Klonierung der Vektoren His-CDy-pPICZ α A und hgpA33-eGFP-pcDNA6 B wurden die Restriktionsenzyme *Eco*RI und *Not*I, beziehungsweise *Not*I und *Bam*HI von New England Biolabs verwendet (Vgl. Anhang). Die Inkubation erfolgte mit den Puffern entsprechend den Empfehlungen des Herstellers, bei 37 °C für 12 h (His-CDy) oder über Nacht (hgpA33-eGFP).

7.2.2. Agarosegelelektrophorese

Für die Agarosegelelektrophorese wurde ein 1%iges Agarosegel mit 0,3 ng/ml Ethidiumbromid hergestellt und die DNA-Proben mit einem Viertel ihres Volumens an DNA-Ladepuffer gemischt. Die Elektrophorese erfolgte horizontal in einer Bio-Rad Minigel-Elektrophoresekammer (30 min, 100 Volt). Zur Herstellung der Agarosegele und als Elektrophoresepuffer wurde TAE-Puffer verwendet.

DNA-Ladepuffer 5 ×: 60 % (w/v) Saccharose, 20 mM EDTA,
0,025 % (v/v) Bromphenolblau.

TAE-Puffer: 1 mM EDTA, 5 mM Natriumacetat, 40 mM Tris, pH 7,2.

7.2.3. DNA-Reinigung und -Gelextraktion

Die Reinigung und Aufkonzentrierung von DNA-Proben erfolgte mit dem *DNA Clean and Concentrator-5*-Kit. Für die DNA-Extraktion aus Agarosegelen wurden die DNA-Fragmente unter UV-Licht aus dem Agarosegel herausgeschnitten und unter Verwendung des *Zymoclean Gel DNA Recovery*-Kits isoliert. Die Reinigung und Extraktion erfolgte jeweils entsprechend den Angaben des Herstellers.

7.2.4. Ligation

Für die Ligasereaktion wurden 0,33 μ l Ligase (Fermentas, 5 U/ μ l) zu einem Gemisch aus dem Insert eGFP oder His-CDy und dem Vektor gpA33*T-pcDNA6 B beziehungsweise pPICZ α A hinzugegeben und bei 14 °C über Nacht inkubiert. Zur Inaktivierung wurde die Probe 10 min bei 65 °C erhitzt.

7.2.5. Herstellung kompetenter Zellen

Die Herstellung kompetenter *E. coli* XL-1-blue-Zellen erfolgte modifiziert nach der Methode von Hanahan und Scott. Hierfür wurden Bakterien aus einem Gefrierstock (-80°C) mit einer Impföse aufgenommen, in 10 ml LB-Medium mit $1\ \mu\text{g}/\text{ml}$ Tetracyclin überführt und über Nacht bei 37°C geschüttelt. Aus der Vorkultur wurde 1 ml in 99 ml frisches LB-Medium mit $1\ \mu\text{g}/\text{ml}$ Tetracyclin überführt und etwa zwei Stunden bei 37°C bis zu einer OD von 0,3–0,4 geschüttelt. 50 ml der Zellsuspension wurden zentrifugiert (10 min, $3000 \times g$, $^{\circ}\text{C}$) und der Überstand verworfen. Die Zellen wurden in 15 ml TFB I-Puffer resuspendiert und für 30 min auf Eis inkubiert. Nach Zentrifugation (5 min, $1000 \times g$, 4°C) wurde der Überstand dekantiert und die Zellen in 2 ml TFB II-Puffer resuspendiert. Je $100\ \mu\text{l}$ Zellsuspension wurden in Gefrieröhrchen aliquotiert und sofort in flüssigem Stickstoff gefroren. Die Lagerung der Zellen erfolgte bei -80°C .

TFB I-Puffer pH 5,8: 30 mM KAc, 50 mM MnCl_2 , 100 mM KCl, 15 % (v/v) Glycerin.

TFB II-Puffer: 10 mM MOPS/NaOH (pH 7), 75 mM CaCl_2 , 10 mM KCl, 15 % (v/v) Glycerin.

7.2.6. *Escherichia-coli*-Transformation

Für die Amplifikation des klonierten His-CDy-pPICZ α A Vektors wurden XL-1-blue-Zellen (*E. coli*) via Hitzeschock transformiert. Die DNA wurde auf die gefrorenen, kompetenten XL-1-blue-Zellen gegeben, für 20 min auf Eis und anschließend für 1 min bei 42°C inkubiert. Nach erneuter Inkubation auf Eis (2 min) wurden $500\ \mu\text{l}$ LB_{low}-Medium hinzugegeben und die Zellen für 1 h bei 37°C aufbewahrt. Im Anschluss an die Zentrifugation (2 min, $1000 \times g$) wurde das Zellpellet in $100\ \mu\text{l}$ Medium resuspendiert und die Zellen auf eine LB_{low}-Agarplatte mit $25\ \mu\text{g}/\text{ml}$ Zeocin ausgestrichen und bei 37°C über Nacht inkubiert.

7.2.7. Plasmidisolation

Für die Plasmidisolation wurde jeweils eine *E.-coli*-Kolonie von der LB_{low}-Agarplatte in 5 ml LB_{low}-Medium mit $25\ \mu\text{g}/\text{ml}$ Zeocin aufgenommen und bei 37°C für 8 h schüttelnd inkubiert. Die Zellen wurden durch Zentrifugation ($2 \times 2\ \text{ml}$, $10\ 000 \times g$, 1 min) pelletiert. Der Überstand wurde verworfen, das Bakterienpellet in $600\ \mu\text{l}$ H_2O resuspendiert und die Plasmid-DNA mit dem *Zyppy Plasmid Miniprep*-Kit entsprechend der Anleitung isoliert. Für die Herstellung größerer DNA-Mengen, die für die Transfektion von Hefen benötigt werden, wurden Bakterienübernachtskulturen (200 ml LB_{low}-Medium mit $25\ \mu\text{g}/\text{ml}$ Zeocin) angesetzt, die Bakterien am Folgetag wie oben pelletiert und die DNA mit dem *NucleoBond*

Xtra Midi-Kit nach Angaben des *low copy*-Protokolls isoliert.

7.2.8. RNA-Isolation

Für die RNA-Isolation wurden mindestens zwei 10-cm-Zellkulturschalen der jeweiligen Zelllinie verwendet. Das Zellkulturmedium wurde abgenommen, die adhärennten Zellen mit Dulbecco's *Phosphate buffered Saline* (PBS) gewaschen und anschließend mit jeweils 1 ml PBS mit 2,3 mM EDTA unter Zuhilfenahme eines Zellspatels abgelöst. Die Zellen wurden nach Überführung in 2-ml-Reaktionsgefäße pelletiert ($1000 \times g$, 30 s) und die RNA nach Angaben des NucleoSpin RNA II-Kits isoliert.

Dulbecco's PBS ($-\text{Ca}^{2+}$, $-\text{Mg}^{2+}$): 2,7 mM KCl, 1,5 mM KH_2PO_4 , 138 mM NaCl, 2 mM Na_2HPO_4 .

7.2.9. Polymerasekettenreaktion

Für die *polymerase chain reaction* (PCR), die reverse Transkriptase-PCR (RT-PCR) und die Sequenzier-PCR wurden die Phusion Polymerase, der Qiagen OneStep RT-PCR Enzyme Mix beziehungsweise die Big Dye Polymerase mit folgenden Programmen verwendet.

Tab. 7.3.: PCR-Programme

Programmschritte	allgemeine PCR	RT-PCR	Sequenzier-PCR
Vorinkubation	—	50 °C, 30 min	—
Denaturierung	98 °C, 30 s	95 °C, 15 min	96 °C, 60 s
.....
<i>Zyklen</i>	30–35	30	25
Denaturierung	98 °C, 10 s	95 °C, 30 s	96 °C, 20 s
Primeranlagerung	55 °C, 30 s	50 °C, 30 s	62 °C, 30 s
Elongation	72 °C, 30 s	72 °C, 1 min	60 °C, 4 min
.....
Termination	72 °C, 10 min	72 °C, 10 min	—

7.2.9.1. Reverse Transkriptase-Polymerasekettenreaktion

Zur RNA-Analyse wurde eine PCR mit der isolierten Gesamt-RNA (7.2.8 und spezifischen Primern durchgeführt (Tab. 7.4). Hierfür wurden das OneStep RT-PCR-Kit verwendet.

Tab. 7.4.: Zusammensetzung des RT-PCR-Ansatzes

Reagenz	Volumen in μl
RNA (500 ng)	0,5–1,0
β -Aktin-Primer for ¹	1,2
β -Aktin-Primer rev ¹	1,0
gpA33 for P2 ¹	1,0
gpA33 rev P2 ¹	1,0
Enzym Mix ²	1,0
Reaktionspuffer ²	5,0
H ₂ O	ad 20,0

¹ humane oder murine Primer, je nach RNA

² Qiagen

7.2.9.2. Sequenzierung der klonierten Vektoren

Zur Kontrolle der klonierten Vektoren wurden PCRs mit vektorspezifischen Primern durchgeführt. Für die Sequenzierung des pPICZ α -Vektors wurden die Primer 3'-AOX1-Primer, 5'-AOX1-Primer und der 5'- α -Faktor-Primer verwendet. Die Sequenzierung des pcDNA6-Vektors erfolgte mit den Primern BGH und T7. Hierfür wurden 1 μl Big-Dye-Polymerase und 1,5 μl des Big-Dye-Puffers für einen 10 μl Gesamtansatz mit 200 ng DNA verwendet. Die in der Sequenzier-PCR gewonnenen Amplifikate wurden mit dem NucleoSEQ-Kit gereinigt, in 25 μl Formamid aufgenommen, für 3 min bei 96 °C gekocht und anschließend im *ABI Prism 310* (Perkin Elmer) analysiert.

7.2.10. DNA-Polyacrylamidgelelektrophorese

Die DNA-Polyacrylamidgelelektrophorese wurde für die Größenauftrennung von RT-PCR-DNA-Fragmenten verwendet. Die Proben wurden hierfür mit dem fünffach konzentrierten DNA-Probenpuffer versetzt und in der vertikalen Gelelektrophorese in einem 4,5 %igen Polyacrylamidgel aufgetrennt (Tab. 7.5). Die Auftrennung erfolgte für eine Stunde (20 mA konstant).

DNA-Probenpuffer (5 \times): 0,1 M Tris/HCl (pH 6,8), 8 % (w/v) SDS,
40 % (w/v) Glycerin, 0,4 mg/ml Bromphenolblau,
0,4 mg/ml Pyronin G

TBE-Puffer (5 \times): 0,45 mM Tris, 0,45 M H₃BO₃, 10 mM EDTA

Tab. 7.5.: Zusammensetzung eines DNA-Polyacrylamidgels

Reagenz	Volumen in μl
H ₂ O	3219
TBE-Puffer (5 \times)	1000
30 % (w/v) Acrylamid ¹	746
10 % (w/v) Ammoniumperoxodisulfat	35
Tetramethylethyldiamin	10

¹ Acrylamid und Bisacrylamid im Verhältnis 37,5:1

7.2.11. *Pichia-pastoris*-Transfektion

Lithiumchlorid-Transfektion

Für die *P.-pastoris*-Transfektion wurde der Vektor His-CDy-pPICZ α A in einem Restriktionsverdau mit *MssI* bei 37 °C linearisiert. *P.-pastoris*-Zellen wurden zunächst in YPD-Medium angezogen, bis eine optische Dichte von 0,8–1 bei 600 nm (OD₆₀₀) erreicht wurde. Die Zellen wurden in 50-ml-Fractionen aufgeteilt, zentrifugiert (2700 \times g, 15 min) in 1 ml LiCl-Lösung (100 mM) resuspendiert und in ein 1,5-ml-Reaktionsgefäß überführt. Nach Zentrifugation (1500 \times g, 1 min) wurden die Zellen in 400 μl 100-mM-LiCl-Lösung resuspendiert und 50- μl -Portionen in neue Reaktionsgefäße überführt. Erst direkt vor der Transfektion wurden die Zellen erneut zentrifugiert und das Pellet mit folgenden Lösungen überschichtet.

- 240 μl 50%iges (w/v) Polyethylenglycol 3350 in H₂O (sterilfiltriert)
- 36 μl LiCl-Lösung (1 M)
- 25 μl Heringssperma-DNA (2 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$)
- 50 μl Vektor-DNA (0,1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$)

Das Zellpellet wurde durch starkes, andauerndes Schütteln gelöst und das Gemisch bei 30 °C für 30 min inkubiert. Es folgte ein Hitzeschock für 50 min bei 42 °C. Nach Zentrifugation (1500 \times g, 1 min) wurden die Zellen in 1 ml YPD-Medium aufgenommen, bei 30 °C inkubiert und anschließend auf YPDS-Agarplatten mit 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Zeocin ausgestrichen (Medien s. 7.1.9).

7.3. Proteinbiochemische Methoden

7.3.1. AntiA33-CDy-, L19CDy-His- und His-CDy-Expression

Für die Proteinexpression wurde ein Klon von der YPDS-Platte in 5 ml YPD-Medium (Medien s. 7.1.9) mit 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Zeocin aufgenommen und über Nacht bei 30 °C schüttelnd inkubiert. Am Folgetag wurde 1 ml dieser Vorkultur in 400 ml BMGY-Medium überführt und 24 h schüttelnd bei 30 °C inkubiert. Die Zellen wurden durch Zentrifugation (2700 \times g, 15 min, 4 °C) pelletiert und in 400 ml BMMY-Medium resuspendiert. In diesem methanolhaltigen Medium erfolgte die dreitägige Proteinexpression. Im Abstand von 24 h wurde jeweils 1 Volumenprozent Methanol hinzugegeben. Die Expression wurde durch Zentrifugation (27 490 \times g, 15 min, 4 °C) beendet und eine Proteinfällung durch Zugabe von 50 % (w/v) Ammoniumsulfat (unter Rühren bei 4 °C) durchgeführt. Durch Zentrifugation (27 490 \times g, 20 min, 4 °C) wurden die Proteine pelletiert, der Überstand verworfen und das Pellet in etwa 5 ml PBS resuspendiert. Die Dialyse dieser Ammoniumsulfatfällung erfolgte gegen PBS über Nacht bei 4 °C. Nach Zentrifugation (70 409 \times g, 30 min, 4 °C) wurde der Überstand für die Proteinaufreinigung verwendet (7.3.3).

PBS: 150 mM NaCl, 1,67 mM KH_2PO_4 , 8,33 mM Na_2HPO_4

7.3.2. Expression der Proteindomäne in *Escherichia coli*

Für die Expression der Proteindomäne ED-B wurden tiefgefrorene, pQE-12-ED-B-transfizierte *E.-coli*-Zellen aufgetaut und 20 μl davon in 20 ml 2YT-Medium (Medien s. 7.1.9) mit 1 % Glukose und 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Ampicillin überführt und bei 37 °C über Nacht geschüttelt. Die Zellen wurden zentrifugiert (2700 \times g, 5 min), in 400 ml 2YT mit 0,1 % Glukose aufgenommen und schüttelnd bei 37 °C inkubiert. Nach Erreichen einer OD_{600} von 0,5 wurde die Proteinexpression mit 1 mM Isopropylthiogalactopyranosid induziert. Die Zellen wurden nach 3–5 h Schüttelinkubation bei 37 °C durch Zentrifugation (5000 \times g, 15 min, 4 °C) pelletiert und in 10 mM Imidazol-PBS auf Eis resuspendiert. Der Zellaufschluss erfolgte auf Eis mittels Ultraschall am Branson *Sonifier 250* (fünf Zyklen mit je 20 Impulsen). Nach Zentrifugation des Bakterienlysats (20 000 \times g, 20 min, 4 °C) wurde das exprimierte Protein aus dem Überstand in der Affinitätschromatographie (7.3.3) aufgereinigt.

7.3.3. Proteinaufreinigung durch Affinitätschromatographie

In dieser Arbeit wurden die Nickel-Nitrilotriessigsäure-(Ni-NTA)- und die Protein L-Affinitätschromatographie durchgeführt.

7.3.3.1. Nickel-Nitrilotriessigsäure-Affinitätschromatographie

Für die Ni-NTA-Affinitätschromatographie wurden die dialysierte Ammoniumsulfatfällung (His-CDy und L19CDy-His) oder das Bakterienlysate (ED-B) mit 20 mM Imidazol-PBS im Verhältnis 1:1 gemischt. Das Säulenmaterial wurde mit 10 mM Imidazol-PBS äquilibriert und die Protein-Imidazol-Lösung auf die Säule gegeben. Der erste Waschschrift erfolgte für alle Proteine mit 20 mM Imidazol-PBS. Für den zweiten Waschschrift wurden 60 mM Imidazol-PBS für His-CDy und L19CDy-His sowie 75 mM für ED-B verwendet. Die Elution erfolgte mit 150 mM Imidazol-PBS für L19CDy-His und CDy-His und 200 mM für ED-B. Während der Aufreinigung wurden von jeder Fraktion Proben für die spätere Analyse genommen und bei 4 °C gelagert.

7.3.3.2. Protein L-Affinitätschromatographie

Die Aufreinigung von antiA33-CDy erfolgte mit der Protein L-Affinitätschromatographie, bei der die Proteinaufreinigung durch Bindung an die κ -Kette von Immunglobulinen ermöglicht wird. Die dialysierte Ammoniumsulfatfällung wurde 1:1 mit PBS gemischt und auf die mit PBS äquilibrierte Protein L-Säule gegeben. Die Säule wurde mit 200 ml PBS gewaschen und antiA33-CDy mit 2 ml H₂O gefolgt von 5 ml MgCl₂ (2,5 M, pH 7) und 1 ml H₂O eluiert. Das Eluat wurde gegen PBS dialysiert (4 °C). Von jeder Fraktion wurden Proben abgenommen und bei 4 °C bis zur Analyse gelagert.

7.3.4. SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese

Die Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) wurde für die Größenauftrennung von Proteinen verwendet. Die Proben wurden hierfür mit einem reduzierenden Protein-Probenpuffer versetzt.

Für die Kontrolle der Expression und Aufreinigung von ED-B und His-CDy wurden Polyacrylamidgele mit einem 12 %igen Trenn- und 4,5 %igen Sammelgel hergestellt. Aufgrund der Größenunterschiede wurde für antiA33-CDy und L19CDy-His ein 10 %iges Trenngel verwendet. Die Proben wurden zunächst mit einem vierfach konzentrierten Probenpuffer gemischt, für 5 min bei 96 °C denaturiert und anschließend sofort in der SDS-PAGE (40 mA, max. 200 Volt) innerhalb 1 h aufgetrennt.

Protein-Probenpuffer:	0,25 M Tris, 8 % (w/v) SDS, 40 % (v/v) Glycerol, 0,04 % (w/v) Bromphenolblau, 8 % (v/v) 2-Mercaptoethanol.
SDS-PAGE-Laufpuffer:	192 mM Glycin, 20 mM Tris, 0,1 % (w/v) SDS.
Trenngelpuffer:	1,5 M Tris, 0,4 % (w/v) SDS, pH 8,8.
Sammelgelpuffer:	0,5 M Tris, 0,4 % (w/v) SDS, pH 6,8.

Tab. 7.6.: Zusammensetzung verschiedener SDS-Polyacrylamidgele

Reagenz	Trenngel		Sammelgel
	(10 %ig)	(12 %ig)	(4,5 %ig)
	Volumen in μl		
H ₂ O	1416	1190	800
Trenngelpuffer	850	850	—
Sammelgelpuffer	—	—	333
30 % (w/v) Acrylamid ¹	1134	1360	200
10 % (w/v) Ammoniumperoxodisulfat	30	30	10
Tetramethylethylendiamin	3	3	3

¹ Acrylamid und Bisacrylamid im Verhältnis 37,5:1

7.3.5. Westernblot

Für den Westernblot wurden die Proteine im Anschluss an die SDS-PAGE in einem *Semi-Dry*-Elektroblot auf eine Nitrocellulosemembran transferiert. Für zwei 54-cm²-Membranen wurde der Blot bei 240 mA für 20 min durchgeführt.

Semi-Dry-Blotpuffer: 48 mM Tris, 39 mM Glycin.

7.3.6. Immunodetektion

Die Immunodetektion der Proteine erfolgte nach der Blockierung der Nitrocellulosemembran mit 3 % (w/v) Magermilch mit primären, proteinspezifischen Antikörpern. Diese primären Antikörper wurden nach 1 h durch dreimaliges Waschen mit *Phosphate buffered Saline Brij 58* (PBSB₂) entfernt. Daraufhin wurde die Membran mit den jeweiligen sekundären, Peroxidase gekoppelten Antikörpern (abhängig vom Primäantikörper) für 30 min inkubiert. Nach erneutem dreimaligen Waschen mit PBSB_{0,2} wurde die Membran mit einer frisch hergestellten *enhanced Chemiluminescence*-Lösung (ECL) für 1 min inkubiert. Nach kurzem

Abtrocknen der Membran mit Filterpapier wurde die durch die enzymatische Reaktion entstehende Lumineszenz für die Belichtung eines *High Performance Chemiluminescence* Films (7.1.10, S. 73) genutzt.

- PBSB_{0,2}:** 150 mM NaCl, 1,67 mM KH₂PO₄, 8,33 mM Na₂HPO₄,
0,2 % (w/v) Brij 58
- Lösung A:** 0,25 mg/ml Luminol in 0,1 M Tris-HCl (pH 8,6).
- Lösung B:** 1,1 µg/ml para-Coumarinsäure in Dimethylsulfoxid.
- ECL-Lösung:** 100 µl Lösung A, 1 ml Lösung B, 1 µl 30 % (v/v) Wasserstoffperoxid.

Tab. 7.7.: Immunodetektion verschiedener Proteine

Protein	primärer Antikörper	sekundärer Antikörper
AntiA33-CDy,	Kaninchenantikörper gegen CDy ¹ (0,02 µg/ml)	Ziegenantikörper gegen Kaninchen-IgG ² (0,33 µg/ml)
.....
His-CDy, L19CDy-His	Mausantikörper gegen His-tag ² (1 µg/ml)	Kaninchenantikörper gegen Maus-Ig ² (0,33 µg/ml)
.....
Glykoprotein A33 (gpA33)	Ziegenantikörper gegen gpA33 ³ (0,25 µg/µl)	Kaninchenantikörper gegen Ziegen-IgG ² (0,33 µg/ml)

¹ BioGenes, Berlin

² Dako, Hamburg

³ R&D Systems, Wiesbaden

7.3.7. Präparation von Membranproteinen

Für die Präparation von Membranproteinen wurden jeweils drei konfluent bewachsene 10-cm-Kulturschalen der Zelllinien LIM1215, CT26 und dessen Transfektanten CT26-hgpA33-eGFP und CT26-eGFP verwendet. Die adhärennten Zellen wurden mit PBS gewaschen und die Kulturschalen auf Eis gelagert. Zum Ablösen der Zellen wurde 1 ml 0,1 × PBS auf der Schale verteilt und die Zellen nach 10-minütiger Inkubation auf Eis mit einem Zellschaber abgelöst und in das Pottergefäß überführt. Die Zellen aller drei Schalen wurden gemeinsam auf Eis durch Auf- und Abbewegen homogenisiert. Hierbei wurde das Potterfäß 15-mal auf- und abbewegt, eine kurze Pause auf Eis eingelegt und dieser Vorgang noch

zweimal wiederholt. Die Schalen wurden jeweils mit 1 ml PBS ausgespült und diese Spüllösung zusätzlich in das Pottergefäß überführt. Es folgte eine weitere Homogenisierung durch Auf- und Abbewegen (3×15 , wie oben beschrieben). Das Homogenat wurde in ein 15-ml-Zentrifugationsröhrchen überführt, das Pottergefäß mit weiteren 2 ml PBS ausgespült und mit dem Homogenat vereint. Nach Zentrifugation ($500 \times g$, 15 min, 4°C) wurde der Überstand in ein neues Zentrifugationsröhrchen überführt und erneut zentrifugiert ($2600 \times g$, 15 min, 4°C). Der Überstand wurde nun in Ultrazentrifugenröhrchen überführt und die Membranproteine durch Zentrifugation ($100\,000 \times g$, 35 min, 4°C) pelletiert. Die cytosolische Fraktion wurde aufbewahrt und das Proteinpellet in 1 ml PBS mit Proteaseinhibitor (Complete mit EDTA, Roche) resuspendiert und zentrifugiert ($20\,000 \times g$, 15 min, 4°C). Hierfür wurde eine Stammlösung des Proteaseinhibitors (25-fach konzentriert, in PBS) verwendet. Nach Abpipettieren des Überstandes wurde das Pellet in $300 \mu\text{l}$ PBS mit Proteaseinhibitor resuspendiert. Für die Proteinbestimmung wurden sowohl die cytosolische, als auch die Membran-Fraktion verdünnt eingesetzt.

Proteaseinhibitor ($25 \times g$): 1 Tablette in 2 ml PBS gelöst.

7.3.8. Proteinquantifizierung

Die Quantifizierung der Proteinmenge erfolgte mit dem Pierce BCA Protein Assay Kit der Firma Thermo Scientific. Das Nachweisreagenz wurde nach den Angaben des Herstellers für jeden Assay unmittelbar vor der Verwendung frisch angesetzt. Jeweils $10 \mu\text{l}$ der zu untersuchenden Probe oder des Proteinstandards wurden mit $200 \mu\text{l}$ Nachweisreagenz in NUNC Immuno Modules gemischt und für 30 min bei 37°C inkubiert. Die Absorption wurde bei 562 nm ermittelt. Die Proteinkonzentration wurde mit Hilfe einer Kalibriergeraden berechnet, die aus der Messung von BSA-Konzentrationsstandards für jede Messung jeweils neu erstellt wurde.

7.3.9. Enzym gekoppelte Immunadsorptionsassay

Der ELISA wurde zum Nachweis der Bindungsaffinität der Fusionsproteine L19CDy-His und antiA33-CDy zur ED-B beziehungsweise zum humanen Glykoprotein A33 (hgpA33) durchgeführt.

7.3.9.1. Enzym gekoppelte Immunadsorptionsassay mit L19CDy-His

Für den ELISA mit L19CDy-His wurden je *Well* 50 ng Protein in PBS über Nacht in NUNC Immuno Modules immobilisiert (4°C). Hierfür wurden ED-B und Kontrollproteine wie der

epidermale Wachstumsfaktor (EGF), die N-Glykosidase Saporin, das humane Fibronectin, *Bovine serum albumin* (BSA) oder Blockierlösung verwendet. Nach etwa 16 h wurde die Proteinlösung entfernt und die *Wells* mit 200 μ l Blockierlösung für 1 h inkubiert. Daraufhin wurde L19CDy-His in verschiedenen Mengen (0,5–5 pmol/*Well*) zugegeben und die Platte 1 h schüttelnd inkubiert. Das Fusionsprotein wurde durch Pipettieren entfernt, die *Wells* mit Waschpuffer mittels Waschkamm dreimal gewaschen und für 5 min mit Waschpuffer schüttelnd inkubiert. Der Waschschrift wurde zwei Mal wiederholt und der Waschpuffer durch Abtropfen auf einem Papiertuch entfernt. Im Anschluss daran wurden ein primärer, polyklonaler Kaninchenantikörper, der spezifisch CDy bindet (0,02 μ g/ml, 1 h) und ein sekundärer, Peroxidase gekoppelter Ziegenantikörper (0,33 μ g/ml, 30 min) eingesetzt, wobei zwischen den Antikörperinkubationen die oben beschriebene Waschprozedur durchgeführt wurde. Der Nachweis der L19CDy-His-Bindung an ED-B erfolgte durch Inkubation der *Wells* mit 100 μ l TMB-Lösung. Die Farbreaktion wurde durch Zugabe von 50 μ l 2 M H₂SO₄ gestoppt und die Absorption bei 450 und 490 nm gemessen. Die zur Auswertung herangezogenen Absorptionswerte wurden aus der Differenz beider Werte gebildet.

Blockierlösung: 3% BSA, 10% fetales Kälberserum (FKS) in Dulbecco's PBS.

Waschpuffer: PBS mit 0,05% (v/v) Tween 20.

TMB-Lösung: 40 mM Zitronensäure (pH 3,95), 0,01% (v/v) H₂O₂
0,2 g/l 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin

7.3.9.2. *Enzyme-linked immunosorbent assay* mit murinem Plasma

Für den Nachweis muriner Antikörper, die gegen antiA33-CDy gerichtet sind, wurden jeweils 3 μ g/ml antiA33-CDy, His-CDy, antiA33-eGFP oder Fibronectin immobilisiert. Die Immobilisation und Blockierung erfolgte wie unter 7.3.9.1 beschrieben. Es wurden verschiedene Verdünnungen des murinen Plasmas (1:100, 1:200, 1:500 und 1:1000) antiA33-CDy-immunisierte BALB/c-Mäuse hergestellt und jeweils 50 μ l mit den immobilisierten Proteinen für 1 h inkubiert. Im Anschluss an die Waschprozedur (7.3.9.1) wurde der polyklonale, Peroxidase gekoppelte Kaninchenantikörper (1,3 ng/ μ l, 30 min) hinzugegeben. Die *Wells* wurden erneut der Waschprozedur unterzogen. Der Nachweis muriner Antikörper erfolgte mit dem TMB-Reagenz wie in Abschnitt 7.3.9.1 beschrieben.

7.3.10. Oberflächenplasmonresonanz-Analyse

Die Oberflächenplasmonresonanz-Analyse wurde am Biacore X durchgeführt, um die Bindungsaffinität von L19CDy-His an ED-B zu bestimmen. Hierfür wurde ein *Sensor chip*

CM5 mit 1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimid und N-Hydroxysuccinimid aktiviert. Für die Kopplung wurden $5\ \mu\text{M}$ ED-B in 10 mM Natriumacetatpuffer ($100\ \mu\text{l}$, pH 4,5) mit dem Chip inkubiert. Durch Zugabe von 1 M Ethanolamin (pH 8,5) wurde die Kopplung terminiert. Nach Auswaschung des ungebundenen ED-B wurden verschiedene L19CDy-His-Konzentrationen (25–600 nM in PBS mit 0,01 % Tween 20) unter gleichmäßigem Fluss ($30\ \mu\text{l}/\text{min}$) und mit einer Zeitverzögerung von 180 s nach L19CDy-His-Injektion untersucht. Die 100-nM-Verdünnung wurde in allen drei, voneinander unabhängig durchgeführten Analysen doppelt gemessen. Die Assoziations- und Dissoziationsratenkonstanten, sowie die Dissoziationsgleichgewichtskonstante (KD) wurden für jede Messung separat bestimmt. Die Berechnung erfolgte mit der BIAevaluation Software Version 4.1 unter der Anwendung eines 1:1 Bindungsmodell nach Langmuir [88].

7.3.11. Bestimmung der Enzymaktivität

Die Bestimmung der Enzymaktivität erfolgte für die Proteine antiA33-CDy (100 nM), His-CDy und L19CDy-His (jeweils 200 nM). Die enzymatische Umsetzung von 5-FC in 5-FU durch CDy führte zu einem Anstieg der Absorption bei 255 nm. Für den Aktivitätsassay wurden 0,75 ml einer 100 nM antiA33-CDy-Lösung und jeweils eine 200 nM-Lösung von His-CDy und L19CDy-His in PBS hergestellt und die Reaktion durch 5-FC-Zugabe ($250\ \mu\text{l}$, 12 mM) begonnen. Sofort nach 5-FC-Zugabe wurden $50\ \mu\text{l}$ entnommen und in $950\ \mu\text{l}$ 0,1 mM HCl verdünnt, um die Reaktion zu stoppen. Diese Lösung wurde als *Blank* für die folgenden Messungen verwendet. Alle 3 min wurden fortlaufend jeweils $50\ \mu\text{l}$ entnommen und die Reaktion abgestoppt, um die Kinetik der enzymatischen Reaktion zu bestimmen. Die Absorptionswerte (A) wurden gegen die Zeit (t) aufgetragen und die Regressionsgerade ermittelt. Die Steigung der Gerade ist ein Maß für die Reaktionsgeschwindigkeit und wurde für den Vergleich verschiedener Messungen herangezogen.

7.3.11.1. L19CDy-His-Aktivität nach Plasmainkubation

Die enzymatische Aktivität von L19CDy-His nach Inkubation im humanen Plasma wurde untersucht, um dessen Einsatzmöglichkeit *in vivo* zu bewerten. Hierfür wurde humanes Plasma durch Zentrifugation einer frischen Blutspende in einem Plasmaröhrchen mit Lithium-Heparin gewonnen ($4\ ^\circ\text{C}$, 5 min, $2000 \times g$). Für den Assay wurde 1 ml einer $1\ \mu\text{M}$ antiA33-CDy-Plasmalösung hergestellt und über 72 h bei $37\ ^\circ\text{C}$ gelagert. Direkt nach Herstellung dieses Inkubationsansatzes wurden $100\ \mu\text{l}$ entnommen und ein Enzymaktivitätsassay (7.3.11) durchgeführt, jedoch wurden versuchsbedingt nur 100 nM L19CDy-His verwendet. Die Aktivität wurde nach 6, 12, 24, 48 und 72 h erneut bestimmt, wobei insgesamt drei verschiedene

Chargen der Proteinaufreinigungen von L19CDy-His getestet wurden. Die Reaktionsgeschwindigkeit wurde zum Zeitpunkt 0 h als Referenzwert 100 % gesetzt und mit den anderen Werten für die jeweiligen Zeitpunkte verglichen.

7.3.11.2. antiA33-CDy-Aktivität nach Plasmainkubation

Die Bestimmung der enzymatischen Aktivität von antiA33-CDy nach Inkubation mit murinem Plasma erfolgte, um den Einfluss der im Plasma immunisierter Mäuse enthaltenden Antikörper zu bewerten. Hierfür wurde antiA33-CDy mit dem murinen Plasma für 30 min bei 37 °C vorinkubiert und anschließend die Reaktion durch Zugabe von 5-FC gestartet (7.3.11). Es wurden nach 5, 10, 15, 20, 25, 30 und 35 min jeweils 4 μ l des Reaktionsansatzes abgenommen und in 16 μ l 0,1 M HCl abgestoppt. Die Absorptionswerte wurden am Nanodrop bei 255 nm gemessen, die Werte gegen die Zeit aufgetragen und die Steigungen der Regressionsgeraden ermittelt. Die berechnete Steigung aus der antiA33-CDy-Probe, die nur mit PBS inkubiert wurde, diente als Referenzwert, auf dessen Grundlage die prozentuale Enzymaktivität der Proben mit Plasmainkubationen bestimmt wurde.

7.4. Zellbiologische Methoden

7.4.1. Kultivierung muriner und humaner Zellen

Die Kultivierung der murinen und humanen Zellen erfolgte unter sterilen und konstanten Bedingungen (37 °C, 5% CO₂) in 10-cm-Kulturschalen. Für die humanen LIM1215-Zellen, die murinen F9- und CT26-Zellen, sowie deren Transfektanten wurde RPMI verwendet. Die murinen AtT-20 Zellen wurden in DMEM kultiviert, während der gemeinsamen Kultivierung mit F9-Zellen wurde jedoch RPMI verwendet. Die Zellen wurden nach Abnahme des alten Kulturmediums mit sterilem Dulbecco's PBS (ohne Ca²⁺ und Mg²⁺) gewaschen und durch Zugabe von 1 ml Trypsin/10-cm-Kulturschale und 1–2-minütiger Inkubation von der Schale abgelöst. Nach Zugabe von 4 ml Medium wurden die Zellen resuspendiert und 500 μ l in eine neue, mit 10 ml Medium vorbereitete Kulturschale überführt.

RPMI:	RPMI 1640 mit L-Glutamin, 9 % FKS, 100 U/ml Penicillin, 100 U/ml Streptomycin, 250 ng/ml Amphotericin B
DMEM:	Dulbecco's <i>modified eagle medium high glucose</i> (4,5 g/L) mit L-Glutamin, 9 % FKS, 100 U/ml Penicillin, 100 U/ml Streptomycin, 250 ng/ml Amphotericin B
Trypsin-EDTA:	0,25 % (w/v) Trypsin, 1 mM EDTA
EDTA-PBS:	2,3 mM EDTA in Dulbecco's PBS (ohne Ca ²⁺ und Mg ²⁺)

7.4.2. Transfektion muriner Kolonkarzinomzellen

Zur Vorbereitung auf die Transfektion muriner Kolonkarzinomzellen (CT26) wurden die Zellen mit Trypsin vereinzelt und 1×10^5 Zellen/*Well* in eine 6-*Well*-Platte überführt. Die Inkubation erfolgte in RPMI-Medium über Nacht bei 37 °C und 5 % CO₂. 1 µg hgpA33-eGFP-pcDNA6 B-DNA wurde mit 1 µl *Lipofectamine Plus Reagent* und 100 µl Opti-MEM I-Medium für 5 min inkubiert. Daraufhin wurden 1,87 µl *Lipofectamine LTX* hinzugegeben, weitere 45 min inkubiert und das Gemisch anschließend zu den Zellen gegeben. Die Zellvermehrung der Transfektanten erfolgte zunächst in RPMI mit einem Antibiotikazusatz von 30 µg/ml Blastidicin. Für die Selektion der Transfektanten wurden die Zellen in RPMI mit 100 µg/ml Blastidicin kultiviert.

7.4.3. Vorbereitung muriner und humaner Zellen für *In-vitro*-Untersuchungen

Für die *In-vitro*-Untersuchungen der murinen CT26-Zellen und humanen LIM1215 wurden die Zellen mit Dulbecco's PBS gewaschen und mit 5 ml EDTA-PBS (2,3 mM EDTA) für etwa 5 min inkubiert. Hierbei werden die Zellen ebenfalls abgelöst, jedoch bleiben die Transmembranproteine (wie hgpA33) bei dieser Prozedur erhalten. Die Zellen wurden in einer Neubauer Zählkammer gezählt und in Abhängigkeit des nachfolgenden Experimentes in Medium oder PBS aufgenommen.

7.4.4. Durchflusscytometrie

Für die Durchflusscytometrie wurden die humanen LIM1215-, die murinen CT26-Zellen sowie deren Transfektanten (CT26-hgpA33-eGFP und CT26-eGFP), wie in Kapitel 7.4.3 beschrieben, von den Kulturschalen abgelöst. Je 1×10^6 Zellen wurden in 1,5-ml-Reaktionsgefäße überführt, pelletiert (130 × g, 3 min, 4 °C) und anschließend mit 1 ml Blockierlösung (1 % (w/v) BSA in Dulbecco's PBS) blockiert (20 min, 4 °C). Nach Zentrifugation (130 × g, 3 min, 4 °C) wurden die Zellen mit 200 µl des primären Rattenantikörpers gegen hgpA33

(160 ng/ μ l) für 30 min bei 4 °C inkubiert. Als Kontrolle wurde ein weiteres Zellaliquot mit der Isotypkontrolle (Ratten-IgG_{2a}) inkubiert. Im Anschluss daran folgte eine Zentrifugation (130 × g, 3 min, 4 °C), der Überstand wurde verworfen und die Zellen in 0,5 ml Blockierlösung resuspendiert. Dieser Waschschrift wurde dreimal durchgeführt und das Zellpellet anschließend in 200 μ l Ziegen-F(ab')₂-PE in PBS resuspendiert (1,25 μ g/ml). Nach 30-minütiger Inkubation wurden die Zellen wie oben beschrieben gewaschen und für die Messung am Durchflusscytometer in 500 μ l Blockierlösung aufgenommen. Die Messung erfolgte mit dem PE-FITC-Programm, wobei 1×10^4 Zellen analysiert wurden.

7.4.5. Konfokale Fluoreszenzmikroskopie

Die Untersuchung zur Lokalisation des Transmembranproteins hpgA33 wurde am konfokalen *Laser-Scanning*-Mikroskop durchgeführt. LIM1215-Zellen und die CT26-Transfektanten wurden wie in Abschnitt 7.4.3 beschrieben von den Kulturschalen abgelöst und jeweils 2×10^5 LIM1215-Zellen pro Kammer und 1×10^5 CT26-Transfektanten pro Kammer überführt. Die Zellen wurden über Nacht inkubiert (37 °C, 5 % CO₂). Nach Entfernung des Kulturmediums wurden die Zellen mit PBS gewaschen und mit Fixierlösung (4 % Formaldehyd, 0,2 % Glutardialdehyd, 4 mM NaOH) auf dem Objektträger fixiert. Die Fixierlösung wurde nach 20 min entfernt und die Zellen nach Waschen mit PBS blockiert (1 % (w/v) BSA-PBS, 30 min). Die Antikörperinkubation erfolgte wie in Abschnitt 7.4.4 beschrieben, jedoch wurden die Zellen nicht zentrifugiert. Nach dem letzten Waschschrift wurden 500 μ l Dulbecco's PBS auf die Zellen gegeben und diese direkt im inversen Mikroskop betrachtet. Dafür wurden Filter mit 561–593 nm und der Langpassfilter 505 verwendet.

7.4.6. Cytotoxizitätsassays

7.4.6.1. L19CDy-His für die ADEPT *in vitro*

Für die Untersuchung zur cytotoxischen Wirkung der ADEPT mit L19CDy-His wurden $7,5 \times 10^3$ F9- oder 1×10^4 AtT-20-Zellen/*Well* in eine mit Gelatine vorinkubierte 96-*Well*-Zellkulturplatte (7.1.10) gegeben und für 30 h bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert. Für die Therapie wurde das Zellkulturmedium abgenommen und die Zellen mit 100 nM des Fusionsproteins L19CDy-His oder His-CDy für 1 h inkubiert. Es folgten zwei Waschschriffe mit jeweils 150 μ l Medium und die abschließende Inkubation mit verschiedenen 5-FC-Konzentrationen im Medium (je 300 μ l) für 36 h. Zur Kontrolle wurden die Zellen ohne vorherige Inkubation mit L19CDy-His separat mit 5-FU oder 5-FC inkubiert. Die Bestimmung der Zellvitalität erfolgte mit 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid im

so genannten MTT-Assay. Hierfür wurden 100 μl Zellkulturmedium entfernt und 50 μl einer 2 oder 5 mg/ml MTT-PBS-Lösung mit den F9- beziehungsweise AtT-20-Zellen inkubiert (1 h, 37 °C, 5 % CO₂). Der Überstand wurde vorsichtig entfernt und das gebildete Formazan mit 50 μl *formazan solubilizer* gelöst. Die Messung erfolgte bei 570 und 630 nm, wobei der dargestellte Absorptionswert aus der Differenz beider Messungen gebildet wurde. Für die verschiedenen Behandlungen wurden je *Prodrug*- und *Drug*-Konzentration jeweils drei Werte gemittelt und das prozentuale Überleben im Vergleich zum Absorptionsmittelwert unbehandelter Zellen errechnet.

Gelatine-Lösung: 0,1 % (w/v) Gelatine in PBS, autoklaviert

Formazan solubilizier: 50 mM HCl, 1 % (w/v) SDS in Isopropanol

7.4.6.2. AntiA33-CDy für die ADEPT *in vitro*

Für die *In-vitro*-Untersuchungen mit antiA33-CDy und 5-FC wurden die murinen CT26-hgpA33-eGFP- und CT26-eGFP-Zellen verwendet. Die Zellen wurden wie in Abschnitt 7.4.1 beschrieben abgelöst, gezählt und in RPMI-Medium mit 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Blastocidin resuspendiert. Je 5000 Zellen/*Well* wurden in eine mit Gelatine (0,1 % w/v) vorinkubierte 96-*Well* -Zellkulturplatte überführt und über Nacht bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert. Nach Entfernung des Zellkulturüberstandes wurde antiA33-CDy (in 100 μl Medium, 150 nM) für 30 min mit den Zellen inkubiert. Die Proteinlösung wurde entfernt und das ungebundene antiA33-CDy durch Waschen mit Medium (3 \times 100 μl) entfernt. Die Inkubation mit verschiedenen 5-FC-Konzentrationen erfolgte bei 37 °C und 5 % CO₂ für 48 h in 300 μl Medium. Als Kontrollen wurden 5-FC und 5-FU ohne vorherige antiA33-CDy-Inkubation eingesetzt. Zum Nachweis der Zellvitalität wurden 100 μl des Mediums abgenommen und 30 μl einer 5 mg/ml MTT-PBS-Lösung hinzugegeben und der Assay wie in Abschnitt 7.4.6.1 durchgeführt. Das prozentuale Überleben wurde im Vergleich zum Absorptionsmittelwert unbehandelter Zellen errechnet.

7.4.7. Untersuchungen zum *Bystander Effects* der Fusionsproteine

7.4.7.1. L19CDy-His im *Bystander Effect*-Assay

Die ED-B+ F9-Zellen wurden jeweils in den *Wells* einer ThinCert 12-*well*-Zellkulturplatte (7.1.10, S. 73) und die AtT-20- oder F9-Zellen in den passgenauen ThinCert *Inserts* zunächst getrennt voneinander kultiviert. Der Assay wurde in zwei Varianten jeweils dreimal durchgeführt. Für einen Assay wurden 5×10^4 F9-Zellen in *Wells* und $2,5 \times 10^4$ AtT-20-Zellen in den *Inserts* kultiviert. Für die andere Assayvariante wurden ausschließlich F9-

Zellen kultiviert, wobei 5×10^4 Zellen in ein *Well* und 2×10^4 Zellen in ein *Inser* überführt wurden. Vier von sechs *Wells* (F9-Zellen) wurden mit $400 \mu\text{l}$ 100 nM L19CDy-His in Medium für 1 h inkubiert. Anschließend wurde ungebundenes Fusionsprotein ausgewaschen und die zuvor vom Medium befreiten *Inserts* in den *Wells* plaziert. Daraufhin erfolgte die Mediumzugabe mit verschiedenen 5-FC-Konzentrationen (je ein *Well* mit 0, 1, 5, $55 \mu\text{M}$) in beide Reservoirs. Als Kontrollen dienten Zellen, die nur mit Medium oder dem Fusionsprotein behandelt wurden und solche, die nicht mit dem Fusionsprotein, aber der höchsten 5-FC-Konzentration inkubiert wurden. Nach 36 h wurden $400 \mu\text{l}$ Medium aus den *Wells* und $100 \mu\text{l}$ Medium aus den *Inserts* entfernt und durch 2 mg/ml MTT-PBS ersetzt. Nach einer Stunde wurde das Medium jeweils vollständig entfernt und das gebildete Formazan separat mit $500 \mu\text{l}$ *formazan soubilizer* gelöst. Für die Messung wurden je Lösung dreimal $50 \mu\text{l}$ in NUNC Modules überführt, um die Absorption (Differenz von 570- und 630-nm-Messung) dreifach zu messen. Aus den Differenzen der Dreifachbestimmungen wurde der Mittelwert gebildet. Anschließend wurde der Mittelwert aller drei Versuche gebildet und dessen Standardabweichung bestimmt.

7.4.7.2. AntiA33-CDy im *Bystander Effect*-Assay

Die Untersuchung zum *Bystander Effect* erfolgte einmal mit den hgpA33+ CT26-hgpA33-eGFP-Zellen, die mit antiA33-CDy behandelt und anschließend mit hgpA33- CT26-eGFP-Zellen co-kultiviert wurden oder in umgekehrter Reihenfolge. Die Cytotoxizitätsassays wurden wie in Abschnitt 7.4.7.1 beschrieben in der ThinCert-Zellkulturplatte und deren *Inserts* durchgeführt. Hierfür wurden 5×10^4 Zellen in sechs *Wells* und 2×10^4 Zellen in sechs *Inserts* bei 37°C , 5% CO_2 kultiviert. Die Zellen in vier *Wells* wurden mit 150 nM antiA33-CDy inkubiert. Die weitere Behandlung und der sich anschließende MTT-Assay erfolgte wie in Abschnitt 7.4.7.1 beschrieben, jedoch erstreckte sich die 5-FC-Inkubation über 48 h.

7.5. Tierexperimentelle Methoden

Das in dieser Arbeit verwendete Tiermodell ist *Mus musculus*. Die Erlaubnis zur Durchführung der Tierversuche wurde vor Beginn durch das Berliner Landesamt für Arbeitsschutz, Gesundheitsschutz und technische Sicherheit erteilt. Die Untersuchungen erfolgten ausschließlich an weiblichen, immunkompetenten BALB/c Mäusen aus der Zuchtanlage Charles Rivers. Die Tiere wurden in einem 12-h-Tag-Nachtrhythmus gehalten und erhielten Wasser und Futter *ad libitum*.

7.5.1. AntiA33-CDy-Immunisierung

Für die Untersuchungen zur Immunogenität von antiA33-CDy wurden jeweils 100 μg des Fusionsproteins in Dulbecco's PBS fünf Mäusen intraperitoneal verabreicht. Nach wiederholter antiA33-CDy-Injektion (Tag 7) erfolgte die submandibulare Blutentnahme (Tag 12 und 26.). Das Plasma wurde durch Zentrifugation ($2300 \times g$, 10 min, 4°C) des Blutes in Kapillarblutröhrchen (7.1.10, S. 73) gewonnen und für die folgenden Versuche in 500- μl -Reaktionsgefäßen bei 4°C aufbewahrt.

Den bereits immunisierten Tieren wurde 40 Wochen nach der ersten antiA33-CDy-Injektion submandibular Blut entnommen. Nach weiteren 14 Tagen erfolgte eine erneute antiA33-CDy-Injektion, sodass 42 Wochen zwischen dem Erstkontakt und dieser Injektion lagen. Nach sieben Tagen wurde wiederum antiA33-CDy injiziert und am selben Tag submandibular Blut entnommen. Eine weitere Blutentnahme erfolgte am Tag 21. Das Plasma wurde, wie oben beschrieben, aufbereitet und bei 4°C gelagert.

7.5.2. Tumorthherapie mit antiA33-CDy *in vivo*

7.5.2.1. Eine Übersicht zum murinen Kolonkarzinommodell

Die *In-vivo*-Untersuchungen zur antitumoralen Wirkung von antiA33-CDy erfolgten in zwei zeitlich voneinander getrennten Versuchsrunden, um die Durchführung zu erleichtern und die Reproduzierbarkeit zu belegen. Die Tieranzahl pro Versuchsrunde betrug drei je Gruppe, sodass insgesamt sechs Tiere pro Gruppe behandelt wurden. Das Therapieschema kann folgender Tabelle 7.8 (S. 91) entnommen werden.

Tab. 7.8.: Übersicht zur ADEPT mit antiA33-CDy und 5-FC *in vivo*

Mausgruppen	hgpA33+ Tumore					hgpA33- Tumore	
	I	II	III	IV	V	VI	VII
AntiA33-CDy	⁻¹	50 μg	25 μg	50 μg	75 μg	75 μg	⁻¹
5-FC	5 mg	⁻¹	5 mg	5 mg	5 mg	5 mg	⁻¹

¹ NaCl-Injektion (isotonische Lösung)

7.5.2.2. Vorbereitung der CT26-Zellen für den *In-vivo*-Einsatz

In Vorbereitung auf die Injektion der CT26-hgpA33-eGFP- und CT26-eGFP-Zellen in BALB/c Mäuse wurden die Zellen mit jeweils 5 ml/Kulturschale 2,3 mM EDTA-PBS abgelöst. Die Zellen mehrerer Schalen wurden in einem 50-ml-Reaktionsgefäß vereinigt. Nach Zentrifugation ($102 \times g$, 5 min) wurde der Überstand verworfen und das Zellpellet in 50 ml

Dulbecco's PBS gewaschen und erneut zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet in PBS resuspendiert, um eine Suspension aus 10×10^6 Zellen pro ml zu erhalten. Jeweils 1 ml der Zellsuspension wurde in 2-ml-Reaktionsgefäße aliquotiert und die Gefäße horizontal rollend gelagert, um die gleichmäßige Suspension zur Injektion zu erhalten.

7.5.2.3. antiA33-CDy in *in vivo*

Für die Etablierung subkutaner Tumore, die hgpA33+ oder hgpA33- sind, wurden die stabil transfizierten CT26-hgpA33-eGFP- beziehungsweise CT26-eGFP-Zellen verwendet. Die Zellen wurden wie in Abschnitt 7.5.2.2 beschrieben vorbereitet. Die Injektion von 2×10^6 Zellen in 200 μ l PBS erfolgte durch zwei Experimentatoren, wobei eine dritte Person die Spritzen (je eine pro Maus) vorbereitete. Die Injektion erfolgte subkutan in die rechte Flanke der Tiere.

Die Tumorzellen wuchsen bei allen bis auf einem Tier aus Gruppe I zu einem tastbaren etwa 8 mm³ großen Tumor heran. Die Tiere wurden am fünften Tag innerhalb der Gruppen (getrennt nach hgpA33+ und hgpA33-) zufällig vertauscht, um Gruppenunterschiede durch die Injektionsweise der beiden Experimentatoren auszuschließen. Die antiA33-CDy- und NaCl-Injektion (100 μ l) erfolgte mit 26G \times 0,5-Kanülen subkutan in die rechte Flanke. Im Abstand von 48 h wurden das *Prodrug* (5 mg) oder NaCl in gleicher Weise verabreicht.

7.5.3. ADEPT mit antiA33-CDy in *in vivo*

Die Herstellung der 5-FC-Lösung erfolgte unmittelbar vor Beginn der Injektion, da die 25 mg/ml 5-FC-PBS-Lösung nach kurzer Zeit bei Raumtemperatur kristallisiert. Um 5-FC vollständig zu lösen, wurde DMSO (5% v/v) hinzugesetzt und das Reaktionsgefäß 15 min im Ultraschallbad inkubiert. Die Lösung wurde in 2-ml-Reaktionsgefäße aliquotiert und bei 37°C kurz inkubiert. Die Injektionsnadeln und Spritzen wurden ebenfalls bei 37°C vorgewärmt und je eine Spritze für drei Mäuse unmittelbar vor der Injektion mit 5-FC beladen. Es erfolgte für jede Maus ein Kanülenwechsel.

Die jeweilige Tumorgroße und das Gewicht der Tiere wurde in regelmäßigen Abständen kontrolliert. Ein Therapieabschluss erfolgte vorzeitig wenn das Tumorgewebe invasiv durch die Hautschichten an die Oberfläche (Tumordurchbruch) wuchs oder das Tumorgewebe eine Länge von ≥ 12 mm erreichte.

7.5.3.1. Tumorpräparation

Die Tiere wurden mit Isofluran getötet, anschließend überstreckt und auf dem Rücken liegend fixiert. Für die Freilegung des Tumors wurde ein Hautschnitt (etwa 5 cm) in der Mittellinie des Abdomens durchgeführt und an beiden Enden nach lateral in Richtung der Extremitäten verlängert. Nach Fixierung der Haut erfolgte die stumpfe Resektion des Tumors.

Anhang A.

Verzeichnisse

Abkürzungen

5-FU	5-Fluorouracil
5-FC	5-Fluorocytosin
ADEPT	Antibody-directed Enzyme Prodrug Therapy
Ak	Antikörper
BSA	bovines Serumalbumin
BMGY-Medium	<i>buffered Glycerol-Complex-Medium</i>
BMMY-Medium	<i>buffered Methanol-Complex-Medium</i>
bp	Basenpaare
CA 19-9	<i>Carbohydrate Antigen 19-9</i>
CCSA-2	<i>Colon Cancer Specific Antigen-2</i>
CD	Cytosindeaminase
CDy	Cytosindeaminase aus Hefen
CEA	<i>Carcinoembryonic Antigen</i>
DNA	<i>Desoxyribonucleic Acid</i>
dNTP	2'-Desoxy-Nukleosidtriphosphat
ED-B	<i>Extra Domain B</i>
EDTA	<i>Ethylenediamintetraacetic Acid</i>
EGF	epidermaler Wachstumsfaktor
EGFR	epidermaler Wachstumsfaktorrezeptor
ELISA	Enzym gekoppelter Immunadsorptionsassay
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EpCAM	epitheliales Zelladhäsionsmolekül
F(ab') ₂	Antikörperfragment eines Immunoglobulins, das durch den Verdau mit Pepsin entsteht
FACS	<i>Fluorescence-activated Cell Sorting</i>
Fc	kristallisierbares Antikörperfragment, besteht aus den konstanten Teilen C _H 2 & C _H 3 eines IgGs
FAP	familiäre adenomatöse Polyposis
Fv	variables Antikörperfragment, besteht aus den variablen Teilen eines IgGs

GFP	grün fluoreszierendes Protein
HACA	humane anti-chimäre Antikörper
hgpA33	humanes Glycoprotein A33
His-tag	Peptidsequenz aus sechs bis zehn Histidinen
HNPCC	erbliches nicht-polypöses kolorektales Krebsyndrom (engl. <i>hereditary nonpolyposis colorectal cancer</i>)
HRP	<i>Horseradish Peroxidase</i> (dt. Meerrettichperoxidase)
IgG	Immunoglobulin der Klasse G
IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid
kb	Kilobasenpaare
kDa	Kilodalton
LB _{low} -Medium	Luria Broth-Medium mit einer minimalen Salzkonzentration
n \times g	n-faches der Erdbeschleunigung
NTA	<i>Nitrilotriacetic Acid</i>
mgpA33	murines Glycoprotein A33
OD ₆₀₀	Optische Dichte bei einer Wellenlänge von 600 nm
<i>P. pastoris</i>	<i>Pichia pastoris</i>
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PBS	<i>Phosphate-buffered Saline</i>
PBSB _{0,2}	<i>Phosphate-buffered Saline</i> mit 0,2 % Brij 58
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i> (dt. Polymerasekettenreaktion)
PE	Phycoerythrin
RT-PCR	<i>reverse Transcription Polymerase Chain Reaction</i>
scFv	Einzelkettenantikörperfragment
SDS	Natriumdodecylsulfat
TRAIL	Tumornekrosefaktorabhängiger Apoptose induzierender Ligand
TRIS	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
TBS	Tris-HCl gepufferte Lösung
VEGF-A	vaskulärer endothelialer Wachstumsfaktor
YPD-Medium	<i>Yeast Extract Peptone Dextrose</i> -Medium

Abbildungsverzeichnis

3.1. Antibody-directed Enzyme Prodrug Therapy	18
3.2. Deaminierung mittels Cytosindeaminase	19
5.1. Westernblot der His-CDy-Aufreinigung	26
5.2. Coomassiegelbild der ED-B-Aufreinigung	26
5.3. Westernblot der L19CDy-His-Aufreinigung	27
5.4. Einfluss der Plasmainkubation auf die L19CDy-His-Enzymaktivität	28
5.5. ELISA mit L19CDy-His	30
5.6. Oberflächenplasmonresonanz-Analyse mit L19CDy-His	31
5.7. L19CDy-His-Cytotoxizitätsassay	32
5.8. Toxizität des L19CDy-His und His-CDy	33
5.9. <i>Bystander Effect</i> von L19CDy-His	35
5.10. Transfektionskontrolle mittels RT-PCR und Membranpräparation	37
5.11. Durchflussscytometrie der CT26-Mutanten	39
5.12. <i>Fluorescence-Activated Cell Sorting</i> der CT26-Transfektanten	40
5.13. Konfokale <i>Laser-Scanning</i> -Mikroskopie der CT26-Zellen und dessen Transfektanten	41
5.14. Wachstumskontrolle der CT26-Zellen und deren Transfektanten	42
5.15. AntiA33-CDy-Cytotoxizitätsassay mit CT26-Transfektanten	43
5.16. <i>Bystander Effect</i> von antiA33-CDy	45
5.17. Nachweis muriner Antikörper nach antiA33-CDy-Immunisierung	47
5.18. Relative enzymatische Aktivität von antiA33-CDy nach Plasmainkubation	48
5.19. Therapieübersicht zum murinen Kolonkarzinom-Modell	49
5.20. Tumorresektion	50
5.21. Tumorangiogenese	51
5.22. Tumormassen	52
5.23. Gesamtüberleben	53

Tabellenverzeichnis

5.1. Kinetische Parameter der L19CDy-His-ED-B-Interaktion	31
7.1. Zusammensetzung des YPD- 2YT- und LB _{low} -Medien/Agar	72
7.2. Zusammensetzung des BMGY- und BMMY-Mediums	73
7.3. PCR-Programme	76
7.4. RT-PCR-Ansatz	77
7.5. DNA-Polyacrylamidgelzusammensetzung	78
7.6. Polyacrylamidgelzusammensetzung	81
7.7. Immunodetektion verschiedener Proteine	82
7.8. Übersicht zur ADEPT mit antiA33-CDy und 5-FC <i>in vivo</i>	91

Literaturverzeichnis

- [1] HE Abud, CN Johnstone, aNC Tebbutt, and JK Heath. The murine A33 antigen is expressed at two distinct sites during development, the ICM of the blastocyst and the intestinal epithelium. *Mech Dev*, **98**(1–2):11–114, 2000.
- [2] ME Ackerman, C Chalouni, MM Schmidt, WW Raman, G Ritter, LJ Old, I Mellman, and KD Wittrup. A33 antigen displays persistent surface expression. *Cancer Immunol Immunother*, **57**(7):1017–1027, 2008.
- [3] W Aff, EV Jr Loftus, WA Faubion, SV Kane, DH Bruning, KA Hanson, and WJ Sandborn. Clinical utility of measuring infliximab and human anti-chimeric antibody concentrations in patients with inflammatory bowel disease. *Am J Gastroenterol*, **105**(5):1133–1139, 2010.
- [4] S Afshar, T Olafsen, AM Wu, and SL Morrison. Chracterization of an engineered human purine nucleoside phosphorylase fused to an anti-her2/neu single chain Fv for use in ADEPT. *J Exp Clin Cancer Res*, **28**(1):147, 2009.
- [5] SR Alberts, DJ Sargent, S Nair, MR Mahoney, M Mooney, SN Thibodeau, TC Smyrk, FA Sinicrope, E Chan, S Gill, MS Kahlenberg, AF Shields, JT Quesenberry, TA Webb GH Jr Farr, BA Pockaj, A Grothey, and RM Goldberg. Effect of oxaliplatin, fluorouracil, and leucovorin with or without cetuximab on survival among patients with resected stage III colon cancer: a randomized trial. *J Clin Oncol*, **307**(13):1383–1393, 2012.
- [6] RF Alderson, BE Toki, M Roberge, W Geng, J Basler, R Chin, A Liu, R Ueda, D Hodges, E Escandon, T Chen, T Kanavarioti, L Babé, PD Senter, JA Fox, and V Schellenberger. Characterization of a CC49-based single-chain fragment-beta-lactamase fusion protein for antibody-directed enzyme prodrug therapy (ADEPT). *Bioconjug Chem*, **17**(2):410–418, 2006.
- [7] TM Allen. Ligand-targeted therapeutics in anticancer therapy. *Nat Rev Cancer*, **2**(10):750–763, 2002.
- [8] Y Almqvist, AC Steffen, H Lundqvist, H Jensen, V Tolmachev, and A Sundin. Biodistribution of 211AT-labeled humanized monoclonal antibody A33. *Cancer Biother Radiopharm*, **22**(4):480–487, 2007.
- [9] R Aqeilan, R Kedar, A Ben-Yehudah, and H Lorberboum-Galski. Interleukin 2-Bax: a novel prototype of human chimeric proteins for targeted therapy. *FEBS Lett*, **457**(2):271–276, 1999.

- [10] H Baba, N Hayashi, Y Emi, Y Kakeji, A Egashira, E Oki, K Ohirabe, T Toyama, T Ohga, M Yamamoto, H Hasegawa, F Kohakura, H Higashi, K Niwa, F Fujita, Y Ogata, S Kohnoe, M Inomata, H Samura, S Tokunaga, Y Maehara, and Kyushu Study Group of Clinical Cancer. A multicenter phase II clinical study of oxaliplatin, folinic acid, and 5-fluorouracil combination chemotherapy as first-line treatment for advanced colorectal cancer: a Japanese experience. *Surg Today*, **41**(12):1610–1616, 2011.
- [11] C Bachran, H Dürkop, M Sutherland, D Bachran, C Müller, A Weng, MF Melzig, and H Fuchs. Inhibition of tumor growth by targeted toxins in mice is dramatically improved by saponinum album in a synergistic way. *J Immunother*, **32**(7), 2009.
- [12] C Bachran, I Heisler, D Bachran, K Dassler, J Ervens, MF Melzig, and H Fuchs. Chimeric toxins inhibit growth of primary oral squamous cell carcinoma cells. *Cancer Biol Ther*, **7**(2):237–242, 2008.
- [13] KD Bagshawe. Human chorionic gonadotropin as a model for a fetal antigen. *Ciba Found Symp*, **96**:146–159, 1983.
- [14] KD Bagshawe. Antibody directed enzymes revive anti-cancer prodrugs concept. *Br J Cancer*, **56**(5):531–532, 1987.
- [15] KD Bagshawe. Targeting: the ADEPT story so far. *Curr Drug Targets*, **10**(2):152–157, 2009.
- [16] HH Bennich, K Ishizaka, SG Johansson, DS Rowe, DR Stanworth, and WD Terry. Immunoglobulin E: a new class of human immunoglobulin. *Immunology*, **15**(3):323–324, 1968.
- [17] JM Benson and MC Nahata. Clinical use of systemic antifungal agents. *Clin Pharm*, **7**(6):424–438, 1988.
- [18] BH Biela, LA Khawli, P Hu, and AL Epstein. Chimeric TNT-3/human beta-glucuronidase fusion proteins for antibody-directed enzyme prodrug therapy (ADEPT). *Cancer Biother Radiopharm*, **18**(3):339–353, 2003.
- [19] RE Bird and BW Walker. Single chain antibody variable regions. *Trends Biotechnol*, **9**(4):132–137, 1991.
- [20] C Bokemeyer, I Bondarenko, A Makhson, JT Hartmann, J Aparicio, F de Braud, S Donea, H Ludwig, G Schuch, C Stroh, AH Loos, A Zubel, and P Koralewski.

- Fluorouracil, leucovorin, and oxaliplatin with and without cetuximab in the first-line treatment of metastatic colorectal cancer. *J Clin Oncol*, **27**(5):663–671, 2009.
- [21] M Borriello, P Laccetti, G Terrazzano, G D’Alessio, and C de Lorenzo. A novel fully human antitumour immunoreceptor targeting ErbB2-positive tumours. *Br J Cancer*, **104**(11):1716–1723, 2011.
- [22] L Borsi, B Carnemolla, P Catellani, C Rosellini, D Vecchio, G Allemanni, SE Chang, J Taylor-Papdimitriou, H Pande, and L Zardi. Monoclonal antibodies in the analysis of fibronectin isoforms generated by alternative splicing of mRNA precursors in normal and transformed human cells. *J Cell Biol*, **104**(3):595–600, 1987.
- [23] E Bremer, M de Bruyn, DF Samplonius, T Bijma, B ten Cate, LF de Leij, and W Helfrich. Targeted delivery of a designed sTRAIL mutant results in superior apoptotic activity towards EGFR-positive tumor cells. *J Mol Med (Berl)*, **86**(8):909–924, 2008.
- [24] G Brünagel, RE Schoen, and RH Getzenberg. Colon cancer specific nuclear matrix protein alterations in human colonic adenomatous polyps. *J Cell Biochem*, **91**(2):365–374, 2004.
- [25] B Carnemolla, L Borsi, and E Balza. Enhancement of the antitumor properties of interleukin-2 by its targeted delivery to the tumor blood vessel extracellular matrix. *Blood*, **99**(5):1659–1665, 2002.
- [26] N Carreras-Sangrà, J Tomé-Amat, L Garcia-Ortega, CA Batt, M Onaderra, A Martinez-Del-Pozo, JG Gavilanes, and J Lacadena. Production and characterization of a colon cancer-specific immunotoxin based on the fungal ribotoxin α -sarcin. *Protein Eng Des Sel*, **25**(8):425–435, 2012.
- [27] B Catimel, G Rttter, S Welt, LJ Old, L Cohen, MA Nerrie, SJ White, JK Heath, B Demediuk, T Domagala, FT Lee, AM Scott, GF Tu, H Ji, RL Moritz, RJ Simpson, AM Burgess, and EC Nice. Purification and characterization of a novel antigen expressed by normal and transformed human colonic epithelium. *J Biol Chem*, **271**(41):25664–25670, 1996.
- [28] M Charlson, TP Szatrowski, J Peterson, and J Gold. Validation of a combined comorbidity index. *J Clin Epidemiol*, **47**(11):1245–1251, 1994.
- [29] KC Chen, SY Wu, YL Leu, ZM Prijovich, BM Chen, HE Wang, TL Cheng, and SR Roffler. A humanized immunoenzyme with enhanced activity for glucuronide

- prodrug activation in the tumor microenvironment. *Bioconjug Chem*, **22**(5):938–948, 2011.
- [30] RA Clynes, TL Towers, LG Presta, and JV Ravetch. Inhibitory Fc receptors modulate in vivo cytotoxicity against tumor targets. *Nat Med*, **6**(4):443–446, 2000.
- [31] TH Corbett, DP Griswold, BJ Roberts, JC Peckham, and FM Jr Schabel. Tumor induction relationships in development of transplantable cancers of the colon in mice for chemotherapy assays, with a note on carcinogen structure. *Cancer Res*, **35**(9):2434–2439, 1975.
- [32] D Cortinovis, E Bajetta, M Bartolomeo, G Dognini, E Beretta, E Ferrario, R Ricotta, and R Buzzoni. Raltitrexed plus oxaliplatin in the treatment of metastatic colorectal cancer. *Tumori*, **90**(2):186–191, 2004.
- [33] B Coutard, EG Danchin, R Oubelaid, B Canard, and C Bignon. Single pH buffer refolding screen for protein from inclusion bodies. *Protein Expr Purif*, **82**(2):352–359, 2012.
- [34] JL Creghino and JM Cregg. Heterologous protein expression in the methylotrophic yeast *P. pastoris*. *FEMS microbiology reviews* *24*, **24**(1):45–66, 2000.
- [35] MV Céspedes, I Casanova, M Parreno, and R Mangués. Mouse models in oncogenesis and cancer therapy. *Clin Transl Oncol*, **8**(5):818–329, 2006.
- [36] AR Curreri, FJ Ansfield, FA McIver, HA Waisman, and C Heidelberger. Clinical studies with 5-fluorouracil. *Cancer Res*, **18**(4):478–484, 1958.
- [37] JR Dalzell and LM Samuel. The spectrum of 5-fluorouracil cardiotoxicity. *Anticancer Drugs*, **20**(1):79–80, 2009.
- [38] A de Gramont, C Tournigand, C Louvet, T André, JL Molitor, E Raymond, S Moreau, J Vignoud, N Le Bail, and M Krulik. Oxaliplatin, folinic acid and 5-fluorouracil (folfox) in pretreated patients with metastatic advanced cancer. The GERCOD. *Rev Med Interne*, **18**(10):769–775, 1997.
- [39] F Mello de Queiroz, G Suarez-Kurts, W Stühmer, and LA Pardo. Ether à go-go potassium channel expression in soft tissue sarcoma patients. *Mol Cancer*, **5**:42, 2006.
- [40] PM Deckert, A Jungbluth, N Montalto, MA Clark, RD Finn, C Jr Williams, EC Richards, KS Panageas, LJ Old, and S Welt. Pharmacokinetics and microdistribution

- of polyethylene glycol-modified humanized A33 antibody targeting colon cancer xenografts. *Int J Cancer*, **87**(3):382–390, 2000.
- [41] PM Deckert, C Renner, LS Cohen, A Jungbluth, G Ritter, JR Bertino, LJ Old, and S Welt. A33scFv-cytosine deaminase: a recombinant protein construct for antibody-directed enzyme-prodrug therapy. *Br J Cancer*, **88**(6):937–939, 2003.
- [42] B Dälken, Giesübel, SK Knauer, and WS Wels. Targeted induction of apoptosis by chimeric granzyme B fusion proteins carrying antibody and growth factor domains for cell recognition. *Cell Death Differ*, **13**(4):576–585, 2006.
- [43] JH Humphrey DR Stanworth, H Bennich and SG Johansson. Specific inhibition of the Prausnitz-Küstner reaction by an atypical human myeloma protein. *Lancet*, **12**(7511):330–332, 1967.
- [44] N Eissler, P Ruf, J Mysliwietz, H Lindhofer, and R Mocikat. Trifunctional Bispecific Antibodies Induce Tumor-Specific T Cells and Elicit a Vaccination Effect. *Cancer Res*, **72**(16):3958–3966, 2012.
- [45] M el Shayeb, A Scarfe, Y Yasui, and M Winget. Reasons physicians do not recommend and patients refuse adjuvant stage III colon cancer: a population based chart review. *BMC Res Notes*, :269, 2012.
- [46] CK Fang, HW Chen, IT Chiang, CC Chen, JF Liao TP Su, CY Tung, Y Ucito-mi, and JJ Hwang. Mirtazapine Inhibits Tumor Growth via Immune Response and Serotonergic System. *PLoS One*, **7**(7)e38886, 2012.
- [47] M Fassnacht, M Terzolo, B Allolio, E Baudin, H Haak, A Berruti, S Welin, C Schade-Brittinger, A Lacroix, B Jarzab, H Sorbye, DJ Torpy, V Stepan, DE Schteingart, W Arlt, M Kroiss, S Leboulleux, P Sperone, A Sundin, I Hermsen, S Hahner, HS Wil- lenberg, A Tabarin, M Quinkler, C de la Fouchardière, M Schlumberger, F Mante- ro, D Weismann, F Beuschlein, H Gelderblom, H Wilmink, M Sender, M Edgerly, W Kenn, T Fojo, HH Müller, B Skogseid, and FIRM-ACT Study Group. Combination chemotherapy in advanced adrenocortical carcinoma. *N Engl J Med*, **366**(23):2189–2197, 2012.
- [48] A Feldmann, C Arndt, K Töpfer, S Stamova, F Krone, M Catellieri, S Koristka, I Michalk, D Lindemann, M Schmitz, A Temme, M Bornhäuser, G Ehninger, and M Bachmann. Novel Humanized and Highly Efficient Bispecific Antibodies Mediate Killing of Prostate Stem Cell Antigen-Expressing Tumor Cells by CD8+ and CD4+ T Cells. *J Immunol*, **189**(6):3249–3259, 2012.

- [49] C Ferràs, JAF Oude Vrielink, JWA Verspuy, H te Riele, A Tsaalbi-Shtylik, and N de Wind. Abrogation of Microsatellite-instable Tumors Using a Highly Selective Suicide Gene/Prodrug Combination. *Mol Ther*, **17**(8):1373–80, 2009.
- [50] J Finke, J Ko, B Rini, P Rayman, J Ireland, and Peter Cohen. MDSC as a Mechanism of Tumor Escape from Sunitinib Mediated Anti-Angiogenic Therapy. *Int Immunopharmacol*, **11**(7):856-861, 2011.
- [51] R Fischer, R Drossard, N Emans, U Commandeur, and S Hellwig. Towards molecular farming in the future: *Pichia pastoris*-based production of single-chain antibody fragments. *Biotechnol Appl Biochem*, **30**, 1999.
- [52] J Folkman. Tumor Angiogenesis: Therapeutic Implications. *N Engl J Med*, **285**(21):1082–1086, 1971.
- [53] Gesellschaft für Versuchstierkunde und Tierärztliche Vereinigung für Tierschutz. Empfehlungen zur Substanzapplikation bei Versuchstieren. Auflage August, 2010.
- [54] RJ Francis, SK Sharma, C Springer, Aj Green, LD Hope-Stone, L Sena, J Martin, KL Adamson, A Robbins, L Gumbrell, D O’Malley, E Tsiompanou, H Shahbakhti, S Webley, D Hochhauser, AJ Hilson, D Blakey, and RH Begent. A phase I trial of antibody directed enzyme prodrug therapy (ADEPT) in patients with advanced colorectal carcinoma or other CEA producing tumours. *Br J Cancer*, **87**(6):600–607, 2002.
- [55] CS Fuchs, J Marshall, and E Mitchell. Randomized controlled trial of irinotecan plus infusional, bolus, or oral fluoropyrimidines in first-line treatment of metastatic cancer: results from BICC-C study. *J Clin Oncol*, **25**(30):4779–4786, 2007.
- [56] H Fuchs and C Bachran. Targeted tumor therapies at a glance. *Curr Drug Targets*, **10**(2):89–93, 2009.
- [57] P Garinchesa, J Sakamoto, S Welt, F Real, W Rettig, and L Old. Organ-specific expression of hte colon cancer antigen A33, a cell surface target for antibody-based therapy. *Int J Oncol*, **9**(3):465–471, 1996.
- [58] BL Stoddard GC Ireton, ME Black. The 1.14Å Crystal Structure of Yeast Cytosine Deaminase: Evolution of Nucleotide Salvage Enzymes and Implications for Genetic Chemotherapy. *Structure*, **11**(8):961–972, 2003.

- [59] BJ Giantonio, PJ Catalano, NJ Meropol, PJ O'Dwyer, SR Alberts, MA Schwartz, and AB 3rd Benson. Bevacizumab in combination with oxaliplatin, fluorouracil, and leucovorin (FOLFOX4) for previously treated metastatic colorectal cancer: results from the Eastern Cooperative Oncology Group Study E3200. *J Clin Oncol*, **25**(12):1539–1544, 2007.
- [60] O Gires, CA Klein, and PA Baeuerle. On the abundance of EpCAM on cancer stem cells. *Nat Rev Cancer*, **9**(2):143, 2009.
- [61] E Grundberg, E Titsworth, and M Bennett. Chemotherapeutic Activity of 5-Fluorocytosine. *Antimicrob Agents Chemother (Bethesda)*, **161**:566–568, 1963.
- [62] C Grávalos, I Garcia-Escobar, P Garcia-Alfonso, J Cassinello, D Malón, and A Carrato. Adjuvant chemotherapy for stages II, III and IV of colon cancer. *Clin Transl Oncol*, **11**(8):526–533, 2009.
- [63] R Gutmann, A Leunig, M Leunig, and J Feyth. Importance of increased interstitial fluid pressure in therapy of malignant tumors of the head-neck area. *Laryngorhinotologie*, **72**(7):338–341, 1993.
- [64] JK Habermann, FG Bader, C Franke, K Zimmermann, J Gemoll, B Fritzsche, HP Bruch, and UJ Roblick. From the genome to the proteome—biomarkers in colorectal cancer. *Langenbecks Arch Surg*, **393**(1):93–104, 2008.
- [65] C Halin, V Gafner, ME Villani, L Borsi, A Berndt, H Kosmehl, L Zardi, and D Neri. Synergistic therapeutic effects of a tumor targeting antibody fragment, fused to interleukin 12 and to tumor necrosis factor alpha. *Cancer Res*, **63**(12):3202–3210, 2003.
- [66] C Halin, U Niesner, ME Villani, L Zardi, and D Neri. Tumor-targeting properties of antibody-vascular endothelial growth factor fusion proteins. *Int J Cancer*, **102**(2):109–116, 2002.
- [67] DA Hamstra, KC Lee, JM Tychewicz, VD Schepkin, BA Moffat, M Chen, KJ Dornfeld, TS Lawrence, TL Chenevert, BD Ross, JT Gelovani, and A Rehemtulla. The use of ¹⁹F spectroscopy and diffusion-weighted MRI to evaluate differences in gene-dependent enzyme prodrug therapies. *Mol Ther*, **10**(5):916–928, 2004.
- [68] XK Hao, JY Liu, QH Yue, GJ Wu, YJ Bai, and Y Yin. In vitro and in vivo prodrug therapy of prostate cancer using anti-gamma-Sm-scFv/hCPA fusion protein. *Prostate*, **66**(8):858–866, 2006.

- [69] M Hara, M Sato, H Takahashi, S Takayama, and H Takeyama. Accuracy of monitoring serum carcinoembryonic antigen levels in postoperative stage III colorectal cancer patients is limited to only the first postoperative year. *Surg Today*, **41**(10):1357–1362, 2011.
- [70] J Hardig and B Burthness. Cetuximab: an an epidermal growth factor receptor chemeric human-murine monoclonal antibody. *Drugs Today (Barc)*, **41**(2):107–127, 2005.
- [71] F Hartung, W Stühmer, and LA Pardo. Tumor cell-selective apoptosis induction through targeting of K(V)10.1 via bifunctional TRAIL antibody. *Mol Cancer*, **10**:109, 2011.
- [72] H Hashizume, P Baluk, S Morikawa, JW McLean, G Thurston, S Roberge, RK Jain, and DM McDonald. Openings between defective endothelial cells explain tumor vessel leakiness. *AM J Pathol*, **156**(4):1363–1380, 2000.
- [73] JK Heath, SJ White, CN Johnstone, B Catimel, RJ Simpson, RL Moritz, GF Tu, H Ji, RH Whitehead, LC Groenen, AM Scott, G Ritter, L Cohen, S Welt, JL Old, EC Nice, and AW Burgess. The human A33 antigen is a transmembrane glycoprotein and a novel member of the immunoglobulin superfamily. *Proc Natl Acad Sci USA*, **94**(2):469–474, 1997.
- [74] C Heidelberger, NK Chaudhuri, P Dannenberg, D Mooren, L Griesbach, R Duschinsky, RJ Schnitzer, E Plevin, and J Scheiner. Fluorinated Pyrimidines, A New Class of Tumor-Inhibitory Compounds. *Nature*, **179**(4561):663–666, 1957.
- [75] M Heil, I Eitenmüller, T Schmitz-Rixen, and W Schaper. arteriogenesis versus angiogenesis: similarities and differences. *J Cell Mol Med*, **10**(1):45–55, 2006.
- [76] S Herzog, H Sager, E Khmelevski, A Deylig, and WD Ito. Collateral arteries grow from preexisting anastomoses in the rat hindlimb. *AM J Physiol Heart Circ Physiol*, **283**(5):H2012–2020, 2002.
- [77] E Holler, HJ Kolb, E Hiller, W Mraz, W Lehmacher, B Gleixner, C Seeber, U Jehn, HH Gerhartz, and G Brehm. Microangiopathy in patients on cyclosporine prophylaxis who developed acute graft-versus-host disease after HLA-identical bone marrow transplantation. *Blood*, **73**(7):2018–2024, 1989.
- [78] T Hristozova, R Korschak, V Budach, and I Tinhofer. A simple multicolor flow

- cytometry protocol for detection and molecular characterization of circulating tumor cells in epithelial cancers. *Cytometry A*, **81**(6):489–495, 2012.
- [79] PJ Hudson and C Souriau. Engineered antibodies. *Nat Med*, **9**(1):129–134, 2003.
- [80] AD Hughes and MR King. Nanobiotechnology for the capture and manipulation of circulating tumor cells. *Wiley Interdiscip Rev Nanomed Nanobiotechnol*, **4**(3):291–309, 2012.
- [81] H Hurwitz, L Fehrenbacher, W Novotny, T Cartwright, J Hainsworth, W Heim, J Berlin, A Baron, S Griffing, E Holmgren, N Ferrara, G Fyfe, B Rogers, R Ross, and F Kabbinavar. Bevacizumab plus irinotecan, fluorouracil, and leucovorin for metastatic colorectal cancer. *N Engl J Med*, **350**(23):2335–2342, 2004.
- [82] H Iinuma, T Watanabe, K Mimori, M Adachi, N Hayas, J Tamura, K Matsuda, R Fukushima, K Okinaga, M Sasako, and M Mori. Clinical Significance of Circulating Tumor Cells, Including Cancer Stem-Like Cells, in Peripheral Blood for Recurrence and Prognosis in Patients With Dukes’ Stage B and C Colorectal Cancer. *J Clin Oncol*, **29**(12):1547–1555, 2011.
- [83] PL Ipta, F Marmocchi, G Magni, R Felicoli, and G Polidoro. Baker’s yeast cytosine deaminase. Some enzymic properties and allosteric inhibition by nucleosides and nucleotides. *Biochemistry*, **10**(23):4270–4276, 1971.
- [84] RHJ Begent JA Ledermann, C Massof, AM Kelly, T Adam, and KD Bagshawe. Phase I study of repeated therapy with radiolabelled antibody to carcinoembryonic antigen using intermittent or continuous administration of cyclosporin A to suppress the immune response. *Int J Cancer*, **47**(5):659–664, 1991.
- [85] MH Jagasia, CJ Langer, DH Johnson, F Yunus, JS Rodgers, LL Schlabach, AG Cohen, Y Shyr, DP Carbone, and RF Devore. Weekly irinotecan and cisplatin in advanced non-small cell lung cancer: a multicenter phase II study. *Clin Cancer Res*, **7**(1):68–73, 2001.
- [86] IT Johnson and EK Lund. Review article: nutrition, obesity and colorectal cancer. *Aliment Pharmacol Ther*, **26**(2):161–181, 2007.
- [87] CN Johnstone, NC Tebbutt, HE Abud, SJ White, KL Stenvers, NE Hall, SH Cody, RH Whitehead, B Catimel, EC Nice, AW Burges, and JK Heath. Characterization of mouse A33 antigen, a definitive marker for basolateral surfaces of intestinal epithelial cells. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, **279**(3):G500–510, 2000.

- [88] R Karlsson, A Michaelsson, and L Mattsson. Kinetic analysis of monoclonal antibody-antigen interactions with a new biosensor based analytical system. *J Immunol Methods*, **145**(1-2):229–240, 1991.
- [89] CA Kauffman and PT Frame. Bone marrow toxicity associated with 5-fluorocytosine therapy. *Antimicrob Agents Chemother*, **11**(2):244–247, 1977.
- [90] P Kharaziha, P Rodriguez, Q Li, H Rundqvist, A-C Björklund, M Augsten, A Ullén, L Egevad, P Wiklund, S Nilsson, G Kroemer, D Grander, and T Panaretakis. Targeting of distinct signaling cascades and cancer-associated fibroblasts define the efficacy of Sorafenib against prostate cancer cells. *Cell Death Dis*, **3**(1):e262, 2012.
- [91] S Khare and M Verma. Epigenetics of Colon Cancer. *Methods Mol Biol*, **863**:177–185, 2012.
- [92] E Kievit, HM Pinedo, HM Schlüper, HJ Haisma, and E Boven. Comparison of monoclonal antibodies 17-1A and 323/A3: the influence of the affinity on tumour uptake and efficacy of radioimmunotherapy in human ovarian cancer xenografts. *Br J Cancer*, **73**(4):457–464, 1996.
- [93] I Kim, YH Park, DA Rey, and CA Batt. Selica-deposited phospholipid nanotubes as a plausible drug targeting system. *J Drug Target*, **16**(9):716–722, 2008.
- [94] DK Kirui, S Krishnan, AD Strickland, and CA Batt. PAA-derived gol nanorods for cellular targeting and photothermal therapy. *Maromol Biosci*, **11**(6):779–788, 2011.
- [95] B Knychalski and T Lukienczuk. The evaluation of diagnostic value of the tumor markers: CCSA-2 and CEA in colorectal cancer. *Pol Przegl Chir*, **82**(2):86–92, 2012.
- [96] BA Koechlin, F Rubio, S Palmer, T Gabriel, and R Duschinsky. The metabolism of 5-fluorocytosine-2-14-C and of cytosine-14-C in the rat and the disposition of 5-fluorocytosine-2-14-C in man. *Biochem Pharmacol*, **15**(4):435–446, 1966.
- [97] AR Kornblihtt, K Vibe-Pedersen, and FE Baralle. Human fibronectin: molecular cloning evidence for two mRNA species differing by an internal segment coding for a structural domain. *Embo J*, **3**(1):221–226, 1984.
- [98] H Kosaka, T Ichikawa, K Kurozumi, H Kambara, S Inoue, T Maruo, K Nakamura, H Hamada, and I Date. Therapeutic effect of suicide gene-transferred mesenchymal stem cells in a rat model of glioma. *Cancer Gene Ther*, **19**(8):572–578, 2012.

- [99] P Kotsakis, Z Wang, RJ Collighan, and M Griffin. The role of tissue transglutaminase (TG2) in regulating the tumour progression of the mouse colon carcinoma CT26. *Amino Acids*, **41**(4):909–921, 2011.
- [100] P Kozuch, ML Grossbard, A Barzdins, M Araneo, A Robin, D Frager, P Homel, J Marino, P DeGregorio, and HW Bruckner. Irinotecan combined with gemcitabine, 5-fluorouracil, leucovorin, and cisplatin (G-FLIP) is an effective and noncrossresistant treatment for chemotherapy refractory metastatic pancreatic cancer. *Oncologist*, **6**(6):488–495, 2001.
- [101] RJ Kreitman. Immunotoxins in cancer therapy. *Curr Opin Immunol*, **11**(5):570–578, 1999.
- [102] L Kucerova, M Matuskova, K Hlubinova, R Bohovi, L Feketeova, P Janega, P Babal, and M Poturnajova. Increased proliferation and chemosensitivity of human mesenchymal stromal cells expressing fusion yeast cytosine deaminase. *Cancer Lett*, **311**(1):101-112, 2011.
- [103] HG Kunkel, JL Fahey, EC Franklin, EF Osserman, and WD Terry. Notation for human immunoglobulin subclasses. *Bull World Health Organ*, **35**(6):953, 1966.
- [104] P Lanuti, F Santilli, M Marchisio, L Pierdomenico, E Vitacolonna, E Santavenere, A Iacone, G Davi, M Romano, and S Miscia. A novel flow cytometric approach to distinguish circulating endothelial cells from endothelial microparticles: relevance for the evaluation of endothelial dysfunction. *J Immunol Methods*, **380**(1–2):16–21, 2012.
- [105] ES Leman, RE Schoen, A Magheli, LJ Sokoll, DW Chan, and RH Getzenberg. Evaluation of colon cancer-specific antigen 2 as a potential serum marker for colorectal cancer. *Clin Cancer Res*, **14**(5):1349–1354, 2008.
- [106] WW Li. Tumor Angiogenesis Molecular Pathology, Therapeutic Targeting, and Imaging. *Acad Radiol*, **7**(10):800-11, 2000.
- [107] Y Liu, LH Cheung, WN Hittelman, and MG Rosenblum. Targeted delivery of human pro-apoptotic enzymes to tumor cells: In vitro studies describing a novel class of recombinant highly cytotoxic agents. *Mol Cancer Ther*, **2**(12):1341–50, 2003.
- [108] A Mallano, S Zamboni, G Carpinelli, F Santoro, M Flego, A Ascione, M Gellini, M Tombesi, and F Podo M Cianfriglia. Generation and characterization of a human single-chain fragment variable (scFv) antibody against cytosine deaminase from yeast. *BMC Biotechnol*, **8**:68, 2008.

- [109] J Martin, SM Stribbling, GK Poon, RH Begent, M Napier, SK Sharma, and CJ Springer. Antibody-directed enzyme prodrug therapy: pharmacokinetics and plasma levels of prodrug and drug in a phase I clinical trial. *Cancer Chemother Pharmacol*, **40**(3):189–201, 1997.
- [110] E Martinelli, R Palma, M Orditura, F de Vita, and F Ciardiello. Anti-epidermal growth factor receptor monoclonal antibodies in cancer therapy. *Clin Exp Immunol*, **158**(1):1–9, 2009.
- [111] D Martinez, N Rodriguez, T Grinán, T Rondón, AM Vázquez, R Pérez, and AM Hernández. Biodistribution of 211AT-labeled humanized monoclonal antibody A33. *Front Immunol*, **3**:94, 2012.
- [112] M Mathew and RS Verma. Humanized immunotoxins: a new generation of immunotoxins for targeted cancer therapy. *Cancer Sci*, **100**(8):1359–1365, 2009.
- [113] A Mayer, RJ Francis, SK Sharma, B Tolner, CJ Springer, J Martin, GM Boxer, , J Bell, AJ Green, JA Hartley, C Cruickshank, J Wren, KA Chester, and RH Begent. A phase I study of single administration of antibody-directed enzyme prodrug therapy with the recombinant anti-carcinoembryonic antigen antibody-enzyme fusion protein MFCEP1 and a bis-iodo phenol mustard prodrug. *Clin Cancer Res*, **12**(21):6509–6516, 2006.
- [114] LJ McHeyzer-Williams and MG McHeyzer-Williams. Antigen-specific Memory B Cell Development. *Ann Rev Immunol*, **23**:487–513, 2005.
- [115] E Mishani, G Abourbeh, M Eiblmaier, and CJ Anderson. Imaging of EGFR and EGFR tyrosine kinase overexpression in tumors by nuclear medicine modalities. *Curr Pharm Des*, **14**(28):2983–2998, 2008.
- [116] T Mizobe, Y Ogata, H Murakami, Y Akagi, N Ishibashi, S Mori, T Sasatomi, and K Shirouzu. Efficacy of the combined use of bevacizumab and irinotecan as a postoperative adjuvant chemotherapy in colon carcinoma. *Oncol Rep*, **20**(3):517–523, 2008.
- [117] A Mourtzikou, M Stamouli, C Kroupis, S Christodoulou, M Skondra, A Kastania, D Pectasides, G Athanasas, and C Dimas. Evaluation of carcinoembryonic antigen (CEA), epidermal growth factor receptor (EGFR), epithelial cell adhesion molecule EpCAM (GA733-2), and carbohydrate antigen 19-9 (CA 19-9) levels in colorectal cancer patients and correlation with clinicopathological characteristics. *Mol Cancer*, **58**(5-6):441–448, 2012.

- [118] MP Napier, SK Sharma, CJ Springer, KD Bagshawe, AJ Green, J Martin, SM Stribbling, N Cushen, D O'Malley, and RH Begent. Antibody-directed Enzyme Prodrug Therapy: Efficacy and Mechanism of Action in Colorectal Carcinoma. *Clin Cancer Res*, **6**(3):765–772, 2000.
- [119] National Institute of Health. NIH consensus conference. Adjuvant therapy for patients with colon and rectal cancer. *JAMA*, **264**(11):1444–1450, 1990.
- [120] H Oflaz, A Turmen, R Kazancioglu, SM Kayacan, B Bunyak, H Genchallac, B Erol, F Mercanoglu, S Umman, and MS Sever. The effect of calcineurin inhibitors on endothelial function in renal transplant recipients. *Clin Transplant*, **17**(3):212–216, 2003.
- [121] S Ogino, J Galon, CS Fuchs, and G Dranoff. Cancer immunology—analysis of host and tumor factors for personalized medicine. *Nat Rev Clin Oncol*, **8**(12):711–719, 2011.
- [122] S Ogino, K Nosho, JA Meyerhardt, GJ Kirkner, AT Chan, T Kawasaki, EL Giovannucci, M Loda, and CS Fuchs. Cohort Study of Fatty Acid Synthase Expression and Patient Survival in Colon Cancer. *J Clin Oncol*, **26**(35):5713–5720, 2008.
- [123] K Olino, S Wada, BH Edil, X Pan, K Meckel, W Weber, J Slansky, K Tamada, P Lauer, D Brockstedt, D Pardoll, R Schulick, and K Yoshimura. Tumor-Associated Antigen Expressing *Listeria monocytogenes* Induces Effective Primary and Memory T-Cell Responses Against Hepatic Colorectal Cancer Metastases. *Ann Surg Oncol*, **19**(3):597–607, 2012.
- [124] VB Pai and MC Nahata. Cardiotoxicity of chemotherapeutic agents: incidence, treatment and prevention. *Drug Saf*, **22**(4):263–302, 2000.
- [125] E Paifer, E Margolles, J Cremata, R Montesino, L Herrera, and JM Delgado. Efficient expression and secretion of recombinant alpha amylase in *Pichia pastoris* using two different signal sequences. *Yeast*, **10**(11):1415–1419, 1994.
- [126] H Panjideh, V Coelho, J Dervede, H Fuchs, U Keilholz, E Thiel, and PM Deckert. Production of bifunctional single-chain antibody-based fusion proteins in *P. pastoris* supernatants. *Bioprocess and biosystems engineering*, **31**(6):559–568, 2008.
- [127] H Panjideh, VC Da Silva, V Coelho, and PM Deckert. Biodistribution and efficacy of [131I]A33scFv::CDy, a recombinant antibody-enzyme protein for colon cancer. *Int J Oncol*, **32**(4):925–930, 2008.

- [128] D Papamichael. The use of thymidylate synthase inhibitors in the treatment of advanced colorectal cancer: current status. *Stem Cells*, **18**(3):166–175, 2000.
- [129] G Pavlinkova, D Colcher, BJM Booth, A Goel, UA Wittel, and SK Batra. Effects of humanization and gene shuffling on immunogenicity and antigen binding of anti-tag-72 single-chain Fvs. *Int J Cancer*, **94**(5):717–726, 2001.
- [130] RB Pedley, SK Sharma, GM Boxer, R Boden, SM Stribbling, L Davies, CJ Springer, and RH Begent. Enhancement of antibody-directed enzyme prodrug therapy in colorectal xenografts by an antivascular agent. *Cancer Res*, **59**(16):3998–4003, 1999.
- [131] U Petrausch, J Dervedde, V Coelho, H Panjideh, D Frey, H Fuchs, E Thiel, and PM Dc. A33scFv-green fluorescent protein, a recombinant single-chain fusion protein for tumor targeting. *Protein Eng Des Sel*, **20**(12):583–590, 2007.
- [132] A Pini, F Viti, B Carnemolla, L Zardi, P Neri, and D Neri. Design and use of a phage display library. Human antibodies with subnanomolar affinity against a marker of angiogenesis eluted from a two-dimensional gel. *J Biol Chem*, **273**(34):21769–21776, 1998.
- [133] VS Rajkumar, G Boxer, M Robson, J Muddle, Y Papstavrou, and RB Pedley. A comparative study of PDGFR inhibition with imatinib on radiolabeled antibody targetin and clearance in two pathologically distinct models of colon adenocarcinoma. *Tumour Biol*, in Druck, 2012.
- [134] FW Rankin. Cancer of the Colon: Its Surgical Treatment: (Section of Surgery: Sub-Section of Proctology). *Proc R Soc Med*, **27**(12):1721–1728, 1934.
- [135] Robert Koch-Institut (Hrsg) und die Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V. Krebs in Deutschland 2007/2008. 8. Ausgabe, Berlin, 2012.
- [136] E Ruoslahti. Spezialization of tumor vasculature. *Nat Rev Cancer*, **2**(2):83–90, 2002.
- [137] S Sadahiro, T Suzuki, K Ishikawa, S Yasuda, T Tajima, H Makuuchi, T Saitoh, and C Murayama. Prophylactic hepatic arterial infusion chemotherapy for the prevention of liver metastasis in patients with colon carcinoma: a randomized control trial. *Cancer*, **100**(3):590–597, 2004.
- [138] J Sakamoto, H Kojima, J Kato, H Hamashima, and H Suzuki. Organ-specific expression of the intestinal epithelium-related antigen A33, a cell surface target for antibody-based imaging and treatment in gastrointestinal cancer. *Cancer Chemo-ther Pharmacol*, **46**:S27–32, 2000.

- [139] M Santimaria, G Moscatelli, GL Viale, L Giovanni, G Neri, F Viti, A Leprini, L Borsi, P Castellani, L Zardi, D Neri, and P Riva. Immunoscintigraphic detection of the ED-B domain of fibronectin, a marker of angiogenesis, in patients with cancer. *Clin Cancer Res*, **9**(2):571–579, 2003.
- [140] H Schellekens. How to predict and prevent the immunogenicity of therapeutic proteins. *Biotechnol Annu Rev*, **14**:191–202, 2008.
- [141] R Schneider, A Fürst, and G Möslein. Lynch syndrome-epidemiology, clinical features, molecular genetics, screening, therapy. *Z Gastroenterol*, **50**(2):217–225, 2012.
- [142] PD Senter, PC Su, T Katsuragi, T Sakai, WL Cosand, I Hellström, and KE Hellström. Generation of 5-fluorouracil from 5-fluorocytosine by monoclonal antibody-cytosine deaminase conjugates. *Bioconjug Chem*, **2**(6):447–451, 1991.
- [143] SK Sharma, RB Pedley, J Bhatia, GM Boxer, E El-Emir, U Qureshi, B Tolner, H Lowe, NP Michael, N Minton, RH Begent, and KA Chester. Sustained Tumor Regression of Human Colorectal Cancer Xenografts Using a Multifunctional Mannosylated Fusion Protein in Antibody-Directed Enzyme Prodrug Therapy. *Clin Cancer Res*, **11**(2 Pt 1):814–825, 2005.
- [144] S Shimoyama. Pharmacogenetics of irinotecan: An ethnicity-based prediction of irinotecan adverse events. *World J Gastrointest Surg*, **2**(1):14–21, 2011.
- [145] D Sikriwal, P Ghosh, and JK Batra. Ribosome inactivating protein saporin induces apoptosis through mitochondrial cascade, independent of translation inhibition. *Int J Biochem Cell Biol*, **40**(12):2880–2888, 2008.
- [146] SM Singh, A Sharma, AK Upadhyay, A Singh A, LC Garg, and AK Panda. Solubilization of inclusion body proteins using n-propanol and its refolding into bioactive form. *Protein Expr Purif*, **81**(1):75–82, 2012.
- [147] S Sklenak, L Yao, RI Cukier, and H Yan. Catalytic mechanism of yeast cytosine deaminase: an ONIOM computational study. *J Am Chem Soc*, **126**(45):14879–14889, 2004.
- [148] M Stern and R Herrmann. Overview of monoclonal antibodies in cancer therapy: present and promise. *Crit Rev Oncol Hematol*, **54**(1):11–29, 2005.
- [149] F Stirpe, S Bailey, SP Miller, and JW Bodley. Modification of ribosomal rna by ribosome-inactivating proteins from plants. *Nucleic Acids Res*, **16**(4):1349–1357, 1988.

- [150] TS Stolworthy, AM Korkegian, CL Willmon, A Ardiani, J Cundiff, BL Stoddard, and ME Black. Yeast cytosine deaminase mutants with increased thermostability impart sensitivity to 5-fluorocytosine. *J Mol Biol*, **377**(3):854–869, 2008.
- [151] A Tannapfel and C Wittekind. The current TNM system for gastrointestinal tumors part II. *Pathologe*, **31**(5):348–352, 2010.
- [152] L Tarli, E Balza, F Viti, L Borsi, P Castellani, D Berndorff, L Dinkelborg, D Neri, and L Zardi. A High-Affinity Human Antibody That Targets Tumoral Blood Vessels. *Blood*, **94**(1):192–198, 1999.
- [153] D Tassel and MA Madoff. Treatment of Candida sepsis and Cryptococcus meningitis with 5-fluorocytosine. A new antifungal agent. *JAMA*, **206**(4):830–832, 1968.
- [154] Alberta Provincial Gastrointestinal Tumour Team. Early Stage Colon Cancer - Clinical Practice Guideline GI-004. *Alberta Health Services*, 2008.
- [155] J Tomé-Amat, A Menedez-Mendez, L Garcia-Ortega, CA Batt, M Onaderra, A Martinez-Del-Pozo, JG Gavilanes, and J Lacadena. Produktion and characterization of scFvA33T1, an immunoRNase targeting colon cancer cells. *FEBS J*, **279**(17):3022–3032, 2012.
- [156] KK Tsoi, CY Pau, WK Wu, FK Chan, S Griffiths, and JJ Sung. Cigarette smoking and the risk of colorectal cancer: a meta-analysis of prospective cohort studies. *Clin Gastroenterol Hepatol*, **7**(6):682–688, 2009.
- [157] G Veerman, VW Ruiz van Haperen, JB Vermorcken, P Noordhuis, BJ Braakhuis, HM Pinedo, and GJ Peters. Antitumor activity of prolonged as compared with bolus administration of 2',2'-difluorodeoxycytidine in vivo against murine colon tumors. *Clin Oncol*, **38**(4):335–342, 1996.
- [158] A Vermes, HJ Guchelaar, and J Dankert. Flucytosine: a review of its pharmacology, clinical indications, pharmacokinetics, toxicity and drug interactions. *J Antimicrob Chemother*, **46**(2):171–179, 2000.
- [159] F Viti, L Tarli, L Giovannoni, L Zardi, and D Neri. Increased binding affinity and valence of recombinant antibody fragments lead to improved targeting of tumoral angiogenesis. *Cancer Res*, **59**(2):347–352, 1999.
- [160] A Vrieling and E Kampman. The role of body mass index, physical activity, and diet in colorectal cancer recurrence and survival: a review of the literature. *Am J Clin Nutr*, **92**(3):471–490, 2012.

- [161] EK Wei, KY Wolin, and GA Colditz. Time Course of Risk Factors in Cancer Etiology and Progression. *J Clin Oncol*, **28**(26):4052–4057, 2010.
- [162] LM Weiner, JC Murray, and CW Shuptrine. Antibody-based immunotherapy of cancer. *Cell*, **148**(6):1081–1084, 2012.
- [163] L Weiss, E Grundmann, J Torhorst, F Hartveit, I Moberg, M Eder, CM Fenoglio-Preiser, J Napier, CH Horne, and MJ Lopez. Haematogenous metastatic patterns in colonic carcinoma: an analysis of 1541 necropsies. *J Pathol*, **150**(3):195–203, 1986.
- [164] S Welt, CR Divgi, FX Real, SD Yeh, P Garin-Chesa, CL Finstad, J Sakamoto, A Cohen, ER Sigurdson, N Kemeny, EA Carswell, HF Oettgen, and LJ Old. Quantitative analysis of antibody localization in human metastatic colon cancer: a phase I study of monoclonal antibody A33. *J Clin Oncol*, **8**(11):1894–1906, 1990.
- [165] DK Wilkings and A Mayer. Development of antibodies for cancer therapy. *Expert Opin Biol Ther*, **6**(8):787–796, 2006.
- [166] CG Willett, Y Boucher, E di Tomaso, DG Duda, LL Munn, RT Tong, DC Chung, DV Sahani, SP Kalva, SV Kozin, M Mino, KS Cohen, DT Scadden and AC Hartford, AJ Fischman, JW Clark, DP Ryan, AX Zhu, LS Blaszkiwsky, HX Chen, PC Shellito, GY Lauwers, and RK Jain. Direct evidence that the VEGF-specific antibody bevacizumab has antivascular effects in human rectal cancer. *Nat Med*, **10**(2):145–147, 2004.
- [167] AM Xue, H Wang, and R Ye. Molecular cloning of recombinant fibronectin EDA and EDB fusion protein. *Fa Yi Xue Za Zhi*, **18**(3):140–143, 2002.
- [168] Z Yang, L Zhang, Y Zhang, T Zhang, Y Feng, X Lu, W Lan, J Wang, H Wu, C Cao, and X Wang. Highly Efficient Production of Soluble Proteins from Insoluble Inclusion Bodies by a Two-Step-Denaturing and Refolding Method. *PLoS ONE*, **6**(7):e22981, 2011.
- [169] M Yu, S Stott, M Toner, S Maheswaran, and DA Haber. Circulating tumor cells: approaches to isolation and characterization. *J Cell Biol*, **192**(3):373–382, 2011.
- [170] M Yun, S Pan, SN Jiang, VH Nguyen, SH Park, CH Jung, HS Kim, JJ Min, HE Choy, and Y Hong. The role of tissue transglutaminase (TG2) in regulating the tumour progression of the mouse colon carcinoma CT26. *J Microbiol*, **50**(3):502–510, 2012.
- [171] A Zaniboni, E Aitini, S Barni, D Ferrari, S Cascinu, V Catalano, G Valmadre, D Ferrara, E Veltri, C Codignola, and R Labianca. FOLFIRI as second-line chemotherapy

for advanced pancreatic cancer: a GISCAD multicenter phase II study. *Cancer Chemotherapy Pharmacol*, **69**(6):1641–1645, 2012.

Anhang B.

Ergänzende wissenschaftliche Daten

Klonierung

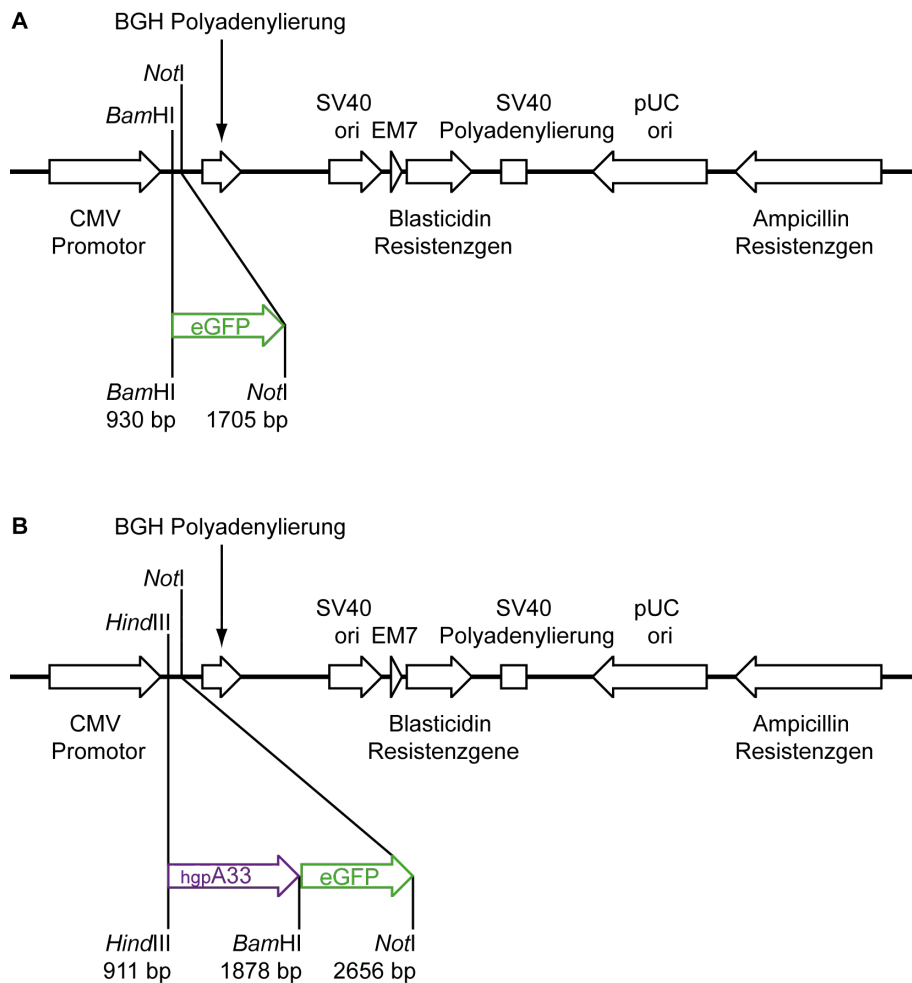


Abb.I. (A) Die linearisierte Darstellung des eGFP-pcDNA6 B Vektors gibt einen Überblick über die Vektorkomponenten und die Insertion der cDNA des *enhanced Green Fluorescent Protein* (eGFP). Dieser Vektor wurde als Grundlage für die Klonierung des hgpA33-eGFP-pcDNA6 B Vektors und auch als Kontrollvektor für die Transfektion von murinen Kolonkarzinomzellen verwendet. **(B)** Die Klonierung des hgpA33-eGFP-pcDNA6 B Vektors erfolgte stufenweise, zunächst durch die Amplifikation der cDNA des humanen Glykoprotein A33 (hgpA33) mit den Primern 5'-gpA33full*T-eGFP cloning forw und 3'-BGH zur Einführung der Restriktionsendonuclease-Schnittstelle BamHI. Im Anschluss daran erfolgte ein Restriktionsendonuclease-Verdau des PCR-Produktes und des Ausgangsvektors (A) mit *HindIII* und *BamHI*. Durch die Ligation des verkürzten PCR-Fragmentes mit dem Vektor (A) wurde dieser um 976-Basenpaare vergrößert.

Anhang C.

Ergänzende personenbezogene Daten

Aus Gründen des Datenschutzes ist der Lebenslauf in der Online-Version der Dissertation nicht enthalten.

Eigene wissenschaftliche Publikationen

Artikel

Targeted tumor therapy with a fusion protein of an anti-angiogenic human recombinant scFv and yeast cytosine deaminase.

N Schellmann, H Panjideh, P Fasold, D Bachran, C Bachran, PM Deckert, H Fuchs.
J Immunother. 2012 Sep;35(7):570-8.

A lysine-free mutant of epidermal growth factor as targeting moiety of a targeted toxin.

C Bachran, S Schneider, SB Riese, D Bachran, R Urban, **N Schellmann**, C Zahn, M Sutherland, H Fuchs.

Life Sci. 2011 Jan 31;88(5-6):226-32. Epub 2010 Nov 19.

Targeted enzyme prodrug therapies.

N Schellmann, PM Deckert, D Bachran, H Fuchs, C Bachran.

Mini Rev Med Chem. 2010 Sep;10(10):887-904. Review.

The distribution of saponins in vivo affects their synergy with chimeric toxins against tumours expressing human epidermal growth factor receptors in mice.

C Bachran, A Weng, D Bachran, SB Riese, **N Schellmann**, MF Melzig, H Fuchs.

Br J Pharmacol. 2010 Jan 1;159(2):345-52. Epub 2009 Dec 15.

Saponins as tool for improved targeted tumor therapies.

H Fuchs, D Bachran, H Panjideh, **N Schellmann**, A Weng, MF Melzig, M Sutherland, C Bachran.

Curr Drug Targets. 2009 Feb;10(2):140-51. Review.

Poster Präsentationen

Complete regression of human gpA33-positive colon carcinoma in a murine model by a recombinant fusion protein ADEPT-system

N Schellmann, H Fuchs, PM Deckert
DGHO, Stuttgart, 2012

On the road to success with the antibody-directed enzyme prodrug therapy

N Schellmann, H Fuchs, PM Deckert
Emerging Concepts in Cancer, Berlin, 2012

A novel fusion protein for antibody-directed enzyme prodrug therapies

N Schellmann, H Fuchs, PM Deckert
DGHO, Basel, 2011

Targeted Tumor Therapy with the Recombinant Fusion Protein A33scFv::CDy

N Schellmann, H Panjideh, C Bachran, PM Deckert, H Fuchs.
4th Fabisch-Symposium for Cancer Research and Molecular Cell Biology, 2nd Targeted
Tumor Therapies, Berlin, 2009

In vivo efficacy of scFvA33::CDy as a treatment of colorectal cancer

N Schellmann, H Panjideh, C Bachran, H Fuchs.
15th International AEK Cancer Congress, Berlin, 2009

Vorträge

Targeting of Solid Tumors by Antibody-directed Enzyme Prodrug Therapies.

N Schellmann, H Fuchs, PM Deckert
8th Fabisch-Symposium for Cancer Research and Molecular Cell Biology, 3rd Targeted
Tumor Therapies, 2012, Berlin

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit versichere ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig und unter ausschließlicher Verwendung der angegebenen Literatur und Hilfsmittel erstellt habe.

Diese Arbeit wurde bisher keiner anderen Prüfungsbehörde in gleicher oder ähnlicher Form vorgelegt und auch nicht veröffentlicht.

Nicole Schellmann

Berlin, Oktober 2012

Danksagung

Es ist die Danksagung, die man als aller letzte Zeilen einem Schriftstück anfügt, das über einen Zeitraum hinweg an den Ratschlägen anderer gewachsen ist. Diese Ratschläge haben mein Wissen erweitert und auch mich wachsen lassen. Dabei denke ich vor allem an Hendrik und eine grüne Tür, die mir immer offen stand. Hier lernte ich was die Wissenschaft, über die Biochemie hinaus, zu bieten hat und das der Reiz des Forschens darin begründet ist, dass es eine Vielzahl von Möglichkeiten gibt einen Sachverhalt zu beleuchten.

Mir fallen viele Wegbegleiter ein, am Anfang stand hier Hossein, der mir eine Verknüpfung meiner theoretischen Kenntnisse mit der praktischen Anwendung im Forschungslabor ermöglichte. Mein Dank gebührt hier auch Patricia, die mich stets unterstützte und das ADEPT-Team mit ihrem Engagement vorantrieb. Während meiner Zeit im Labor begegnete ich den verschiedensten Hürden, die sich durch Rücksprache mit den *alten Laborhasen* Sebastian und Luise in der Regel immer schnell überwinden ließen.

Aus Kollegen werden Freunde und so hat auch Christopher, über die Ländergrenzen hinweg, mit seiner Zielstrebigkeit und seinen vielseitigen Tipps zum Erfolg dieser und anderen Arbeiten beigetragen. Diese Art der Zusammenarbeit habe ich sehr schätzen gelernt und möchte mich daher hier im Besonderen dafür bedanken.

Ich möchte mich auch für die anfeuernden Worte von Alex, Diana und Roland bedanken, die diesen Weg schon gegangen sind, mitfühlten und stets ein Ohr für mich offen hatten. Auch danke ich allen fleißigen Lesern, die mich aufgrund vermeintlicher Tippfehler durch die Sprachbarriere in den verschiedenen Fachgebieten gelegentlich zum Schmunzeln brachten. Mit großem Dank sei hierbei gedacht an Björn, Gerhard, Karsten, Linda und Stefan. Neben den hilfreichen Korrekturvorschlägen möchte ich mich auch für die Unterstützung durch praktische Tipps und Hinweise während meiner Arbeit bei Sebastian und Jörg bedanken. Hier sei auch an Claudia und die Ecklabor-Insel gedacht, mit der ein weiterer Meilenstein erreicht wurde.

Mein persönlicher Einsatz für diese Arbeit gründete auf der Überzeugung, dass man in einer Sache dann aufgeht, wenn man für sie lebt. So habe ich hierfür, mit der Unterstützung einer wichtigen Person an meiner Seite, viel investiert. In diesem Zusammenhang danke ich Fabian vor allem dafür, dass er mir den Rücken freihielt und mich darin bestärkte an meiner Überzeugung festzuhalten.

Die allgemeine Auffassung einer Danksagung beinhaltet, dass man sich als Autor mit dankenden Worten an all diejenigen erinnert, die zur erfolgreichen Vollendung des besprochenen Werkes beitrugen. Hierbei möchte ich, als Autor, anmerken, dass diese Erinnerung unter Umständen nicht immer sofort gelingt und so schließe ich diesen Text mit den Worten, es sei auch an diejenigen gedacht deren Namen hier keine Tinte verbrauchten.