

Aus der Klinik für Innere Medizin IV mit den Schwerpunkten
Nieren- und Hochdruckkrankheiten
(Direktor: Prof. Dr. med. Ulrich Kunzendorf)
im Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Campus Kiel
an der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

**CHARAKTERISIERUNG DER WIRKMECHANISMEN
THERAPEUTISCHER IgG- ANTIKÖRPER GEGEN DEN
EPIDERMALEN WACHSTUMSFAKTOR- REZEPTOR (EGF-R)**

Inauguraldissertation

zur

Erlangung der Doktorwürde
der Medizinischen Fakultät

der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel



vorgelegt von

KAI ROSSEN

aus Husum

Kiel

2013

1. Berichtstatter: Priv.-Doz. Dr. med. Michael Dechant

2. Berichtstatter: Prof. Dr. med. Martin Gramatzki

Tag der mündlichen Prüfung: 09.01.2014

Zum Druck genehmigt: Kiel, den 13.11.2013

gez. Prof. Dr. med. Johann Roider

(Vorsitzender der Prüfungskommission)

Meinen Eltern

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	VI
1. Einleitung	1
1.1 Der Epidermale Wachstumsfaktor-Rezeptor (EGF-R)	1
1.1.1 Rezeptortyrosinkinasen.....	1
1.1.2 Struktur.....	2
1.1.3 Aktivierung.....	3
1.1.4 Signalwege.....	5
1.1.6 Tumorthherapie.....	8
1.2 Therapeutische Antikörper	9
1.2.1 Wirkmechanismen.....	11
1.2.2 Nebenwirkungen.....	16
1.2.3 Zugelassene EGF-R-Antikörper.....	16
1.2.3.1 Nimotuzumab.....	16
1.2.3.2 Cetuximab.....	17
1.2.3.3 Panitumumab.....	17
1.3 Fragestellung.....	18
2. Materialien und Methoden	19
2.1 Materialien	19
2.2 Methoden	19
2.2.1 Zellkultur.....	19
2.2.2 Immunfluoreszenzen.....	20
2.2.2.1 Hemmung der Ligandenbindung.....	21
2.2.2.2 Bestimmung überlappender Epitope.....	22
2.2.2.3 Quantitative Durchflußzytometrie.....	22
2.2.3 MTT.....	23
2.2.4 Western Blot.....	24
2.2.4.1 Proteinisolierung.....	24
2.2.4.2 Proteinkonzentrationsbestimmung.....	24
2.2.4.3 Blotting und Entwicklung.....	25
2.2.5 Isolation von Immunzellen.....	26
2.2.6 ADCC und CDC.....	27
2.2.7 Lichtmikroskopie.....	28
2.2.8 Darstellung der Daten und statistische Auswertung.....	28
3. Ergebnisse	29
3.1 Bindungsstudien.....	29
3.2 Blockade der Ligandenbindung.....	32
3.3 Beeinflussungen der Signalwege des EGF-R.....	33
3.4 Hemmung des Zellwachstums.....	36
3.5 ADCC.....	38
3.7 CDC.....	44
4. Diskussion	48
5. Ausblick	56
6. Zusammenfassung	57
7. Abbildungsverzeichnis	69

8. Anhang	70
8.1 Zellen.....	70
8.2 Kulturmedien	70
8.3 Antikörper.....	71
8.4 Reagenzien.....	72
8.5 Lösungen und Puffer	73
8.6 Kits	74
8.7 Geräte.....	74
8.8 Verbrauchsmaterialien	75
8.9 Software.....	76
Danksagung	77
Curriculum vitae	78
Publikationsliste	79

Abkürzungsverzeichnis

A	Ampere
α	alpha
Abb	Abbildung
ADCC	Antikörper- Abhängige- zelluläre Zytotoxizität
ADP	Adenosindiphosphat
AK	Antikörper
Aqua dest.	Destilliertes Wasser
ATP	Adenosintriphosphat
ATCC	American Type Culture Collection
BCA	Bicinchoninsäure
BSA	Bovines Serum Albumin
Ca ²⁺	Calcium
CD	Cluster of Differentiation
CDC	Komplement-abhängige Zytotoxizität
CDR	Complementarity Determining Regions
C _H	konstante schwere Kette
C _L	variable schwere Kette
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
Cpm	Counts per minute
Cu ²⁺	Kupfer
d	Tag
Da	Dalton
DAG	Diacylglycerol
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DSMZ	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen
EGF	Epidermal Growth Factor
EGF-R	Epidermal Growth Factor Receptor
Elk	E twenty-six (ETS)-like transcription factor
ERK	extracellular regulated kinase
E:T	Effectorzelle:Targetzelle
F(ab)	Antigenbindende Fragment
FACS	fluorescence activated cell sorting
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
Fc	Fragment crystallizable
FCS	Fötales Kälberserum
Fc-R	Fc-Rezeptor
g	Gramm
γ	gamma
Gab-1	GRB2-associated binder 1
GM-CSF	Granulocyte macrophage colony-stimulating factor
GRB2	Growth factor receptor binding protein 2
GTP	Guanosin Triphosphat
h	Stunde
H	schwere Kette
H ₂ O	Wasser
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
HER	human epidermal receptor
HB-EGF	heparin-binding-epidermal growth factor

Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
IP3	Inositol 1,4,5-triphosphat
JAK	Janus kinase
κ	kappa
k	Kilo
KLH	Keyhole Limpet Hemocyanin
λ	lambda
L	leichte Kette
M	Molar
mAB	monoklonaler Antikörper
MAP	Mitogen-aktivierte-Phosphokinase
MEM	Minimum Essential Medium
MFI	mittlere Fluoreszenzintensität
mg	Milligramm
min	Minute
ml	Milliliter
mV	Millivolt
μg	Mikrogramm
μl	Mikroliter
MNC	mononuclear cells
NaCl	Natriumchlorid
ng	Nanogramm
nm	Nanometer
OH ⁻	Hydroxidation
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PBS	phosphate buffered saline
pH	pondus Hydrogenii
PI3K	Phosphatidylinositol-3-Kinase
PIP2	Phosphatidylinositol-4,5-Bisphosphat
PKC	Proteinkinase C
PLC	Phospholipase C
PVDF	Polyvinylidenfluorid
PMN	polymorphonuclear leukocytes
pY	phosphorylierter Tyrosinrest
RFI	relative Fluoreszenzintensität
RPMI	Roswell Park Memorial Institute Medium
RTK	Rezeptortyrosinkinasen
SDS	Sodiumdodecylsulfat
sek	Sekunde
siRNA	Small interfering Ribonukleinsäure
Sos	son of sevenless Protein
STAT	Signaltransduktoren-und-Aktivatoren-der-Transkription
TGF	Tumor Growth Factor
TKI	Tyrosinkinaseinhibitor
U/min	Umdrehungen pro Minute
UV	Ultraviolett
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor
V _L	variable leichte Kette
V _H	variable schwere Kette
z.B.	zum Beispiel

Das Wachstum und die Funktionen lebender Zellen eines Organismus unterstehen einem komplexen System molekularbiologischer Prozesse, die einer ständigen Kontrolle und Regulation bedürfen. Dabei muss jede Zelle mit ihrer Umgebung kommunizieren und auf verschiedene Signale reagieren können. Um dies zu bewerkstelligen, werden Veränderungen über Oberflächenrezeptoren von der Zelle registriert und über intrazelluläre Signalketten verarbeitet. Auf diese Weise können wichtige Prozesse wie Wachstum, Differenzierung, Tod, Adhäsion und Stoffwechsel der Zellen gesteuert werden. Eine Störung dieser komplexen Organisation kann zu Veränderungen gesunder Zellen und damit zur Tumorentstehung führen. Der epidermale Wachstumsfaktor-Rezeptor (Epidermal growth factor receptor; EGF-R) aus der Familie der Rezeptortyrosinkinasen (RTK) spielt eine große Rolle in der Weiterleitung von Wachstumssignalen und ist so maßgeblich an der Entstehung und dem Wachstum solider Tumoren beteiligt. Daher steht der EGF-R seit vielen Jahren im Mittelpunkt der Tumorforschung und bei der Entwicklung neuer therapeutischer Ansätze.

1. Einleitung

1.1 Der Epidermale Wachstumsfaktor-Rezeptor (EGF-R)

1.1.1 Rezeptortyrosinkinasen

RTK sind membranständige Rezeptoren, die meist als Monomere vorkommen [1]. Strukturelle Unterschiede der Rezeptoren führten zur Einteilung in 20 verschiedene Unterfamilien [2]. Dazu gehören unter anderem der Plättchen-Wachstumsfaktor-Rezeptor (PDGF-R), der Fibroblasten-Wachstumsfaktor-Rezeptor (FGF-R), die Insulin-Rezeptoren, der Vascular Endothelial Growth Factor-Rezeptor (VEGF-R) und die Familie der humanen epidermalen Rezeptoren (HER) oder ErbB-Rezeptoren, die aus vier Mitgliedern besteht: ErbB1 (EGF-R), ErbB2 (Neu/HER2), ErbB3 (HER3) und ErbB4 (HER4). Mit Ausnahme von ErbB 3 verfügen diese Rezeptoren über eine intrazelluläre Tyrosinkinasedomäne [3, 4]. Der Name „ErbB“ geht auf das virale Onkogen „erbB“ des *Erythroblastosis Virus* zurück [5, 6].

1.2 Struktur

Der EGF-R wurde 1961 erstmals von S. Cohen als erste Rezeptortyrosinkinase beschrieben [7, 8]. Er hat ein Molekulargewicht von 170 kDa und umfasst 1186 Aminosäuren. Wie andere RTK besteht er aus einem extrazellulären und einem intrazellulären Bereich sowie einer transmembranen und einer juxtamembranen Domäne. Der extrazelluläre Bereich bindet den Liganden und ist in vier Domänen I-IV unterteilt (Abbildung 1). Die Domänen I und III werden auch als L1 und L2 (leucinreich) und die Domänen II und IV als CR1 und CR2 (cysteinreich) bezeichnet [9]. L1 und L2 dienen als Ligandenbindungsdomänen [10], die Domänen CR1 und CR2 hingegen als Regulatoren der Rezeptordimerisierung (Vereinigung zweier Monomere). Die transmembrane Domäne besitzt eine alpha-helikale Struktur und verbindet den extrazellulären mit dem intrazellulären Anteil des Rezeptors. Die juxtamembrane Domäne dient der Regulation der Tyrosinkinaseaktivität, der Herabregulierung des EGF-R und der Internalisierung [11]. Der intrazelluläre Bereich besteht aus einer Tyrosinkinase mit einer Aktivierungsschleife, ATP- und Substratbindungsstellen und einem C-terminalem Ende mit Tyrosinresten, die nach Dimerisierung des Rezeptors phosphoryliert werden können und auf diese Weise Signalwege in der Zelle anschalten [12]. Die bedeutende Rolle der Rezeptoren aus der EGF-R-Familie zeigt sich auch daran, dass sie bei verschiedenen Lebewesen, wie bei der Fruchtfliege *Drosophila melanogaster* zu finden und damit evolutionär hoch konserviert sind [13].

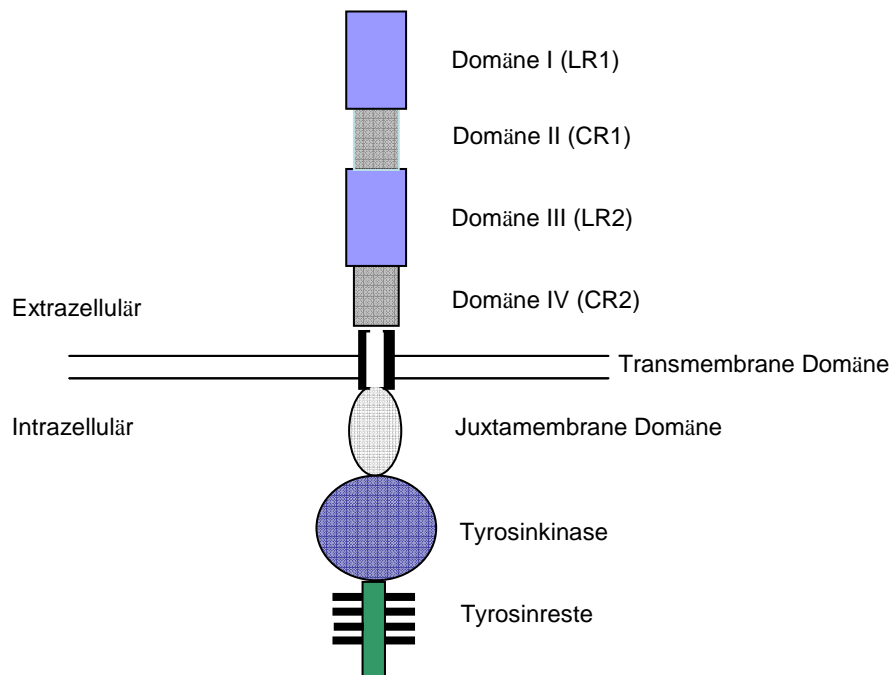


Abbildung 1. Aufbau des EGF-R. Der EGF-R verfügt über einen extrazellulären Bereich, der in vier Domänen I-IV unterteilt ist und für die Ligandenbindung und die Dimerisierung zuständig ist. Die transmembrane Domäne verbindet den extrazellulären mit dem intrazellulären Anteil des Rezeptors. Der intrazelluläre Bereich besteht aus der juxtamembranen Domäne, die der Regulation der Tyrosinkinaseaktivität dient, der Tyrosinkinasedomäne und dem zytosolischen Endstück, über die intrazelluläre Signalkaskaden aktiviert werden (modifiziert nach Ciardiello, 2008).

1.1.3 Aktivierung

Die bereits erwähnte Liganden-induzierte Dimerisierung des EGF-R führt zu einer Änderung der Konformation der extrazellulären Domänen. Für die Aktivierung sind eine Reihe von Liganden bekannt: EGF (Epidermal growth factor), Amphiregulin, TGF- α (Transforming growth factor), HB-EGF (Heparin-binding-EGF), β -Cellulin und Epiregulin. Alle Liganden zeichnen eine vergleichbare Struktur aus: Sie besitzen drei Aminosäureschleifen, die über drei Disulfidbrücken miteinander verbunden sind [14]. Im Gegensatz zu den übrigen Liganden besitzt Epiregulin allerdings eine geringere Affinität für den EGF-R [15]. Entscheidend für die Ausbildung der Rezeptordimere ist die extrazelluläre Domäne II, durch die zwei an EGF gebundene Rezeptormonomere miteinander in Wechselwirkung treten können [14]. Durch Deletionen oder Mutationen in dieser Region kann die Dimerisierung verhindert werden [16]. Wenn die Monomere des EGF-R nicht an EGF gebunden sind, wird

deren Dimerisierung durch die intramolekulare Wechselwirkung zwischen Domäne II und IV verhindert (Autoinhibition). 95% der EGF-R Rezeptoren liegen in dieser so genannten inaktiven („tethered“) Konformation vor. 5% der Rezeptoren befinden sich in der aktiven („unthethered“) Konformation, bei der die Domäne I um 130° gegenüber der Domäne III verlagert ist. Dies führt dazu, dass Liganden simultan an den Domänen I und III binden können und die Domäne II frei zugänglich ist. Durch die Interaktion zwischen Rezeptor und Ligand kommt es zu einer Stabilisierung der aktiven Konformation, so dass eine Dimerisierung von zwei Rezeptormonomeren über die Domäne II möglich ist (Abbildung 2). Die Anwesenheit von Liganden verändert also das Gleichgewicht zu Gunsten der aktiven Konformation. [17, 18].

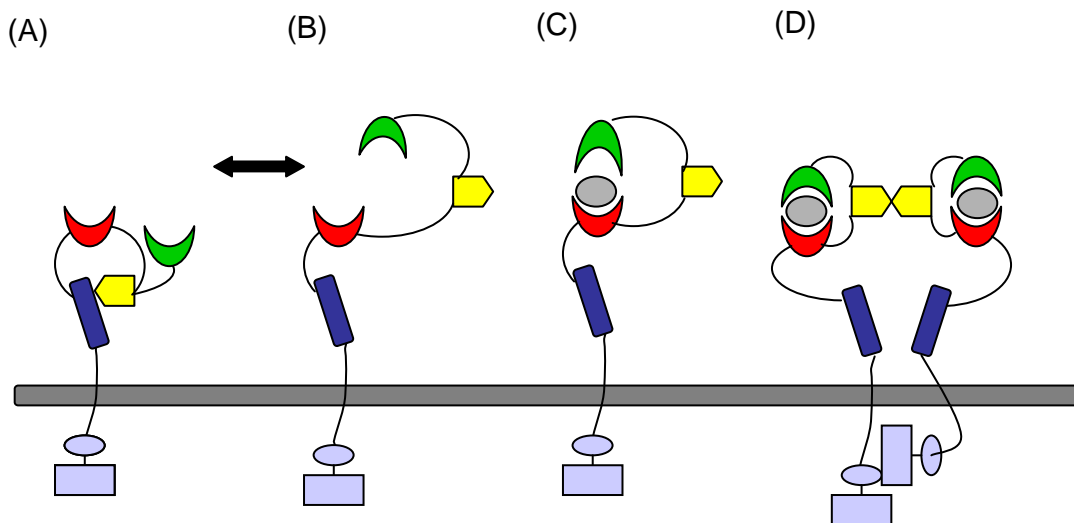


Abbildung 2. Dimerisierung des EGF-R. (A) Rezeptoren ohne gebundene Liganden liegen in der inaktiven („tethered“) Konformation vor, die die Dimerisierung durch Wechselwirkungen zwischen Domäne II und IV verhindert. (B) 5% der Rezeptoren befinden sich der aktiven („unthethered“) Konformation, die zu einer Verlagerung der Domäne I um 130° gegenüber der Domäne III führt. (C) Liganden binden in der aktiven Konformation an die Domänen I und III, so dass die diese Konformation stabilisiert wird und die Domäne II frei liegt. (D) Die Dimerisierung zweier Rezeptoren findet über die Domäne II statt, wobei die intrazelluläre Tyrosinkinase ein asymmetrisches Dimer mit ihrem Gegenpart bildet.

Domäne I= grün; Domäne II= gelb; Domäne III= rot, Domäne IV= blau; Tyrosinkinase = hell blau; EGF= grau (modifiziert nach Peipp, 2008).

1.1.4 Signalwege

Die EGF-R-Dimerisierung führt zur Aktivierung des Rezeptors. Dabei kommt es zu einer Phosphorylierung der spezifischen Tyrosinreste am C-terminalen Ende, indem Phosphatgruppen von ATP auf die Hydroxylgruppe von Tyrosin übertragen werden. Die Tyrosinkinase ist somit in der Lage, nach Aktivierung sich selbst (Autophosphorylierung), einen anderen EGF-R (nach Homodimerisierung), ein anderes Mitglied der ErbB-Familie (nach Heterodimerisierung) und verschiedene Substrate zu phosphorylieren, die dann wiederum eine Vielzahl von Signalwegen in Gang setzen (Abbildung 3) [19]. So dient der phosphorylierte Tyrosinrest pY1068 als Andockstelle für das Adapterprotein GRB2 (Growth factor receptor binding protein 2). Durch GRB2 kommt es zur Aktivierung des G-Proteins Ras [20]. Dabei wird das inaktive Ras-Protein, d.h. Ras in der GDP-gebundenen (Guanosin Diphosphat) Form, durch die Interaktion mit dem Protein Sos (son of sevenless Protein) in seine aktive, d. h. GTP-gebundene (Guanosin Triphosphat) Form überführt [21]. Ras wiederum aktiviert die Serin/Threonin-Kinase Raf, welche über die MAP-Kinase (Mitogen-aktivierte-Kinase) schließlich ERK1 und ERK2 (Extracellular signal-regulated kinases) stimuliert [22]. Verschiedene Transkriptionsfaktoren (wie Elk-1 und c-fos) werden auf diese Weise aktiviert und führen vor allem zu Wachstum und Differenzierung der Zellen [23, 24]. Weiterhin kann das Protein Gab1 an pY1068 binden, was zur Aktivierung der Lipidkinase PI3-K (Phosphatidylinositol-3-Kinase) führt. PI3-K wandelt PIP2 (Phosphoinositol 4,5-bisphosphat) zu PIP3 (Phosphoinositol 4,5-triphosphat) um, das das Protein Akt stimuliert. Auf diese Weise werden sowohl die Proteinbiosynthese als auch anti-apoptotische Effekte beeinflusst [25, 26].

Der phosphorylierte Tyrosinrest pY1173 dient hauptsächlich als Andockstellen für die PLC γ 1 (Phospholipase-C- γ 1), die nach ihrer Aktivierung durch den Rezeptor die intrazellulären Botenstoffe PIP2 (Phosphatidylinositol-4,5-Bisphosphat) zu IP3 (Inositol 1,4,5-triphosphat) und DAG (Diacylglycerol) hydrolysiert. IP3 führt zur Freisetzung von Kalzium-Ionen aus dem endoplasmatischen Retikulum und zur Aktivierung von Kalzium-abhängigen Enzymen, während DAG die Proteinkinase C (PKC) aktiviert [27]. PKC stimuliert entweder Ras-unabhängig ERK1/2 oder reguliert über einen negativen Feedback-Mechanismus die Tyrosinkinaseaktivität des Rezeptors herunter [28, 29].

Neben diesen wichtigen Signalkaskaden können eine Reihe von Proteinen direkt durch den EGF-R aktiviert werden, wie die zytoplasmatische Tyrosinkinase Src und

Signalmoleküle wie Jak (Janus kinase) und STAT (Signal transducer and activator of transcription) [30]. STAT z.B. kontrolliert die Transkription von Genen, die für die Regulation des Zellzyklus, der Angiogenese und der Apoptose verantwortlich sind [31, 32]. Src besitzt die Fähigkeit, Tyrosinreste des EGF-R zu aktivieren. Dazu gehören Y845, Y1101 Y820 und Y891. Die Phosphorylierung an Y845 z.B. erhöht die Tyrosinkinaseaktivität des Rezeptors [33].

Im Rahmen dieser Arbeit wurden die Tyrosinreste Y1068 und Y1173 und deren Aktivierung genauer untersucht. Durch die Vielfalt der möglichen Signalwegen nimmt der EGF-R Einfluss auf die Transkription, Translation und den Zellzyklus und reguliert Prozesse wie Wachstum, Proliferation, Entwicklung, Adhäsion, Differenzierung, Angiogenese und Apoptose [34].

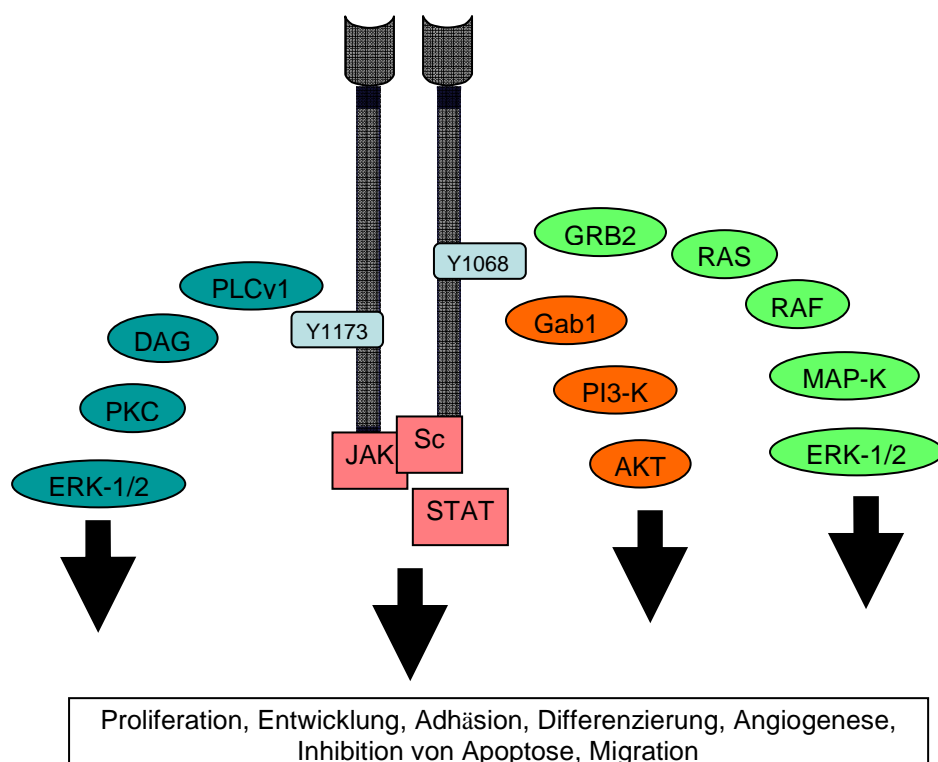


Abbildung 3. Intrazelluläre Signaltransduktion. Die Phosphorylierung des EGF-R bewirkt eine Aktivierung verschiedener Signalwege der Zelle. Die Aktivierung von GRB2 (Growth factor receptor binding protein 2) und MAP-Kinasen (Mitogen-aktivierte-Kinasen) über den Tyrosinrest Y1068 führt zu Differenzierung und Zellzyklusprogression. Der PI3K (Phosphatidylinositol-3-Kinase)-abhängige Signalweg bewirkt Zellwachstum und eine Inhibition der Apoptose. Durch den Tyrosinrest Y1173 wird über PLCγ1 (Phospholipase-C- γ1) Zellwachstum, Differenzierung, Proliferation und Migration induziert (modifiziert nach Ciardiello, 2008).

1.1.5 EGF-R und die Bedeutung bei Tumoren

EGF-Rezeptoren werden in unterschiedlichen epithelialen, mesenchymalen und neuronalen Geweben exprimiert. Sie spielen eine wichtige Rolle bei der Regulierung von Proliferation, Entwicklung, Adhäsion, Differenzierung, Angiogenese, Apoptose und Migration von Zellen, wie z.B. im Gastrointestinal-, Genital- und Respirationstrakt [35, 36]. Die Bedeutung des EGF-R für die Entwicklung vieler Organsysteme, wie z.B. für das Nervensystem, die Haut oder die Lunge ist bei Untersuchungen mit genetisch veränderten Mäusen gezeigt worden. Der Verlust des EGF-R in Mäusen durch Ausschalten der Gene führte zu embryonaler oder perinataler Letalität [37, 38].

Wenn man die kritische Rolle des EGF-R bei der Regulierung der verschiedenen Zellprozesse in gesundem Gewebe betrachtet, verwundert es nicht, dass Störungen in diesem komplexen System zu Hyperproliferation und Tumorentstehung führen können [4, 39, 40]. In Zusammenhang mit Tumoren wurde der EGF-R zum ersten Mal gebracht, als man zeigen konnte, dass der Rezeptor das Homolog des v-erbB Onkogen darstellt [5]. Mittlerweile sind eine Reihe von Veränderungen in Tumoren in Bezug auf den EGF-R bekannt: eine Überexpression des Rezeptors, eine Überproduktion der Liganden, eine Mutation oder Deletion in den Genen des Rezeptors mit anschließender konstitutiver Aktivierung und eine Koexpression verschiedener erbB Rezeptoren [36, 39].

Bei einer Vielzahl von Tumoren lässt sich eine Überexpression bedingt durch Amplifikation des EGF-R nachweisen. Obwohl die Daten variieren, findet man eine Überexpression von EGF-R bei vielen soliden Tumoren: 80 bis 100 % der Kopf- und Nackentumore, 14 bis 91 % der Mammakarzinome, 40 bis 80 % der nicht-kleinzelligen Lungenkarzinome, 40 bis 80 % der Prostatakarzinome, 25 bis 77% der Karzinome des Kolons, 30 bis 50 % der Pankreaskarzinome, 35 bis 50 % der Ovarialkarzinome sowie 40 bis 63 % der Gliome zeigen eine stark erhöhte EGF-R-Expression [41-43]. Dies führt zu einer gesteigerten Aktivierung der intrazellulären Signalwege mit einer deutlich erhöhten Proliferation und einer verstärkten Angiogenese [44, 45]. Eine derartige Erhöhung der Expression kann ebenfalls mit einem fortgeschrittenen Tumorstadium, einer Resistenz gegenüber Chemotherapie, einer hohen Wahrscheinlichkeit für die Bildung von Metastasen oder einer schlechten Prognose für den Patienten korrelieren [35, 46].

In verschiedenen Tumoren mit Überexpression des EGF-R tauchen zudem Mutation bzw. Deletionen auf. Eine häufige Mutation in humanen Tumoren ist die Variante III (EGF-R vIII), bei der die extrazellulären Domänen I und II (AS 6-273) fehlen und der Rezeptor somit nicht mehr zur Ligandenbindung fähig ist. Durch Dimerisierung mit anderen Mitgliedern der Rezeptor-Familie ist EGF-R vIII dennoch konstitutiv aktiviert. Sowohl bei Glioblastomen als auch bei Mamma- und Prostatakarzinomen wurde EGF-R vIII gefunden [47]. Eine Mutation im *Kras*-Gen von Tumorzellen bewirkt eine Resistenz gegen EGF-R gerichteter Therapie, indem das mutierte KRAS zu einer Liganden-unabhängigen Aktivierung der EGF-R Signalwege führt [48, 49].

Ein weiterer Prozess in der Tumorinduktion ist die autonome Überproduktion der EGF-R-Liganden, wie z.B. TGF- α und EGF. Diese Wachstumsfaktoren werden teilweise von Zellen mit erhöhter EGF-R Expression unkontrolliert selbst gebildet, so dass es zu einer Autostimulation kommt [50, 51]. Es konnte gezeigt werden, dass die Überproduktion des EGF-R-Liganden TGF- α im Mammaepithel von Mäusen mit der Entstehung von Mammakarzinomen korreliert [52].

Eine Koexpression von verschiedenen Rezeptoren der erbB-Familie konnte in verschiedenen Tumoren identifiziert werden. Die gleichzeitige Expression von EGF-R und Her-2 findet sich bei 38% der Brusttumoren und korreliert mit einer schlechteren Prognose für die Patienten. Der EGF-R und ErbB4 Rezeptor finden sich ebenfalls in vielen Tumoren koexprimiert, was zu einer verstärkten Proliferation führen kann [42, 53, 54]. Aufgrund all dieser Veränderungen ist der EGF-R ein relevantes Ziel in der spezifischen Therapie von soliden Tumoren.

1.1.6 Tumorthherapie

Generell basieren Tumorthapien auf der operativen Entfernung und/oder auf einer unselektiven Zerstörung des malignen Gewebes. Dies führt allerdings zu einer Reihe unerwünschter, teilweiser gravierender Nebenwirkungen. Aus diesem Grund wird verstärkt daran gearbeitet, immer spezifischere und verträglichere therapeutische Ansätze zu entwickeln. Dabei rückt der EGF-R vermehrt in den Mittelpunkt des Interesses, da seine Bedeutung für die Entstehung und das Wachstum solider Tumoren mehr und mehr verstanden wird. Es existieren bereits verschiedene Ansätze, die den EGF-R als Zielstruktur haben und zum Teil bereits klinische Anwendung finden: Tyrosinkinaseinhibitoren (TKI, „small molecule inhibitors“),

siRNA oder Antisense-Oligonukleotide, Konjugate aus EGF-R Liganden und Toxinen und monoklonale Antikörper.

TKI sind kleine chemische Moleküle, die reversibel die ATP-Bindungsstelle an der Tyrosinkinase des Rezeptors blockieren und so die Aktivität des Rezeptors spezifisch hemmen. Erlotinib (Tarceva[®], Roche) and Gefitinib (Iressa[®], AstraZeneca) sind zwei Beispiele für die Gruppe der TKI, die bei der Therapie des Nicht-kleinzelligen Lungenkarzinoms zugelassen sind [4, 55, 56].

Ein weiterer Ansatz ist die Herstellung von Konjugaten bestehend aus Liganden für den EGF-R (z.B. EGF oder TGF- α) und einem Toxin. Auf diese Weise gelangen Toxine oder Wirkstoffe spezifisch zu den Tumorzellen und werden internalisiert [57, 58].

SiRNA (small interfering RNA) oder Antisense-Technik können gezielt die mRNA des EGF-R blockieren und regulieren auf diese Weise die Translation des Rezeptors herab [59].

Eine aussichtsreiche Strategie derzeit ist die Entwicklung monoklonaler Antikörper (mAb), die gegen die extrazelluläre Domäne des EGF-R gerichtet sind. Beispiele aus der klinischen Anwendung sind Cetuximab (EGF-R; Erbitux[®]), Panitumumab (EGF-R; Vectibix[®]), Trastuzumab (HER2/neu; Herceptin[®]) oder Nimotuzumab (EGF-R; Theraloc[®]) [60, 61].

1.2 Therapeutische Antikörper

Antikörper sind Proteine aus der Klasse der Globuline. Sie werden von B-Lymphozyten gebildet und sind wesentlicher Bestandteil der Immunantwort eines Organismus. Antikörper binden dabei mit ihrer Bindungsstelle sehr spezifisch an einen bestimmten Bereich des Antigens (Epitop), analog dem Schlüssel-Schloss-Prinzip. Es gibt verschiedene Antikörper-Isotypen: Immunglobuline G (IgG), M (IgM), D (IgD), A (IgA) und E (IgE). Die einzelnen Isotypen unterscheiden sich in Struktur, Vorkommen und Halbwertszeiten. Die Möglichkeit, Immunglobuline therapeutisch einzusetzen, besteht noch nicht sehr lange. Die Entdeckung von Köhler und Milstein im Jahre 1975, Hybridomzellen durch Zellfusion von B-Lymphozyten und Myelomzellen herzustellen, machte die Produktion von so genannten monoklonalen Antikörpern im Maussystem möglich. Dazu wird zunächst eine Maus einem gewünschten Antigen ausgesetzt. Aufgrund der Immunantwort kommt es zur Bildung von B-Lymphozyten, die gegen das Antigen gerichtete Antikörper

produzieren. Die B-Lymphozyten werden aus der Milz isoliert und mit Zellen einer aus einem Myelom (Plasmozytom) gewonnenen Zelllinie fusioniert. Es entstehen so genannte Hybridomzelllinien. Diese Hybridomzellen vereinigen die Eigenschaften ihrer Ursprungszellen: Sowohl die Produktion spezifischer Antikörper - Charakteristikum der B-Lymphozyten- als auch das unbegrenzte Wachstum - Charakteristikum der Myelomzelllinie- finden sich in diesen Zellen wieder. Für die Produktion des monoklonalen Antikörpers wird die Hybridomzelllinie ausgewählt, die am besten das gewünschte Epitop auf dem Antigen bindet [62]. Erste klinische Versuche mit murinen monoklonalen Antikörpern waren aber aufgrund der Immunogenität nicht sehr erfolgreich [63]. In den folgenden Jahren der Weiterentwicklung schaffte man es durch gentechnischen Veränderungen (Genetic engineering), dem menschlichen System verwandtere monoklonale Antikörper mit geringerer Immunogenität und zudem besseren Affinitäten, längeren Halbwertszeiten und optimierten Wirkungsmechanismen herzustellen [64]. Durch die rasanten Entwicklungen auf diesem Gebiet ist heute eine Reihe von EGF-R gerichteter monoklonaler Antikörper im klinischen Gebrauch oder in klinischen Testphasen.

Monoklonale Antikörper, die derzeit klinisch eingesetzt werden, gehören der Klasse (Isotyp) der Immunglobuline G (IgG) an. Jedes IgG besteht aus zwei identischen schweren Ketten (*heavy chains*, H) und zwei identischen leichten Ketten (*light chains*, L), die durch Disulfidbrücken zu einer Y-förmigen Struktur miteinander verbunden sind. Die leichten Ketten bestehen aus jeweils einer variablen und einer konstanten Region. Bezeichnet werden diese als V_L und C_L . Die schweren Ketten hingegen haben jeweils eine variable und 3 konstante Regionen V_H , C_{H1} , C_{H2} und C_{H3} . Teile der variablen Regionen (CDR, Complementarity Determining Regions) der leichten und der schweren Kette bilden zusammen die Antikörperbindungstelle. Die beiden Leichtketten (Typ κ oder λ) bilden zusammen mit dem oberhalb der Gelenkregion liegenden Anteil der schweren Ketten das Antigenbindende Fragment F(ab). Der darunter liegende Anteil ist das Fc Fragment (siehe Abbildung 4). Weiterhin werden chimäre, humanisierte, humane und murine monoklonale Antikörper unterschieden. Chimäre monoklonale Antikörper wie Cetuximab (EGF-R; Erbitux[®]), Rituximab (CD20; MabThera[®]) oder Infliximab (Tumor Necrosis Factor α ; Remicade[®]) bestehen aus murinen variablen Regionen (V_L und V_H) und humanen konstanten Regionen. Humanisierte monoklonale Antikörper wie Nimotuzumab

(EGF-R; Theraloc®) oder Trastuzumab (HER2/neu; Herceptin®) besitzen nur noch murine CDR, der Rest des Antikörpers ist dagegen humanen Ursprungs. Für die Herstellung komplett humaner monoklonaler Antikörper wie Panitumumab (EGF-R; Vectibix®) werden spezielle genetisch veränderte Mäuse eingesetzt [61].

Der Isotyp IgG wird noch weiter in die Subklassen IgG 1, 2, 3 und 4 unterteilt. Diese Subtypen unterscheiden sich in ihrer Halbwertszeit, ihrer Fähigkeit, das Komplementsystem zu aktivieren und durch ihre Bindung an die Fcγ-Rezeptor der Effektorzellen [60, 65].

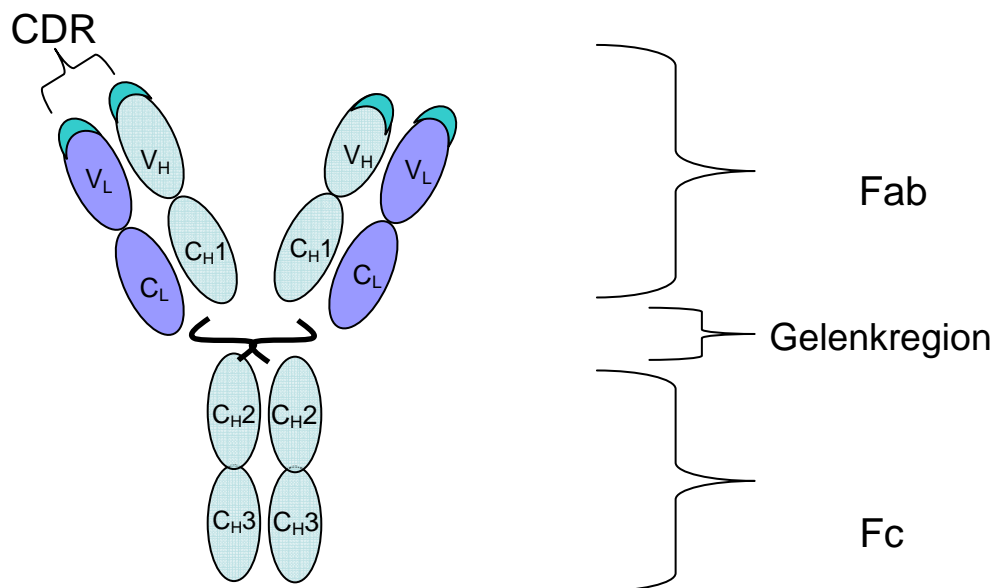


Abbildung 4. Struktureller Aufbau des Immunglobulins IgG. Jedes IgG besteht aus zwei identischen schweren Ketten (heavy chains, H) und zwei identischen leichten Ketten (light chains, L), die durch Disulfidbrücken zu einer Y-förmigen Struktur miteinander verbunden sind. Die leichten Ketten bestehen aus jeweils einer variablen und einer konstanten Region (VL und CL). Die schweren Ketten haben jeweils eine variable und 3 konstante Regionen (VH, CH1, CH2 und CH3). CDR=Antikörperbindungsstelle, Fab=Antigen bindendes Fragment, Fc= Fragment crystallizable

1.2.1 Wirkmechanismen

Wirkmechanismen EGF-R gerichteter monoklonaler Antikörper können unterteilt werden in direkte Mechanismen, die durch den F(ab)-Teil vermittelt werden, und indirekte Mechanismen, die durch den Fc-Teil der Antikörper induziert werden [21]. *In vitro* zeigen monoklonale Antikörper eine Vielfalt verschiedener Wirkmechanismen, *in vivo* ist das Verständnis für die Relevanz dieser einzelnen Mechanismen noch begrenzt [66, 67].

Direkte F(ab)-vermittelte Mechanismen:

1. Blockade der Ligandenbindung

Die Bindung eines therapeutischen Antikörpers an den EGF-R kann zu einer kompetitiven Hemmung der Liganden führen. Falls der Antikörper das Bindungsepitop der Liganden an der Domäne III abschirmt, wird in der Folge die Aktivierung des Rezeptors beeinträchtigt [60].

2. Inhibition der Rezeptor-Dimerisierung

Die räumliche Struktur der Antigene kann ebenfalls die Wirkung der Antikörper beeinflussen. Kristallographische Analysen verschiedener EGF-R Antikörper erbrachten unterschiedliche Bindungsepitope an der Domäne III des EGF-R. Antikörper wie Cetuximab blockieren die Ligandenbindung und verhindern zusätzlich den sterischen Übergang in die aktive Konformation und damit die Dimerisierung, wodurch die Aktivierung der Rezeptoren beeinflusst werden kann [68].

3. Internalisierung

Nach Bindung eines Liganden wird der EGF-R internalisiert (Downregulation). Rezeptor/Liganden Komplexe können auf diese Weise abgebaut (Degradation) und wieder in die Zellmembran rekrutiert werden (Recycling). In Studien konnte aber auch gezeigt werden, dass es zu einer Internalisierung des EGF-R nach Antikörperbindung kommt. Auf diese Weise ist es möglich, die Antikörper und gegebenenfalls mit an den Antikörpern gebundene Wirkstoffe wie Toxine in die Tumorzellen zu schleusen und diese so gezielt zu schädigen [69-72].

4. Inhibition von Signalwegen

Durch die gerade beschriebenen Wirkmechanismen (Bindung an den Rezeptor, Blockade der Ligandenbindung, Beeinflussung der Dimerisierung und Rezeptormodulation) beeinflussen EGF-R gerichtete Antikörper letztendlich intrazelluläre Signalwege. Dabei spielen der MAPK-, der PI3K/Akt-, und der Jak/Stat-Signalweg besondere Rollen in der Signalweiterleitung wichtiger biologischer Funktionen wie Proliferation, Entwicklung oder Differenzierung [3, 70]. EGF-R Antikörper können auf diese Weise Tumorwachstum inhibieren (MAPK-Signalweg) und Apoptose (PI3K/Akt-Signalweg) induzieren [73, 74]. Außerdem inhibieren sie die Produktion von Angiogenese-fördernden Faktoren (VEGF) und

blockieren die Expression von Matrix-Metalloproteinasen, die wichtig für die Tumor Zell-Adhäsion und Metastasierung sind (Jak/Stat-Signalweg) [70, 72].

Indirekte Fc-vermittelte Mechanismen:

Fc-Rezeptoren sind Membranrezeptoren für verschiedene Immunglobulinisotypen: Der Fc α -Rezeptor (CD89) bindet die Fc-Domäne von IgA, der Fc ϵ -Rezeptoren bindet die Fc-Domäne von freiem IgE und der Fc γ -Rezeptor bindet die Fc-Domäne von IgG. Es gibt verschiedene Unterklassen des Fc γ -Rezeptors: im menschlichen System sind dies Fc γ RI (CD64), Fc γ RII (CD32) und Fc γ RIII (CD16). Die beiden letzteren werden zusätzlich in Fc γ RIIIa/ Fc γ RIIIb und Fc γ RIIIa/ Fc γ RIIIb unterteilt. Fc γ RI kommen auf Monozyten/Makrophagen vor, Fc γ RII finden sich auf neutrophilen Granulozyten und Monozyten/Makrophagen, und Fc γ RIII werden hauptsächlich von natürlichen Killerzellen und Monozyten/Makrophagen exprimiert [75]. Dabei zeigen die Fc-Rezeptoren unterschiedliche Affinitäten für die IgG-Isotypen: Fc γ RI binden humanes IgG1 und IgG3, während Fc γ RII mit humanem IgG2 interagieren. Fc γ RIII binden ebenfalls humanes IgG1 und IgG3 [75, 76].

EGF-R Antikörper können im Gegensatz zu TKI ADCC (Antikörper-abhängige zelluläre Zytotoxizität; engl.: antibody-depedent cell mediated cytotoxicity) induzieren, indem sie Effektorzellen wie MNC (monomorphonukleäre Zellen; hauptsächlich natürliche Killerzellen und Makrophagen) oder PMN (polymorphonukleären Zellen; hauptsächlich Granulozyten) rekrutieren. Die monoklonalen Antikörper binden mit ihrer Antigenbindungsstelle an die Tumorzellen, interagieren mithilfe ihres Fc-Teils (CH3-Region) mit den Fc-Rezeptoren der Effektorzellen und vermitteln durch Phagozytose oder Zytolyse Zytotoxizität gegen die Tumorzellen [64, 77]. Granulozyten und Monozyten reagieren auf die Aktivierung durch Antikörper mit der Ausschüttung ihrer Granula und der Freisetzung von radikalen Sauerstoffverbindungen wie Wasserstoffperoxid (H₂O₂) oder Hydroxidation (OH⁻) sowie zytolytischen Enzymen wie Serinproteasen (Elastase), Lactoferrin und Gelatinasen [78, 79]. Natürliche Killerzellen induzieren die Lyse der Zielzellen durch Freisetzung von Perforinen und Granzymen. Diese Stoffe erzeugen durch Komplexbildung Lecks an der Zellmembran [80]. Auch *in vivo* wirkt die Aktivierung des Immunsystems bei der zytotoxischen Aktivität monoklonaler Antikörper gegen Tumore mit. In Tierversuchen zeigte sich nach gezieltem Ausschalten aktivierender Fc-Rezeptors eine signifikanter Verlust der

ADCC Aktivität von Trastuzumab [66]. Auch Polymorphismen in den Fc-Rezeptoren der Effektorzellen scheinen eine Rolle bei der Vermittlung des ADCC und der klinischen Wirksamkeit von Antikörpern zu spielen. Bei den Homozygoten werden die Unterschiede in der Wirksamkeit deutlich. So bindet der EGF-R Antikörper Panitumumab besser an den FcγRIIIa mit dem Allel 131H als mit dem Allel 131R und induziert mit dieser Variante auch effektiver ADCC [81]. Andere Studien zeigten wiederum eine verlängerte Überlebenszeit bei Patienten, die mit Cetuximab behandelt wurden und das Allel FcγRIIIa-131H trugen. [82].

CDC (Komplement-abhängige Zytotoxizität) ist ein weiterer potenter Wirkmechanismus bei der Tumorzellbekämpfung [83]. Das Komplementsystem kann prinzipiell über drei Wege aktiviert werden: der klassische Weg über C1q, der Mannan-bindende-Lektin-(MBL)-Weg und der alternative Weg mittels Hydrolyse von C3. IgG-Antikörper induzieren das Komplementsystem durch die Deposition der Komplementkomponenten C1q, C1r und C1s. Durch die Spaltprodukte C2b und C4 wird C3 in C3a und b umgesetzt, was wiederum zur Hydrolyse von C5 führt, das Fragment C5b initiiert nun die Bildung eines Membranangriffkomplexes, der zur Lyse der Zielzelle führt (klassischer Weg). Viele solide Tumoren zeigen aber eine Komplement-Resistenz, die die Wirkung EGF-R-gerichteter Antikörper beeinträchtigt [60].

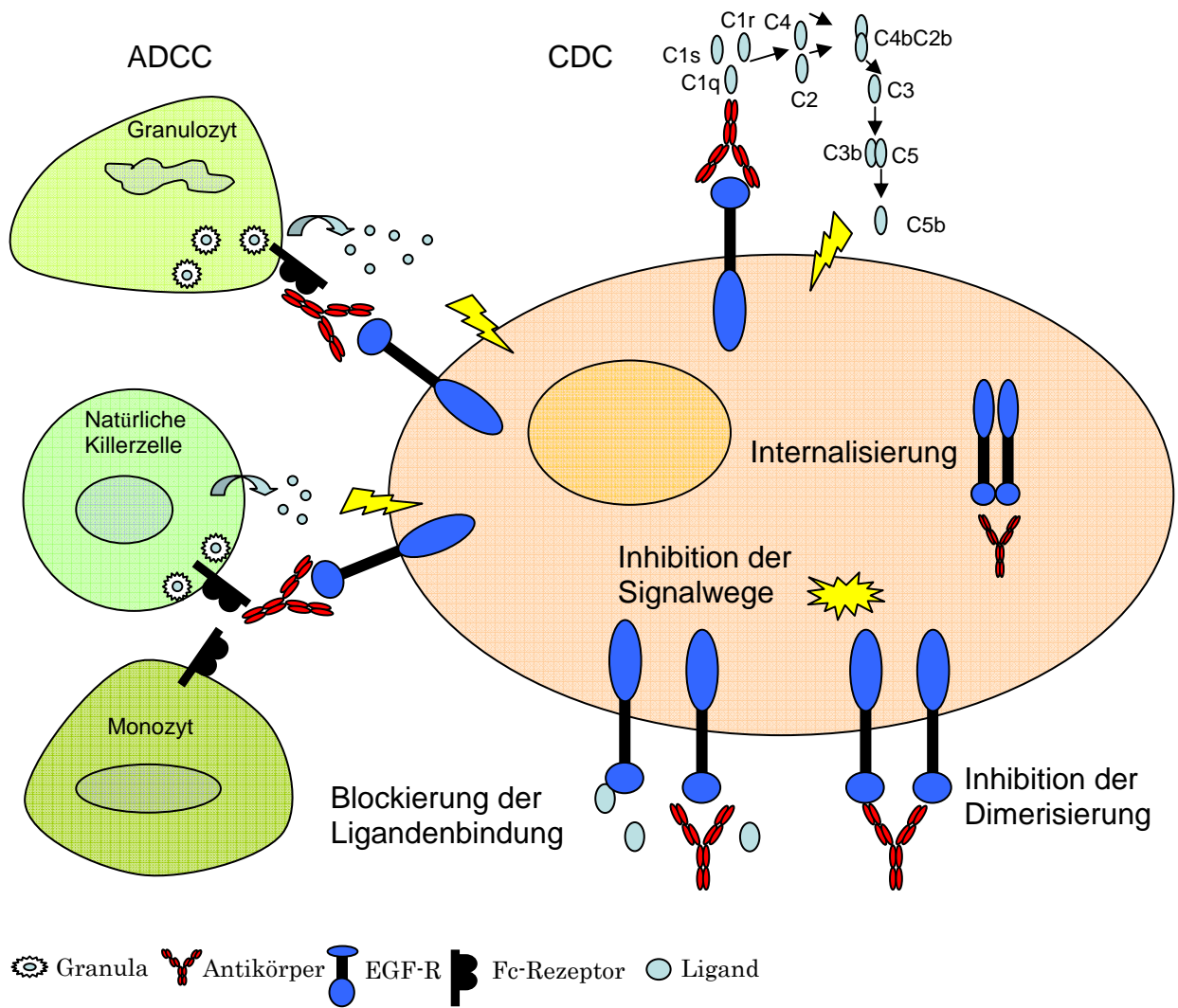


Abbildung 5. Wirkmechanismen monoklonaler Antikörper. Direkte Wirkmechanismen monoklonaler Antikörper sind die Verdrängung von Liganden und die Blockierung der Dimerisierung des EGF-R. Auf diese Weise werden die Aktivierung und die Signalwege des Rezeptors inhibiert, wodurch Wachstum und Differenzierung gehemmt werden. Antikörper können außerdem mit gebundenem Rezeptor in die Zelle internalisiert werden. Indirekte Wirkmechanismen sind die Aktivierung von ADCC (Antikörper-abhängige zelluläre Zytotoxizität) und CDC (Komplement-abhängige Zytotoxizität). Monoklonale Antikörper sind in der Lage, über Fc-Rezeptoren Granulozyten, Natürliche Killerzellen oder Monozyten zu rekrutieren und durch Ausschüttung (Degranulierung) von proteolytischen und zytolytischen Enzymen ADCC zu induzieren. Auch die Aktivierung des Komplementsystems ist als Wirkungsmechanismus von monoklonalen Antikörpern bekannt. Die Deposition der Komplementkomponenten C1q, C1r und C1s startet die Kaskade. Durch die Spaltprodukte C2b und C4 wird C3 in C3a und b umgesetzt, die wiederum C5 teilt. C5b initiiert nun die Bildung eines Membranangriffskomplexes, der zur Lyse der Zielzelle führt (Modifiziert nach Imai, 2006).

1.2.2 Nebenwirkungen

Patienten, die mit monoklonalen Antikörpern behandelt wurden, wiesen hauptsächlich dermatologische Symptome wie Akne, Erytheme, Abschuppung, Ulzera, trockene Haut, Juckreiz sowie Fieber, Schüttelfrost und Kraftlosigkeit auf [84]. Monoklonale Antikörper können als Protein allerdings auch anaphylaktische Reaktionen, Urticaria, Hypomagnesiämie, Übelkeit, Diarrhoe oder Opstipation erzeugen, die überwiegend klinisch kontrollierbar sind. Durch Chimärisierung und Humanisierung therapeutischer Antikörper konnten immunologische Reaktionen minimiert werden. Murine Antikörper sollten vorsichtig eingesetzt werden, da Antikörper gegen das Fremdproteine gebildet werden (sog. Human Anti Mouse Antibodies, HAMA), die zum einen zur Neutralisation der therapeutischen Antikörper führen und bei einer wiederholten Applikation anaphylaktische Reaktionen hervorrufen [85, 86].

1.2.3 Zugelassene EGF-R-Antikörper

1.2.3.1 Nimotuzumab

Nimotuzumab (Theraloc®; hR-3) ist ein EGF-R gerichteter monoklonaler Antikörper, der im Center of Molecular Immunology in Havana, Cuba entwickelt worden ist. Ursprünglich wurde er als muriner IgG2a Antikörper (R3) isoliert. Die CDR des R3 wurde mit humanem IgG1 verschmolzen. Um die anti-EGF-R Aktivität des Antikörpers zu erhalten, hat man drei murine Aminosäuren (Ser75, Thr76 und Thr93) wieder hergestellt [87]. Nimotuzumab ist damit ein humanisierter monoklonaler IgG1 Antikörper. Nach einer Reihe von erfolgreichen klinischen Studien in 23 Ländern (u. a. Brasilien, Indien, China und Argentinien) wurde Nimotuzumab für die Behandlung von Gliomen und Plattenepithelkarzinomen des Kopf- und Halsbereiches zugelassen. Außerdem wird der Antikörper zur Zeit in weiteren klinischen Studien für das Nicht-Kleinzellige Lungenkarzinom, pädiatrische und adulte Gliome, ösophageale Karzinome, Pankreaskarzinom und Magenkarzinom getestet [88-90]. In der EU besitzt das Medikament derzeit den Orphan-Drug Status (Arzneimittel für seltene Leiden). Nimotuzumab zeigte in Studien im Gegensatz zu anderen EGF-R gerichteten monoklonalen Antikörpern, die klinisch eingesetzt werden, deutlich geringere Nebenwirkungen. Bei der Kombination von Nimotuzumab und Radiatio treten toxische Hautreaktion bei unter 10 % aller Patienten auf, davon <1 % der Patienten Grad III oder IV. Cetuximab und

Radiatio oder Panitumumab und Radiatio verursachen dagegen bei bis zu 90 % der Patienten toxische Hautreaktionen, davon 25 bis 60 % Grad III oder IV [91-93].

1.2.3.2 Cetuximab

Cetuximab (Erbix[®], C225) ist ein chimärer (human/murin) monoklonaler EGF-R gerichteter Antikörper des Isotyps IgG1. Er wurde durch die Impfung von Mäusen mit epidermalen Karzinom Zellen (A431) von der Gruppe um Mendelsohn (University of Texas M.D, Anderson Cancer Center) entwickelt [94] und ist seit 2003 in den USA und seit 2004 in der Europäischen Union für die Behandlung des Kolorektalen Karzinoms als Monotherapie oder in Kombination mit Irinotecan zugelassen. In der Europäischen Union gibt es die Einschränkung, dass die zu behandelnden Tumore kein mutiertes *K-Ras*-Gen aufweisen dürfen [95]. Außerdem wird er bei der Therapie von Kopf- und Halstumoren in Kombination mit Chemotherapie eingesetzt [60, 96]. Die Zulassung auch für die Erstlinientherapie des fortgeschrittenen oder metastasierten Nicht-Kleinzelligen Bronchialkarzinoms wurde 2008 beantragt [97].

Nebenwirkungen, die bei der Therapie mit Cetuximab beobachtet werden, sind hauptsächlich dermatologische Symptome. Über 80 % der Patienten zeigen Akne, Erytheme, und Juckreiz. Daneben treten Hypomagnesiämie, Übelkeit, Diarrhoe, abdominelle Schmerzen, Mucositis und Dyspnoe auf [95].

1.2.3.3 Panitumumab

Panitumumab (Vectibix[®], ABX-EGF) ist ein vollständig humaner monoklonaler EGF-R Antikörper des Isotyps IgG2a. Er wurde 2002 in transgenen Mäusen hergestellt, die vollständig humane Antikörper generieren [98] und ist seit 2006 in den USA und seit 2007 in der Europäischen Union für die Therapie des Kolorektalen Karzinoms bei Patienten, die das normale Wildtyp *K-Ras*-Gen tragen, zugelassen [60, 99]. 2010 wurde der Antrag zur Indikationserweiterung für die Kombination mit Chemotherapie gestellt. Nebenwirkungen, die bei der Therapie mit Panitumumab beobachtet werden, sind hauptsächlich dermatologische Symptome. 93 % der Patienten zeigen Akne, Erytheme, Ulzera, trockene Haut und Juckreiz. Daneben treten Hypomagnesiämie, Übelkeit, Diarrhoe, Obstipation und abdominelle Schmerzen auf [100].

1.3 Fragestellung

Der epidermale Wachstumsfaktorrezeptor (Epidermal growth factor receptor; EGF-R), spielt eine wichtige Rolle bei der Regulation von Wachstum und Differenzierung von Zellen. Seine Beteiligung an der Entstehung von Tumoren wird immer besser verstanden, so dass dieser Rezeptor eine interessante Zielstruktur für die Entwicklung spezifischer Tumorthérapien darstellt. Dabei erwiesen sich monoklonale Antikörper als wirksame Therapeutika. Derzeit befinden sich Cetuximab (chimärer IgG1) und Panitumumab (humaner IgG2) in der klinischen Anwendung [95, 100]. Dennoch stellen sie keinen kurativen Therapieansatz dar und weisen zum Teil starke Nebenwirkungen auf. Nimotuzumab, ein humanisierter IgG1-Antikörper, bewies in verschiedenen klinischen Studien ebenfalls seine Wirksamkeit und zeichnete sich als nebenwirkungsarm aus. Aufgrund dieser Ergebnisse ist Nimotuzumab in 23 Ländern für die Behandlung von Gliomen und Plattenepithelkarzinome des Kopf- und Halsbereiches bereits zugelassen. In der Literatur finden sich nur wenige Daten zu seinen funktionellen Eigenschaften *in vitro*, so dass sich die Frage nach den Gründen für seine klinische Wirksamkeit und sein günstiges Nebenwirkungsprofil stellt.

Das Ziel dieser Doktorarbeit ist die funktionelle Charakterisierung von Nimotuzumab im Vergleich zu den bereits etablierten Antikörpern Cetuximab und Panitumumab. Dabei sollen Bindungseigenschaften der Antikörper, der Einfluss auf die Signalweiterleitung und das Wachstum von Tumorzellen sowie die Rekrutierung verschiedener Zellen des Immunsystems untersucht werden. Aus diesen Ergebnissen sollen Rückschlüsse für die Wirksamkeit und für das günstige Nebenwirkungsprofil von Nimotuzumab gezogen werden und so zu einem besseren Verständnis der Behandlung mit monoklonalen Antikörper führen.

2. Materialien und Methoden

2.1 Materialien

Eine detaillierte Auflistung über genutzte Zellen, Kulturmedien, Geräte, Reagenzien, Kits, Lösungen, Antikörper und Verbrauchsmaterialien findet sich im Anhang (Kapitel 8).

2.2 Methoden

2.2.1 Zellkultur

Die humanen Zelllinien A431 und A1207 wurden in RPMI 1640-Medium und in DMEM-Medium (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) mit jeweils 10 % fötalem Kälberserum (FCS) und 1 % Penicillin/ Streptomycin kultiviert. Beide Zelllinien wuchsen adhärent in Gewebekulturflaschen der Größe 250 ml. Die murine BaF3 Zelllinie wurde als Zellsuspension ebenfalls in RPMI 1640-Medium mit 10 % fötalem Kälberserum (FCS) und 1 % Penicillin/ Streptomycin in Gewebekulturflaschen der Größe 50 ml kultiviert. Die stabil transfizierten BaF3 Zelllinien erhielten zusätzlich 100 µg/ml G418. Bei diesen Zelllinien handelte es sich eine murine Pro-B-Zelllinie, die entweder mit dem Gen für das Wildtyp EGF-R oder der EGF-R vIII Mutation transfiziert wurden [17].

Alle Zelllinien wuchsen unter sterilen Bedingungen jeweils bei 37° C im Brutschrank mit einer H₂O-gesättigten, 5 %igen CO₂-Atmosphäre. Etwa alle 2-3 Tage wurde das Wachstum der Zellen unter einem Lichtmikroskop beurteilt. Erreichten die Zellen in der Kulturflasche eine Konfluenz > 80 % oder zeigte das Kulturmedium durch einen gelblichen oder rotvioletten Farbumschlag eine Veränderung des pH-Wertes, so wurden die Zellen passagiert. Dazu wurde das Nährmedium verworfen, die adhären Zellen zweimal mit 10 ml PBS gewaschen und mit 1 ml Trypsin/EDTA gelöst. Die so suspendierten Zellen wurden in 10 ml ihres entsprechenden Mediums aufgenommen, und anschließend in Verhältnissen von 1:2 bis 1:20 je nach Bedarf in neuen Kulturflaschen ausgesät. Suspensionszellen wurden ohne Behandlung mit Trypsin in Verhältnissen 1:2 bis 1:20 je nach Bedarf in neue Kulturflaschen mit frischem Medium umgesetzt, um optimale Wachstumsbedingungen zu gewährleisten. Zur Bestimmung der Zellzahl wurde die Zellsuspension in einem Verhältnis von 1:10 mit einer Trypanblaulösung verdünnt und gut durchmischt. Von dieser Suspension wurden 10 µl in eine Neubauer-Zählkammer gegeben. Da das Trypanblau nur von nicht vitalen Zellen aufgenommen wird, erschienen diese Zellen

im Lichtmikroskop blau, so dass die vitalen Zellen gezählt und die Zellzahl bestimmt werden konnte. Die Berechnung der Zellzahl aus der Zellsuspension erfolgte unter Berücksichtigung des Verdünnungsfaktors sowie des Volumens der Zellsuspension mit folgender Formel: $\text{Zellzahl/ml} = (\text{gezählte Zellzahl aus 4 Quadranten}/4) \times \text{Verdünnungsfaktor} \times 10000$.

Zu Konservierungszwecken wurden in regelmäßigen Abständen Aliquots der Zellen eingefroren. Dazu wurde einer Zellsuspension bestehend aus $2-3 \times 10^6$ Zellen und 600 μl Kulturmedium 600 μl Gefrierlösung (16 % DMSO in FCS) tröpfchenweise hinzugefügt und anschließend in ein Kryoröhrchen überführt. Danach lagerten die Zellen durchschnittlich 2 Tage bei -80°C , bevor sie in einen Tank mit flüssigem Stickstoff umgesetzt wurden. Zur Rekultivierung der gefrorenen Zellen wurde das Kryogefäß bei 37°C im Wasserbad erwärmt, die Zellen anschließend in Kulturmedium aufgenommen und in einer Gewebekulturflasche ausgesät.

Mycoplasmen sind Prokaryonten, die aufgrund ihrer aeroben sowie intra- und extrazellulären Lebensweise Zellkulturen kontaminieren können. Die Folge einer solchen Kontamination sind eine erniedrigte Zellproliferationsrate und veränderte Zellantworten. Diese Effekte können die Ergebnisse von Versuchen mit kontaminierten Zellen verfälschen. Deshalb sollten Zellkulturen frei von Mykoplasmen sein. Um eine mögliche Kontamination durch Mycoplasmen bei Versuchen mit Zellen auszuschließen, wurde der Mycoplasma Detection Assay "MycoAlert Mycoplasma Detection Kit®" der Firma Lonza eingesetzt. Bei diesem Test wird die Aktivität mycoplasmatischer Enzyme ausgenutzt, die Umwandlung von ADP in ATP unter Bildung eines Farbumschlages bewirken, der im Luminometer nachgewiesen werden kann.

2.2.2 Immunfluoreszenzen

Mit der Durchflußzytometrie (englisch: FACS = fluorescence activated cell sorting) können Zellen in Suspension anhand von Fluoreszenzeigenschaften analysiert werden. Es werden Einzelzellen an einem Laser vorbeigeführt, wobei Streulicht entsteht. Das in Vorwärtsrichtung gestreute Licht (englisch: forward light scatter, FSC) ist hauptsächlich ein Maß für die Zellgröße, während das im rechten Winkel zum einfallenden Laserstrahl gestreute Licht (englisch: side scatter, SSC) vor allem von der intrazellulären Granularität abhängt. Dieses ausgesandte Licht wird von Detektoren empfangen, quantifiziert und am Computer dargestellt [102]. Um

Oberflächenantigene auf Zellen zu bestimmen, können diese mit monoklonalen Antikörpern markiert werden. Dabei werden prinzipiell zwei Arten der Markierung unterschieden: Bei der indirekten Immunfluoreszenz bindet zunächst der unkonjugierte Primärantikörper an das Zielantigen, welcher in einem zweiten Schritt von einem Farbstoff-markierten Sekundärantikörper detektiert wird. Die spezifischen Antigen-Antikörperkomplexe werden dann in der Durchflusszytometrie analysiert. Bei der direkten Immunfluoreszenz werden Primärantikörper verwendet, die bereits mit einem Farbstoff markiert sind.

Im Rahmen der indirekten durchflusszytometrischen Analysen dieser Arbeit wurden $1,5 \times 10^5$ Zielzellen pro well auf Mikrotiterplatten gegeben und mit je 10 μl des Primärantikörpers (monoklonale IgG Antikörper) in unterschiedlichen Konzentrationen (0,01- 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$) 30 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit zweimal 100 μl Facs-Puffer pro Well gewaschen und bei 1600 U/min 2 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und die Zellen mit 10 μl Sekundärantikörper (mit Fluoreszein-Isothiocyanat konjugiertes IgG; 1:10 Verdünnung der Stammlösung) resuspendiert. Nach 30 min Inkubation auf Eis und zwei Waschgängen mit Facs-Puffer wurden die Zellen schließlich in jeweils 500 μl 1x PBS aufgenommen, so dass sie im Durchflusszytometer analysiert werden konnten. Die relative Fluoreszenzintensität (RFI) wurde folgendermaßen berechnet: Durchschnittliche Fluoreszenzintensität (MFI) eines relevanten Antikörpers / (MFI) eines irrelevanten Antikörpers.

Bei den direkten Immunfluoreszenzanalysen wurde mittels EZ-label-Kit nach Angaben des Herstellers (Pierce) markierter Primärantikörper 30 min zusammen mit den Zielzellen auf Eis inkubiert und anschließend im Durchflusszytometer ausgewertet.

2.2.2.1 Hemmung der Ligandenbindung

Für Untersuchung der Ligandenblockade wurden jeweils $1,5 \times 10^5$ A431-Zellen simultan mit 2,5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ FITC-konjugiertem Liganden (EGF, Epiregulin oder TGF- α) und EGF-R- Antikörpern mit 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ für 30 min auf Eis inkubiert. Nach zwei Waschgängen mit je 100 μl Facs-Puffer wurden die Zellen im Durchflusszytometer analysiert. Eine Verdrängung des Liganden zeigte sich durch eine verminderte Fluoreszenzintensität. Die Verdrängung des Liganden wurde folgendermaßen

berechnet: Inhibition der Ligandenbindung = (RFI ohne - RFI mit Antikörper) / (RFI ohne Antikörper) x 100.

2.2.2.2 Bestimmung überlappender Epitope

EGF-R Antikörper können an unterschiedlichen Positionen am Rezeptor binden [103]. Um diese Epitope zu bestimmen, wurden 2×10^5 A431-Zellen mit 5 µg/ml eines FITC- konjugierten EGF-R- Antikörpers (nicht sättigende Konzentration) und mit verschiedenen unkonjugierten EGF-R- Antikörpern in einer Konzentration von 200 µg/ml für 30 Minuten auf Eis inkubiert. Nach 2 Waschgängen mit je 100 µl FACS-Puffer wurden die Proben im Durchflusszytometer analysiert. Das Level an Kompetition wurden folgendermaßen berechnet: % Kompetition = (MFI der Antikörper – Hintergrund MFI) / (maximale MFI – Hintergrund MFI) x 100, wobei die maximale MFI definiert war als Kombination aus FITC-konjugierten EGF-R Antikörper und der Isotypen Kontrolle.

2.2.2.3 Quantitative Durchflußzytometrie

Um eine Aussage über die Anzahl der pro Zelle exprimierten Antigene zu treffen, wird die quantitative Durchflusszytometrie verwendet. Die Fluoreszenzintensität ist dabei ein Maß für die Anzahl der an ein Antigen gebundenen Antikörper pro Zelle, die man mit einer Referenzprobe vergleicht, bei der die genaue Antigenexpression bekannt ist. Die Quantifizierung der EGF-R Moleküle/ Zelle erfolgte mithilfe Qifikit® (Dako) nach Herstellerangaben. Dabei werden zwei Arten von Beads als Referenzprobe verwendet (Set-Up- Beads, die sich aus unmarkierten und mit einer hohen Zahl an Mausantikörpern markierten Beads zusammensetzen, und Calibration-Beads, die aus fünf verschiedenen Fraktionen mit bekannter Antikörperdichte bestehen).

Im Rahmen dieser Arbeit wurden $1,5 \times 10^5$ Zielzellen mit 10 µl eines murinen Primärantikörpers (m225 oder m425) bzw. einer Negativkontrolle (Tib92) in einer Konzentration von 200 µg/ml auf einer Mikrotiterplatte 30 min bei 4°C inkubiert. Nach Herstellerangaben wurden zusätzlich jeweils 100 µl der Set-Up-Beads und der Calibration-Beads auf die Platten gegeben. Die Proben wurden anschließend mit zweimal je 100 µl FACS-Puffer gewaschen und die Platten bei 1600 U/min für 2 min zentrifugiert. Als nächstes wurden 10 µl des Sekundärantikörpers (mit Fluoreszein- Isothiocyanat konjugiertes Ziege-anti-Maus-IgG), der zuvor 1:10 mit Stammlösung

verdünnt wurde, zu den Proben gegeben. Nach erneuter Inkubation von 30 min bei 4° C folgten zwei Waschgänge mit FACS-Puffer und die Zellen und Beads wurden mit jeweils 500 µl PBS resuspendiert, so dass sie im Durchflusszytometer analysiert werden konnten.

Vor der eigentlichen Messung der Zellen musste die Darstellung der FACS-Analyse anhand der Set-Up-Beads eingestellt werden. Anschließend wurden die Calibration-Beads und die Zellen analysiert. Die Antigendichte der Beads war chargenspezifisch und der Packungsbeilage des Kits zu entnehmen. Nach Herstellerangaben konnte nun mithilfe der Fluoreszenzintensitäten der untersuchten Zellen die EGF-R- Dichte auf den Zellen bestimmt werden. Dabei war jedoch die Anzahl der Oberflächenmoleküle der Negativkontrolle (Background) zu beachten, die sich aufgrund der Eigenfluoreszenz und der unspezifisch gebundenen Antikörpern ergab.

2.2.3 MTT

Der Tests beruht auf der Metabolisierung eines gelben Tetrazoliumsalzes 3-[4,5-Dimethylthiazol-2-yl]-2,5-Diphenyl-Tetrazolium-Bromid (MTT-Reagenz 1) in wasserunlösliche violette Formazan-Kristalle durch mitochondriale Dehydrogenasen in stoffwechselaktiven Zellen, die mit angesäuertem Isopropanol (MTT-Reagenz 2) gelöst und die Extinktion quantitativ im ELISA-Reader bei 620 nm bestimmt werden können. Dabei ist die gemessene Intensität des gebildeten Farbstoffes direkt proportional zur Anzahl lebender Zellen.

Um das Ausmaß der Wachstumsinhibierung von EGF-R gerichteten Antikörpern zu untersuchen, wurden mit dem humanen EGF-R transfizierte BaF3-Zellen analysiert [101]. BaF3-Zellen wachsen üblicherweise abhängig von Interleukin-3 (IL-3). Durch Transfektion mit dem humanen EGF-R ließen sie sich auch Wachstumsfaktor-abhängig kultivieren. Nach dreimaligem Waschen mit R10⁺-Medium wurden je 20000 Zellen in einer Zellsuspension von 100 µl Medium in Mikrotiterplatten (Flachboden, steril) ausgesät. Zusätzlich wurden 10 ng/ml humanes EGF, humanes Epiregulin oder humanes TGF- α zugegeben. Die Kontrolle erfolgte mit murinem IL-3 (Wehi-3-Überstand, 25 %). Die Zellen wurden daraufhin mit steigenden Antikörperkonzentrationen (0-20 µg/ml) 72 h im Brutschrank bei 37° C inkubiert. Nach der Inkubationsphase wurden die Zellen bei 2000 U/min zentrifugiert, zweimal mit Medium gewaschen und für 4 h mit je 10 µl/ well Tetrazoliumsalz (MTT-Reagenz 1) behandelt. Anschließend wurden die Proben über Nacht mit 100 µl Isopropanol

(MTT-Reagenz 2) inkubiert, bevor die Farbreaktion in einem Absorptionsmessgerät (ELISA-Reader) bei 620 nm Wellenlänge bestimmt werden und die Auswertung der Daten in Excel erfolgen konnte.

Dabei wurde das Wachstum in der Anwesenheit des Antikörpers Rituximab (unspezifisch) als 100 % Zellwachstum definiert. Die Formel zu Berechnung der Wachstumsinhibierung lautete: % der Kontrolle= (Absorption in der Anwesenheit von EGF-R Antikörpern/ Absorption in der Anwesenheit von Rituximab) x 100.

2.2.4 Western Blot

2.2.4.1 Proteinisolierung

Hierzu wurden pro Ansatz 300 000 BaF3-Zellen mit jeweils 20 µg Antikörper in 1 ml Kulturmedium für 3 h bei 37° C im Brutschrank inkubiert. Die Stimulation erfolgte durch Zugabe von 20 ng humanem EGF für 20 min bei 37° C im Brutschrank. Die Zellsuspension wurde zweimal mit PBS gewaschen, bei 1600 U/min 5 min zentrifugiert und der Überstand verworfen. Die Zellpellets wurden anschließend in RIPA Puffer 15 min resuspendiert und 3x sonifiziert. Nach 15-minütiger Zentrifugation bei 14000 U/min wurde der gewonnene proteinhaltige Überstand abgenommen und bei -80° C gelagert.

2.2.4.2 Proteinkonzentrationsbestimmung

Bei der BCA-Methode werden in alkalischer Lösung zunächst Cu²⁺-Ionen zu Cu⁺-Ionen durch das zu bestimmende Protein reduziert (Biuret-Reaktion). Die Cu⁺-Ionen bilden mit Bicinchoninsäure (BCA) einen Komplex, der durch Absorptionsmessung bei 562 nm detektiert werden kann.

Die BCA Protein Assay Reagent A und B wurden laut Hersteller für die Bestimmung im Verhältnis 50:1 gemischt (BCA-Arbeitslösung). Daraufhin wurden 5 µl des isolierten Proteingemisches mit 45 µl destilliertem Wasser verdünnt (1:50) und in je 1 ml BCA-Arbeitslösung gegeben (Doppelbestimmungen). Nach einer Inkubationszeit von 30 min bei 37° C konnte die entstandene Farbstoffmenge im Photometer bei 562 nm detektiert und unter Verwendung einer Standardkonzentrationsreihe aus BSA umgerechnet werden.

2.2.4.3 Blotting und Entwicklung

Die Methode des Western Blots bietet die Möglichkeit, nach Größe aufgetrennte Proteine auf eine Membran zu übertragen und diese mittels Antikörperreaktionen spezifisch nachzuweisen.

Für die Western Blot Analysen im Rahmen dieser Arbeit wurden jeweils 50 µg Protein in 10 µl Lösung gegeben, bestehend aus NuPage LDS Sample Buffer (4x) und NuPage Sample Reducing Agent (10x). Die Proben wurden bei 95° C für 10 min erhitzt, um die Proteine zu denaturieren. Zur Auftrennung des Proteingemisches wurden die Proben und 10 µl Protein-Standard auf ein Gel (NuPAGE® Novex® 3-8 % Tris-Acetat; Invitrogen) aufgetragen und 200 ml Laufpuffer (NuPAGE® Tris-Acetat SDS Running Buffer; Invitrogen) mit 500 µl Antioxidant (NuPAGE®, Invitrogen) hinzu gegeben. Die Elektrophorese erfolgte bei 150 V für 1,5 h. Anschließend wurde eine PVDF (Polyvinylidenfluorid)-Membran zur Aktivierung für 1 min in Methanol gelegt. Der Blot wurde in folgender Reihenfolge geschichtet: Blotpapier (Whatmanpapier), Gel, Membran und Blotpapier. Der Blot wurde daraufhin in eine Elektrotransferkammer zwischen Kathode und Anode eingespannt. Der anschließende Transfer, bei dem die Proteine in Richtung Anode vom Gel auf die Membran übertragen wurden, lief für 100 min bei 60 mA. Die Überprüfung des Proteintransfers erfolgte mit SimplyBlue SafeStain. Als nächstes folgte ein Waschvorgang der Membran für 2 min in Methanol und 5 min in 15 ml TBS-Puffer. Anschließend wurde die Membran für 1 h in 5 % Blotpuffer auf einem Schüttler inkubiert, um unspezifische Bindungen zu blockieren. Der Primärantikörper (polyklonale Antikörper gegen pY1068, pY1173, pY1048, total EGF-R und Actin) konnte nun in entsprechender Verdünnung (1:200-1:10000) in 25 ml 1 % Blotpuffer auf die Membran gegeben und über Nacht bei 4° C auf einem Schüttler inkubiert werden. Am zweiten Tag folgte ein Waschvorgang für 1x 30 min in 25 ml TBS-T. Danach wurde der Sekundärantikörper (HRP-konjugierter anti-Hase or anti-Maus IgG) in entsprechender Verdünnung (1:5000) in 25 ml 1 % Blotpuffer auf die Membran gegeben, die dann 1 h auf einem Schüttler inkubierte. Anschließend folgte wieder ein Waschvorgang für einmal 30 min in 25 ml TBS-T.

Nun wurden 4 ml ECL-Plus-Lösung aus dem Super Signal Kit (Pierce) für 5 min auf die Membran gegeben und die Membran in eine Filmkassette eingelegt. Der Film wurde in der Dunkelkammer entwickelt, indem er nach unterschiedlicher Belichtungszeit für 2 min in Entwicklerlösung, dann kurz in Wasser und letztendlich

für 2 min in Fixierlösung gelegt wurde, um die nachzuweisenden Proteine sichtbar zu machen. Für eine weitere Verwendung der Membran wurde diese für 10 Minuten mit 0.5 M NaCl / 0.5 M Essigsäure bei Raumtemperatur auf dem Schüttler inkubiert und danach in 1.5 M Tris gelegt und anschließend für 1 h erneut in 25 ml 5 % Blotpuffer gelegt. So wurden die zuletzt benutzten Primär- und Sekundärantikörper von der Membran entfernt und eine erneute Zugabe eines Primärantikörpers konnte erfolgen. Die Western Blot Signale wurden densitometrisch ausgewertet.

2.2.5 Isolation von Immunzellen

Die Dichtegradientenzentrifugation mit Percoll erlaubt die Gewinnung mononukleärer Zellen (MNC), hauptsächlich bestehend aus Monozyten und natürlichen Killerzellen, und polymorphonukleären Zellen (PMN), vorrangig bestehend aus neutrophilen Granulozyten, aufgrund ihrer Dichteunterschiede aus heparinisiertem, peripherem Vollblut. Dazu wurden in einem 15 ml Falcon 3 ml 63 % Percoll auf 70 % Percoll geschichtet und 10 ml Citratblut darauf gegeben. Dieser Gradient wurde 20 min bei 2000 U/min und ohne Bremse zentrifugiert. Nach der Zentrifugation zeigten sich folgende Schichten:

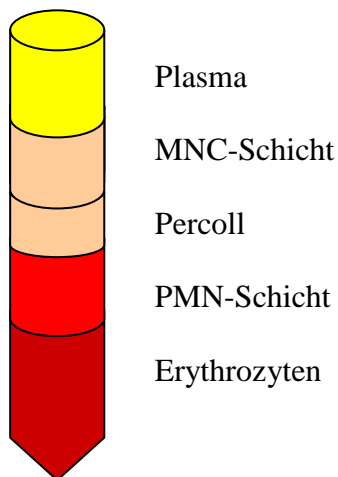


Abbildung 6. Darstellung des Percoll-Gradienten

Die zwischen Plasma und Percoll befindliche MNC-Fraktion wurde mithilfe einer serologischen Pipette isoliert. Die PMN-Fraktion wurde zusammen mit der oberen Erythrozytenschicht vom Gradienten getrennt. Beide Fraktionen wurden in 50 ml 1x PBS gegeben und bei 1800 U/min und ohne Bremse 5 min zentrifugiert. Der Überstand der MNC-Fraktion wurde verworfen, das Zellpellet vorsichtig in 50 ml 1x PBS resuspendiert. Der zellfreie Überstand der PMN-Fraktion wurde vorsichtig

verworfen. Anschließend folgte die hypotone Lyse der Erythrozyten, indem das Zellgemisch in 45 ml destilliertes Wasser gegeben und gut durchmischt wurde. Nach 30 s wurde 5 ml 10x PBS hinzugegeben, um die Lyse zu stoppen, die im Anschluss bei Bedarf wiederholt wurde. Nach erneuter Zentrifugation beider Fraktionen für 5 min bei 1600 U/min wurde der Überstand der Fraktionen verworfen und die Zellen in Medium aufgenommen. Nun konnte die Anzahl der Zellen mithilfe der Trypanblaufärbung und der Neubauerzählkammer unter dem Lichtmikroskop bestimmt werden. Die Reinheit der isolierten Zellen wurde mit Hilfe einer Cytospin-Präparation und der Durchflusszytometrie überprüft.

2.2.6 ADCC und CDC

Durch den klassischen ^{51}Cr -release-assay lässt sich die Lyse von Zellen quantifizieren. Das Prinzip beruht darauf, dass radioaktiv markiertes Chrom über ein Transporterprotein ins Zellinnere eingebracht wird und bei Verlust der Zellintegrität wieder freigesetzt wird, so dass die gemessene Radioaktivität im Überstand der vor Versuchsbeginn gewaschenen Zellen einen Hinweis auf den Anteil zugrunde gegangener Zellen gibt.

Für den ADCC und CDC-Assay wurden humanes Vollblut, humanes Serum und isolierte Effektorzellen (PMN und MNC) von gesunden Spendern verwendet. 50 μl (400 000 Zellen) der Effektorzellsuspension (PMN, MNC, Vollblut oder Serum) wurden mit EGF-R gerichteten Antikörpern in ansteigenden Konzentrationen (0,016 $\mu\text{g/ml}$ bis 10 $\mu\text{g/ml}$) auf 96-Well-Rundboden-Platten vorgelegt. Pilotexperimente zeigten, dass bei dieser Konzentration eine Sättigung erreicht wurde. Um ein Zielvolumen von insgesamt 200 μl pro Well zu erreichen, wurde gegebenenfalls Kulturmedium hinzu gegeben. Die PMN wurden bei Bedarf mit 50 μl pro Well GM-CSF (Konzentration: 10^{-4} U/ml) stimuliert. Dazu wurde 100 μl GM-CSF mit 4,9 ml Kulturmedium angesetzt. Die Zielzellen (Targetzellen) wurden mit 100 μCi radioaktivem Natriumchromat (^{51}Cr) pro 10^6 Zellen 2h bei 37°C inkubiert, anschließend dreimal je 5 min mit 6 ml Kulturmedium bei 1600 U/min zentrifugiert und je 10^6 Zellen in 10 ml Medium aufgenommen. Von dieser Zellsuspension wurden 50 μl (5000 Zellen) pro Well zu den vorgelegten Antikörpern und den jeweiligen Effektorzellen gegeben. Man erzielte so eine Effektor/Target Ratio von 80:1. Jede Probe wurde 3-fach angesetzt (Triplikate). Für die Basallyse wurden 50 μl Zielzellen ohne Effektorzellen und ohne Antikörper verwendet. Die Basallyse bezeichnet den

Wert, der das Zugrundegehen der Zielzellen ohne Einfluss von Effektorzellen und Antikörpern repräsentiert. Der Ansatz für die Maximallyse bestand aus 50 µl Zielzellen und 50 µl 6 % Perchlorsäure. Sie beschreibt den Wert, der maximal erreicht werden kann, wenn alle Zielzellen lysiert werden. Für die Spontanlyse wurden 50 µl Zielzellen mit Antikörpern zusammen gegeben. Dies bedeutet, dass Zielzellen ohne Einfluss von Effektorzellen, aber in Gegenwart von Antikörpern absterben. Nach 4 h Inkubation bei 37° C und 5 % CO₂ Atmosphäre wurden die Platten bei 2000 U/min 5 min zentrifugiert und 100 µl Überstand von den Ansätzen abgenommen und im Gamma-Counter analysiert. Antikörper-unabhängige Zytotoxizität (Effektorzellen und Zielzellen ohne Antikörper) wurde mit Vollblut und MNC beobachtet, diese betrug aber < 5 %. Die Lyserate wurde mit folgender Formel berechnet: % spezifische Lyse = (Experimentelle cpm – Basal cpm) / (Maximal cpm - Basal cpm) x 100. Aus den Triplikaten wurde der Mittelwert gebildet.

2.2.7 Lichtmikroskopie

Zunächst wurden 4x 10⁶ Zellen in 4 ml serumfreiem Medium mit 5 µl Farbstoff (Vybrant Cell Labeling Solution[®]) 15 min bei 37° C inkubiert. Danach wurden die Zellen bei 1600 U/min 5 min zentrifugiert, der Überstand abgenommen und die Zellen erneut in serumfreiem Medium gegeben. Dieser Schritt wiederholte sich zweimal. Um die Zellen unter dem Lichtmikroskop beurteilen können, wurden 4 ml PMN-Zellsuspension (4x 10⁶) und 50 µl A431-Zellsuspension (5x 10⁴ Zellen) zusammengeben und bei 1600 U/min 5 min zentrifugiert. Mit dieser Mischung erreicht man wie im ADCC eine Effektor/Target-Ratio von 80:1. Nach der Zentrifugation wurde der Überstand verworfen und das Zellpellet in 100 µl PBS aufgenommen. Die Zellen wurden anschließend bei 37° C für 3 h mit je 20 µg/ml Antikörper inkubiert und Proben davon unter dem Lichtmikroskop ausgewertet.

2.2.8 Darstellung der Daten und statistische Auswertung

Für die graphische Aufbereitung der Daten sowie die statistischen Analysen wurde die GraphPad Prism 4.0 Software verwendet. Die Daten wurden als Mittelwerte mit Standardabweichung von mindestens drei unabhängigen Experimenten gezeigt. Signifikanzen wurden mit gepaartem bzw. ungepaartem T-Test berechnet. Als statistisch signifikant galten Ergebnisse mit einem p-Wert < 0,05.

3. Ergebnisse

3.1 Bindungsstudien

Die Grundlage für funktionelle Untersuchungen bildet die spezifische Bindung des Antikörpers Nimotuzumab an den EGF-R, die im Vergleich zu Cetuximab und Panitumumab, zweier klinisch zugelassener EGF-R Antikörper, mittels indirekter Immunfluoreszenz untersucht wurde. Als Zielzellen wurden Tumorzelllinien mit unterschiedlicher EGF-R Expression verwendet: A431-Zellen ($2,2 \times 10^6$ EGF-R Moleküle/Zelle), untransfizierte BaF3-Zellen ohne EGF-R [130], BaF3-Zellen transfiziert mit EGF-R ($1,4 \times 10^4$ EGF-R Moleküle/Zelle) und BaF3-Zellen transfiziert mit EGF-R vIII ($1,7 \times 10^4$ EGF-R Moleküle/Zelle). Die Expression des Antigens EGF-R wurde initial mittels quantitativer indirekter Immunfluoreszenz und Qifikit (Dako) bestimmt (Abbildung 7). Als Sekundärantikörper diente ein FITC-konjugierter Antikörper gegen humanes IgG. Nimotuzumab band wie auch Cetuximab und Panitumumab sowohl an die A431-Zellen mit hoher EGF-R Expression (Abbildung 8A) als auch an die mit EGF-R transfizierten BaF3-Zellen mit geringerer EGF-R Expression (Abbildung 8C), zeigt jedoch keine Reaktivität gegen untransfizierte BaF3-Zellen (Abbildung 8B). Damit wurde demonstriert, dass Nimotuzumab spezifisch den humanen EGF-R als Antigen erkannte.

Die Affinitäten der einzelnen Antikörper wurden mittels Dosis-Wirkungskurven verglichen. Dabei ergaben sich für die Antikörper unterschiedliche EC₅₀-Werte (Abbildung 8). Alle drei Antikörper banden stärker an A431-Zellen als an BaF3-Zellen. Eine Erklärung dafür könnte die unterschiedliche EGF-R Expression der Tumorzelllinien sein (Abbildung 7). Bei genauerer Betrachtung stellte man fest, dass Cetuximab und Panitumumab deutlich höhere Bindungsaffinitäten zum EGF-R besaßen als Nimotuzumab, ablesbar an den Antikörperkonzentration bei halbmaximaler Sättigung (EC₅₀). Mit A431-Zellen konnten signifikante Unterschiede zwischen Cetuximab und Nimotuzumab bei Konzentrationen von 20 µg/ml (p-Wert: 0,0097) und 10 µg/ml (p-Wert: 0,0337) und zwischen Panitumumab und Nimotuzumab bei einer Konzentration von 20 µg/ml (p-Wert: 0,0236) berechnet werden. Ähnliches zeigte sich ebenfalls bei den mit EGF-R transfizierten BaF3-Zellen. Auch hier konnten signifikante Unterschiede zwischen Cetuximab und Nimotuzumab bei Konzentrationen von 10 µg/ml (p-Wert: 0,0003) und 5 µg/ml (p-Wert: 0,0375) und zwischen Panitumumab und Nimotuzumab bei einer Konzentration von 5 µg/ml (p-Wert: 0,0375) ermittelt werden. In beiden Fällen hatte

Cetuximab -besonders in den höheren Konzentrationen- eine leicht höhere Affinität zum EGF-R als Panitumumab.

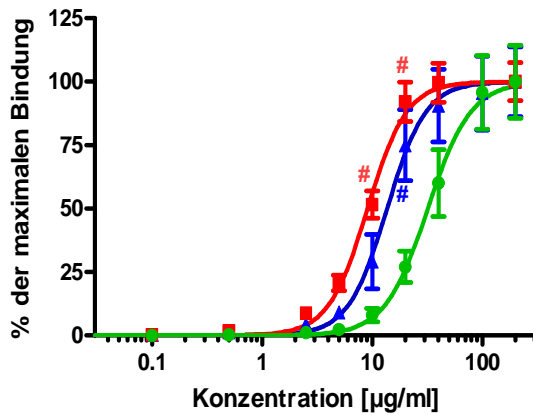
Zusätzlich wurde die Fähigkeit der Antikörper untersucht, EGF-R vIII zu binden (eine Mutation des EGF-R, die ein Fehlen der EGF-Bindungsdomäne aufweist). Sowohl Nimotuzumab als auch Cetuximab und Panitumumab zeigten spezifische Bindungen zu mit EGF-R vIII transfizierte BaF3-Zellen (Abbildung 8D). Dabei besaß Cetuximab eine deutlich höhere Affinität für EGF-R vIII als Nimotuzumab und Panitumumab, die ein ähnliches Bindungsverhalten aufwiesen. Für Cetuximab konnten zudem signifikante Unterschiede zu Nimotuzumab bei Konzentrationen von 10 µg/ml (p-Wert: < 0,0001), 5 µg/ml (p-Wert: 0,0005) und 1 µg/ml (p-Wert: < 0,0001) berechnet werden.

Zellen	Ursprung	Berechnete EGF-R Moleküle/Zelle
A431	Humanes epidermoidales Karzinom	2 253 247 ± 328 888
A1207	Glioblastom	1 328 980 ± 297 782
BaF3 transfiziert mit EGF-R	Murines Pro-B-Lymphom	14 127 ± 7 821
BaF3 transfiziert mit EGF-R vIII	Murines Pro-B-Lymphom	16 732 ± 4 468

Abbildung 7. Quantitative EGF-R Expression.

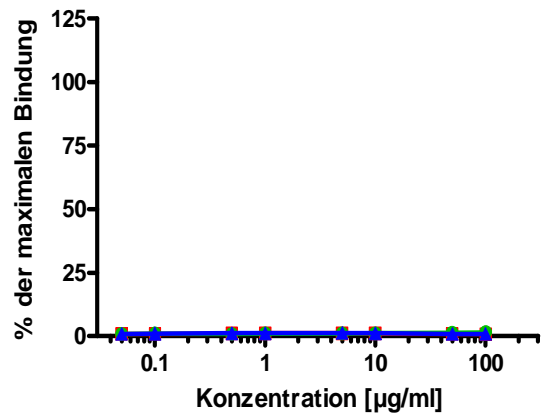
Die EGF-R-Dichte der verschiedenen Tumorzellen wurde quantitativ mittels indirekter Immunfluoreszenz und Qifikit (Dako) bestimmt. Der Mittelwert ± SD von drei unabhängig durchgeführten Experimenten wurde, wie im Abschnitt „Methoden“ beschrieben, berechnet.

(A) A431

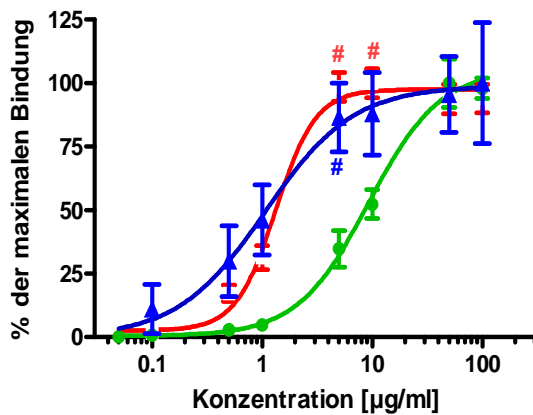


Antibody	EC50 [µg/ml]	95 % CI [µg/ml]
Nimotuzumab	32,0	25,7 bis 39,9
Cetuximab	9,1	8,0 bis 10,3
Panitumumab	13,7	11,0 bis 17,0

(B) BaF3

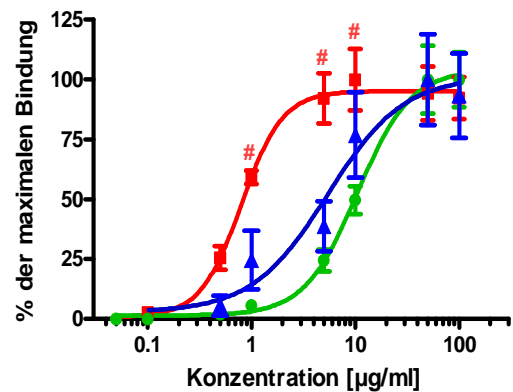


(C) BaF3 transfiziert mit EGF-R



Antibody	EC50 [µg/ml]	95 % CI [µg/ml]
Nimotuzumab	9,3	6,5 bis 13,3
Cetuximab	1,3	1,0 bis 1,8
Panitumumab	2,7	0,4 bis 18,0

(D) BaF3 transfiziert mit EGF-R vIII



Antibody	EC50 [µg/ml]	95 % CI [µg/ml]
Nimotuzumab	10,5	6,8 bis 16,1
Cetuximab	0,8	0,6 bis 1,1
Panitumumab	7,2	4,0 bis 13,2

■ Cetuximab ▲ Panitumumab ● Nimotuzumab

Abbildung 8. Nimotuzumab bindet spezifisch an EGF-R und EGF-R vIII exprimierende Zellen.

Die Bindungseigenschaften von Nimotuzumab im Vergleich zu Cetuximab und Panitumumab wurde auf EGF-R exprimierenden Zellen durch indirekte Immunofluoreszenz untersucht: (A) A431-Zellen, (B) BaF3-Zellen, (C) BaF3-Zellen mit EGF-R transfiziert und (D) BaF3-Zellen mit EGF-R vIII transfiziert.

Die Zellen wurden mit ansteigenden Konzentrationen der jeweiligen Antikörper inkubiert, dann mit FITC-konjugiertem Sekundärantikörper gefärbt und anschließend mithilfe der Durchflusszytometrie analysiert. Sowohl Nimotuzumab wie auch Cetuximab und Panitumumab zeigten eine spezifische Bindung zum humanen EGF-R, wobei Cetuximab und Panitumumab höhere Affinitäten aufwiesen als Nimotuzumab. Es konnte ebenfalls gezeigt werden, dass Nimotuzumab wie auch Cetuximab und Panitumumab an EGF-R vIII banden. Hier besaß Cetuximab eine deutlich höhere Affinität als Nimotuzumab und Panitumumab, die ein ähnliches Bindungsverhalten aufwiesen. Die Daten werden als Mittelwert \pm SEM von mindestens drei unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten gezeigt. Die relative Fluoreszenzintensität (RFI) wurde folgendermaßen berechnet: Durchschnittliche Fluoreszenzintensität (MFI) eines relevanten Antikörpers / Durchschnittliche Fluoreszenzintensität (MFI) eines irrelevanten Kontrollantikörpers. Signifikante Unterschiede ($p < 0,05$) zwischen den Antikörpern sind mit # gekennzeichnet.

Wirkmechanismen EGF-R gerichteter monoklonaler Antikörper können unterschieden werden in direkte Mechanismen, die durch den F(ab)-Teil vermittelt werden, und indirekte Mechanismen, die durch den Fc-Teil der Antikörper induziert werden. Zunächst werden die direkten Effektormechanismen von Nimotuzumab mit denen von Cetuximab und Panitumumab verglichen.

3.2 Blockade der Ligandenbindung

Die Hemmung der Ligandenbindung und damit Beeinflussung der Rezeptoraktivität ist ein direkter Mechanismus EGF-R gerichteter Antikörper. Für die Untersuchung wurden Nimotuzumab, Cetuximab und Panitumumab in einer Konzentration von 200 $\mu\text{g/ml}$ mit FITC-konjugiertem EGF und A431-Zellen inkubiert, welche anschließend mittels Durchflusszytometrie analysiert wurden. Die Verdrängung des Liganden zeigte sich durch eine verminderte Fluoreszenzintensität von FITC konjugiertem EGF mit Antikörper im Vergleich zur Fluoreszenzintensität von FITC konjugiertem EGF ohne Antikörper. Nimotuzumab ($18,5 \pm 1,4$ % Inhibition der EGF-Bindung) als auch Cetuximab ($94,0 \pm 1,9$ % Inhibition der EGF-Bindung) und Panitumumab ($95,3 \pm 1,9$ % Inhibition der EGF-Bindung) blockierten die EGF-Bindung in Vergleich zur humanen IgG1 Isotypen-Kontrolle ($1,0 \pm 0,6$ % Inhibition der EGF-Bindung) signifikant (p -Wert: $< 0,0003$), wobei Nimotuzumab mit $18,5 \pm 1,4$ % signifikant (p -Wert: $< 0,0001$) geringer die EGF-Bindung inhibierte als Cetuximab und Panitumumab (Abbildung 9).

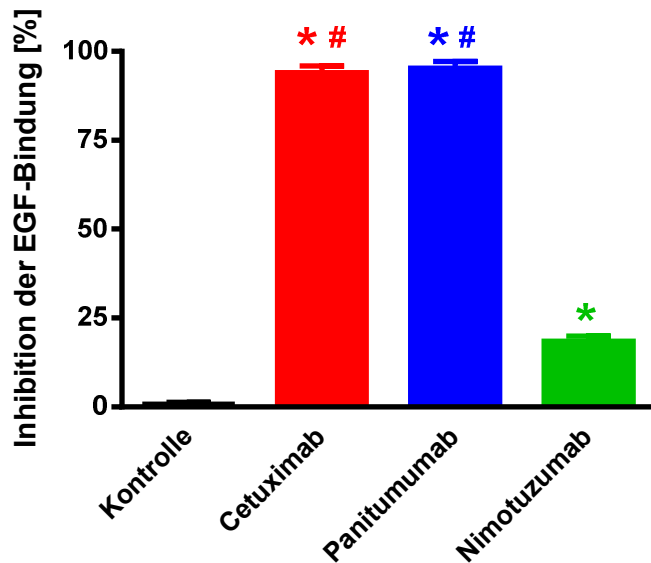


Abbildung 9. Nimotuzumab blockiert die Bindung von Liganden an den EGF-R

Die Verdrängung des Liganden durch Antikörper wurde in der Durchflusszytometrie untersucht. Dazu wurden A431-Zellen mit Nimotuzumab, Cetuximab und Panitumumab in einer Konzentration von 200 µg/ml und 2,5 µg/ml FITC-konjugiertem EGF koinkubiert. Nimotuzumab wie auch Cetuximab und Panitumumab blockierten signifikant die Bindung von EGF an den EGF-R. Die Hemmung der Ligandenbindung wurde folgendermaßen berechnet: Blockade von EGF-Bindung = (RFI ohne - RFI mit Antikörper) / (RFI ohne Antikörper) x 100. Die Daten werden als Mittelwert ± SEM von mindestens drei unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten gezeigt. Signifikante Inhibition im Vergleich zu einer Isotypen Kontrolle (dargestellt als (*)) oder signifikante Unterschiede zwischen den Antikörpern (dargestellt als (#)) wurden angegeben, wenn $p \leq 0,05$ zu bestimmen war.

3.3 Beeinflussungen der Signalwege des EGF-R

Durch Blockade der EGF-Bindung modulieren Antikörper intrazelluläre Signalwege und beeinflussen auf diese Weise wichtige biologische Funktionen wie Wachstum und Differenzierung der Zellen [3]. Relevante Signalwege des EGF-R laufen über MAP-K (Mitogen-aktivierte-Kinasen), PI3-K (Phosphatidylinositol-3-Kinase) und den PLC γ 1 (Phospholipase-C- γ 1) ab, die durch die Phosphorylierung von Tyrosinresten des Rezeptors induziert werden.

Um die Beeinflussung der Signalwege durch Nimotuzumab im Vergleich zu Cetuximab und Panitumumab zu untersuchen, wurden in Western Blot Analysen die Tyrosinreste 1068 (Aktivierung von MAP-K und PI3-K) und 1173 (Aktivierung von PLC γ 1) betrachtet. Als Zellmodell wurden mit humanem EGF-R transfizierte BaF3-Zellen verwendet, die mit EGF und den Antikörpern koinkubiert wurden. Anschließend wurde eine Proteinisolierung durchgeführt. Die gewonnenen Proteine

der Zellen wurden auf Tris-Acetat-Gelen unter reduzierenden Bedingungen aufgetrennt und auf PVDF-Membranen übertragen, auf denen die phosphorylierten Tyrosinreste 1068 und 1173 mittels phosphorylierungsspezifischer Antikörper nachgewiesen wurden. Als Mengen- und Beladungskontrollen wurden Total-EGF-R und Actin erfasst. Die Western Blot Analysen wurden anschließend densitometrisch quantifiziert und die relative Dichte folgendermaßen berechnet: Relative Dichte = Signalintensität eines Antikörper/ Signalintensität Actin.

Zunächst ergab sich nach Aktivierung durch EGF ein starkes Signal ohne einen Antikörper und mit der IgG1 Isotypenkontrolle. Im Vergleich dazu zeigte Nimotuzumab wie auch Cetuximab und Panitumumab eine Inhibierung der Phosphorylierung der Tyrosinreste 1068 und 1173 (Abbildung 10A). Die densitometrische Quantifizierung ergab, dass die Inhibierung der Phosphorylierung von Y1068 durch Nimotuzumab ($1,6 \pm 0,6$ relative Dichte) geringer ausfiel als die Inhibierung durch Cetuximab ($0,4 \pm 0,18$ relative Dichte) und Panitumumab ($0,18 \pm 0,04$ relative Dichte; Abbildung 10B). Auch die Phosphorylierung von Y1173 wurde durch Nimotuzumab ($1,2 \pm 0,1$ relative Dichte) schwächer blockiert als durch Cetuximab ($0,4 \pm 0,1$ relative Dichte) und Panitumumab ($0,44 \pm 0,1$ relative Dichte; Abbildung 10C). Dabei ließen sich für Cetuximab (p-Wert: $<0,0312$) und Panitumumab (p-Wert: $<0,0434$) signifikante Werte in Relation zur Isotypenkontrolle berechnen. Total EGF-R als Kontrolle der vergleichbaren Menge an EGF-R demonstrierte unterschiedliche Signalintensitäten mit Nimotuzumab, Cetuximab, Panitumumab und der Isotypenkontrolle: die Ansätze ohne Antikörper und mit Isotypen Kontrolle wiesen schwache Signale auf, die Ansätze mit Nimotuzumab, Cetuximab und Panitumumab zeigten hingegen stärkere Signale (Abbildung 10A). Dies ließe sich dadurch erklären, dass die Bindung von EGF zu einer verminderten EGF-R Produktion durch einen negativen Feedback Mechanismus führt. Die densitometrischen Quantifizierung aller Experimente (n=9) ergab aber kaum Unterschiede in der Signalintensität des Total EGF-R (Abbildung 10D).

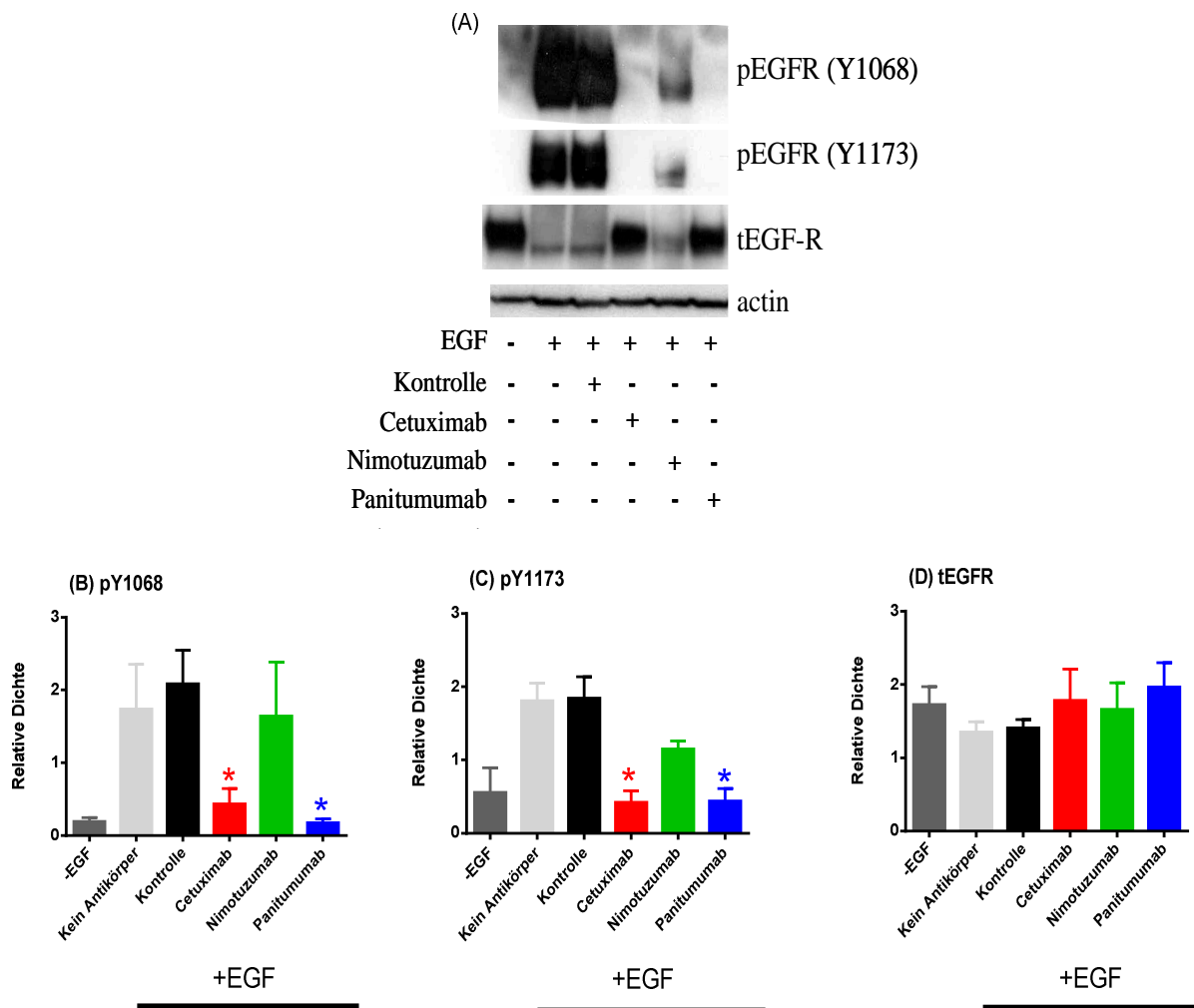


Abbildung 10. Inhibition der EGF-R Phosphorylierung durch Nimotuzumab

Der Einfluss von Nimotuzumab, Cetuximab und Panitumumab auf die Signalkaskade des EGF-R wurde durch Western Blot Analysen untersucht. Als Zellmodell dienten die mit EGF-R transfizierten BaF3-Zellen. Der Status der EGF-R Phosphorylierung wurde an den Positionen pY1068 und pY1173 bestimmt. Total-EGF-R und Aktin dienten als Mengen- und Ladekontrollen. Die Zellen wurden mit je 5 µg/ml Antikörpern 3 Stunden inkubiert, und für 20 Minuten mit 20 ng/ml humanes EGF aktiviert. Es wurde zusätzlich eine humane IgG1 Isotypen Kontrolle verwendet. **(A)** Ein repräsentatives von 3 unabhängig durchgeführten Experimenten ist dargestellt. Nimotuzumab wie auch Cetuximab und Panitumumab hemmten die Phosphorylierung der Tyrosinreste 1068 und 1173 im Vergleich zur IgG1 Isotypenkontrolle, wobei Nimotuzumab eine schwächere Inhibition zeigte als Cetuximab und Panitumumab. Zusätzlich wurden die Western Blot Analysen von pY1068 **(B)**, pY1173 **(C)**, total EGF-R **(D)** densitometrisch quantifiziert. Die Daten werden als Mittelwert ± SEM von mindestens drei unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten gezeigt. Signifikante Inhibition im Vergleich zu einer Isotypen Kontrolle (dargestellt als (*)) wurde angegeben, wenn $p \leq 0,05$ zu bestimmen war.

3.4 Hemmung des Zellwachstums

Die Inhibierung des Zellwachstums stellt einen weiteren direkten Wirkmechanismus von EGF-R gerichteten Antikörpern dar. Das Prinzip der Untersuchung (MTT) dieser Fähigkeit beruhte dabei auf der Metabolisierung eines Substrates durch mitochondriale Dehydrogenasen der Tumorzellen. Als Zellmodell dienten mit humanem EGF-R transfizierte BaF3-Zellen [130]. Diese Zellen wachsen IL-3 abhängig, lassen sich aber nach der Transfektion auch EGF-abhängig kultivieren. Die Zellen wurden 72 h zusammen mit den Liganden EGF, Epiregulin bzw. TGF-alpha und den Antikörpern Nimotuzumab, Cetuximab und Panitumumab inkubiert. Nimotuzumab blockierte das Zellwachstum von BaF3-Zellen in Gegenwart von EGF - ohne IL-3 - in hohen Konzentrationen von 10-20 µg/ml signifikant ($92,3 \pm 2,3$ % Zellwachstum) im Vergleich zur IgG1 Isotypenkontrolle, während Cetuximab ($53,3 \pm 8,9$ % Zellwachstum) und Panitumumab ($43,5 \pm 13,4$ % Zellwachstum) sowohl in hohen als auch in niedrigeren Konzentrationen das Wachstum signifikant inhibierten. Zudem ließen sich für Cetuximab und Panitumumab signifikante Unterschiede zu Nimotuzumab berechnen (Abbildung 11A). Nach Inkubation mit TGF- α - ohne IL-3 - ließ sich bei allen drei Antikörpern eine signifikante Hemmung des Zellwachstums feststellen. Nimotuzumab ($82,4 \pm 1,7$ % Zellwachstum) und Panitumumab ($27,8 \pm 12,1$ % Zellwachstum) inhibierten in Konzentrationen von 10-20 µg/ml das Wachstum signifikant, Cetuximab ($27,3 \pm 9,7$ % Zellwachstum) in Konzentrationen von 0,1- 20 µg/ml. Auch hier konnten signifikante Unterschiede zwischen Nimotuzumab und Cetuximab bzw. Panitumumab ermittelt werden (Abbildung 11B). In Anwesenheit von Epiregulin - ohne IL-3 - reduzieren alle drei Antikörper das Zellwachstum signifikant in Konzentrationen von 0,1- 20 µg/ml (Cetuximab: $28,0 \pm 7,6$ % Wachstum; Nimotuzumab: $60,8 \pm 3,1$ % Wachstum; Panitumumab: $17,1 \pm 5,5$ % Wachstum), wobei die Wirkung aller Antikörper unter diesen Bedingungen am stärksten war. Zusammenfassend hemmt Nimotuzumab im Vergleich zu Cetuximab und Panitumumab das Wachstum von BaF3-Zellen weniger effektiv, aber in Konzentrationen von 0,1- 20 µg/ml ebenfalls signifikant. Nach Zugabe von IL-3 (Negativ-Kontrolle) konnte in keinem der Fälle Wachstumsinhibition beobachtet werden (Abbildung 11C).

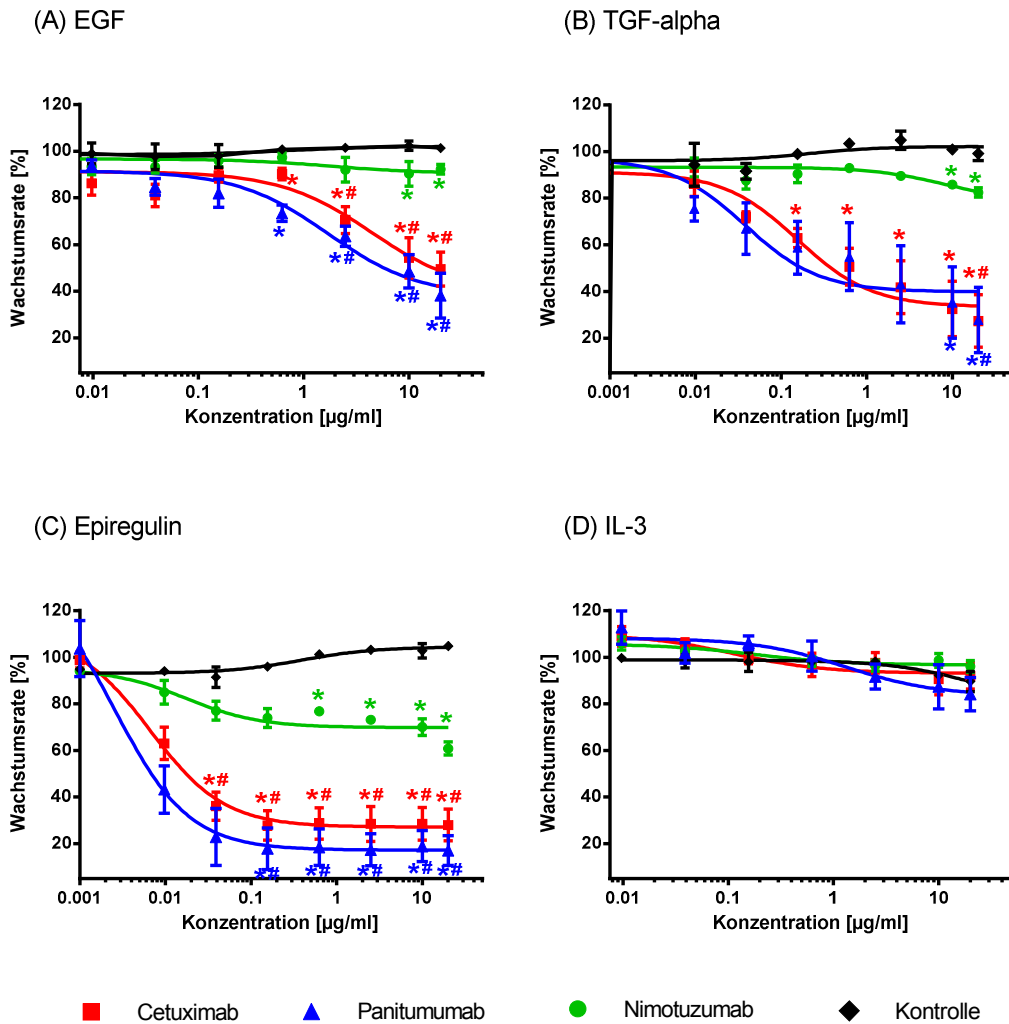


Abbildung 11. Nimotuzumab beeinträchtigt das Zellwachstum.

Der Einfluss der Antikörper auf das Tumorzellwachstum wurde mithilfe des MTT-Kits bestimmt. Als Zellmodell wurden BaF3-Zellen verwendet, die normalerweise IL-3 abhängig wuchsen. Durch die Transfektion mit EGF-R waren sie aber in der Lage in Abwesenheit von IL-3, EGF-R abhängig zu wachsen. Bei diesen Experimenten wurden die BaF3-Zellen in Medium kultiviert, das (A) 10 ng/ml humanes EGF (EGF-R abhängig), (B) 10 ng/ml human TGF- α (EGF-R abhängig), (C) 10 ng/ml Epiregulin (EGF-R abhängig) oder mit (D) mIL-3 (EGF-R unabhängig) enthält, und für 72 Stunden mit den Antikörpern Nimotuzumab, Cetuximab, Panitumumab, humaner IgG1 Isotyp-Kontrolle und Rituximab in ansteigenden Konzentrationen kokkubiert. Nimotuzumab war in der Lage, das Wachstum von BaF3-Zellen zu hemmen. Dabei zeigte sich die Inhibierung in Gegenwart von Epiregulin stärker als in Gegenwart von EGF oder TGF- α . Im Vergleich zu Cetuximab und Panitumumab war die Wachstumshemmung aber schwächer. Das Wachstum von mit Rituximab behandelten Zellen wurde als 100 % Zellwachstum definiert. Die Wachstumsrate wurde folgendermaßen ermittelt: Wachstumsrate in % = Absorption in der Anwesenheit von EGF-R Antikörpern/ Absorption in Anwesenheit von Rituximab x 100. Die Daten werden als Mittelwert \pm SEM von mindestens drei unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten gezeigt. Signifikante Wachstumsinhibierung im Vergleich zu einer Isotypen Kontrolle (dargestellt als (*)) oder signifikante Unterschiede zwischen den Antikörpern (dargestellt als (#)) wurden angegeben, wenn $p \leq 0,05$ zu bestimmen war.

3.5 ADCC

In den folgenden Experimenten wurden die indirekten Wirkmechanismen von Nimotuzumab untersucht. EGF-R gerichtete Antikörper sind in der Lage, über Fc-Rezeptoren Effektorzellen wie Monozyten, NK-Zellen und Granulozyten zu rekrutieren und dadurch ADCC (Antikörper-Abhängige zelluläre Zytotoxizität, Antibody-depedent cellular cytotoxicity) gegen Tumorzellen zu induzieren [92]. Als Zielzellen dienten hier A431- und A1207-Zellen, als Effektorzellen isolierte MNC (NK-Zellen und Monozyten), PMN (Granulozyten), die zum Teil mit GM-CSF (Granulocyte macrophage colony-stimulating factor) stimuliert wurden, und Vollblut unterschiedlicher gesunder freiwilliger Spender. Die Zielzellen wurden zwei Stunden vor Inkubation mit radioaktiven $^{51}\text{Chrom}$ behandelt und danach mit Nimotuzumab, Cetuximab, Panitumumab und einer IgG1 Isotypenkontrolle sowie den jeweiligen Effektorzellen in einem Verhältnis von 1:80 für drei Stunden koinkubiert. Die Lyse der Tumorzellen wurde anhand des Anteils an freigesetztem $^{51}\text{Chrom}$ bestimmt.

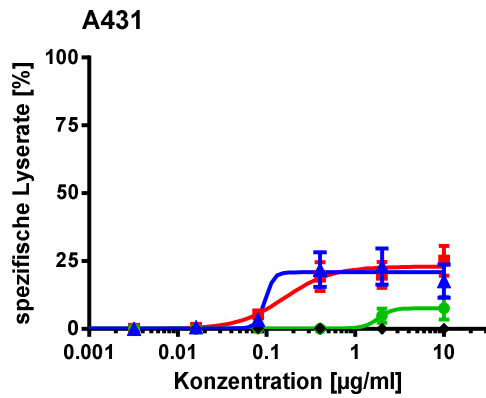
Nimotuzumab wie auch Cetuximab und Panitumumab vermittelten ADCC gegen A431- und A1207-Zellen mit unstimulierten PMN. Nimotuzumab bewirkte sowohl bei A431-Zellen (max. Lyserate: $7,7 \pm 4,2$ %) als auch bei A1207-Zellen (max. Lyserate: $16,1 \pm 9,6$ %) eine niedrigere Lyse im Vergleich zu Cetuximab (max. Lyserate: $26,3 \pm 7,6$ %) und Panitumumab (max. Lyserate: $17,7 \pm 7,1$ %), die bei A431-Zellen vergleichbare Lyseraten induzierten. Panitumumab vermittelte bei A1207-Zellen hingegen deutlich höhere und signifikante (p-Wert: $\leq 0,05$) Lyseraten (max. Lyserate: $63,2 \pm 10,2$ %) ab einer Konzentration von $0,4 \mu\text{g/ml}$, wohingegen Nimotuzumab als auch Cetuximab unstimulierte PMN nicht signifikant aktivierten (Abbildung 12A).

Nimotuzumab induzierte ADCC mit GM-CSF stimulierten PMN in deutlich höherem Maße als mit unstimulierten PMN, wobei die Lyse sowohl bei A431-Zellen (max. Lyserate: $60,2 \pm 11,6$ %) als auch bei A1207-Zellen (max. Lyserate: $68,8 \pm 1,2$ %) niedriger war als bei Cetuximab und Panitumumab. Bei A1207-Zellen zeichnete Panitumumab (max. Lyserate: $95,3 \pm 7,2$ %) sich durch höhere Lyseraten als Cetuximab (max. Lyserate: $85,5 \pm 6,4$ %) aus. Für alle drei Antikörper ließen sich signifikante (p-Wert: $\leq 0,05$) Lyseraten berechnen, aber auch signifikante Unterschiede von Cetuximab und Panitumumab gegenüber Nimotuzumab (Abbildung 12B).

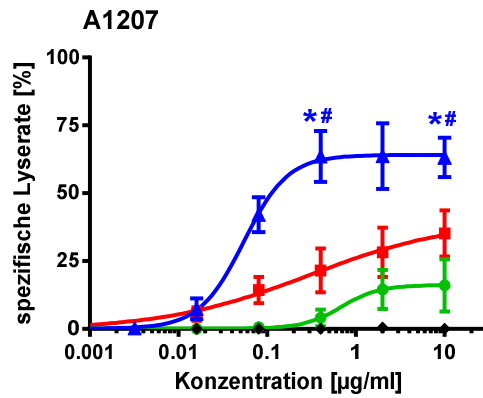
In weiteren Versuchen konnte gezeigt werden, dass Nimotuzumab MNC als Effektorzellen rekrutieren und sowohl mit A431-Zellen (max. Lyserate: $30,8 \pm 5,2$ %) als auch mit A1207-Zellen (max. Lyserate: $30,4 \pm 7,9$ %) ADCC vermitteln konnte. Interessanterweise erzielte Panitumumab bei diesen Experimenten niedrigere Lysewerte im Vergleich zu Cetuximab und Nimotuzumab ab einer Konzentration von $0,08 \mu\text{g/ml}$ mit A431-Zellen (max. Lyserate: $12,3 \pm 5,4$ %) und ab einer Konzentration von $0,4 \mu\text{g/ml}$ bei den A1207-Zellen (max. Lyserate: $25,6 \pm 7,8$ %). Für Nimotuzumab ließen sich ab einer Konzentration von $2 \mu\text{g/ml}$ signifikante Lysewerte berechnen, für Cetuximab ab einer Konzentration von $0,08 \mu\text{g/ml}$ (Abbildung 12C).

Um den physiologischen Bedingungen näher zu kommen, wurde abschließend heparinisiertes unfraktioniertes Vollblut von gesunden Spendern verwendet. Nimotuzumab erreichte mit A431-Zellen (max. Lyserate: $10,5 \pm 7,3$ %) und A1207-Zellen (max. Lyserate: $13,6 \pm 4,8$ %) geringere Lyseraten als Cetuximab und Panitumumab. Cetuximab (max. Lyserate: $34,0 \pm 18,4$ %) induzierte ADCC gegen A431-Zellen stärker als Panitumumab (max. Lyserate: $25,8 \pm 11,0$ %), A1207-Zellen ließen sich über Panitumumab (max. Lyserate: $44,0 \pm 11,6$ %) in höherem Maße lysieren als über Cetuximab (max. Lyserate: $28,8 \pm 3,9$ %) (Abbildung 12D).

(A) PMN

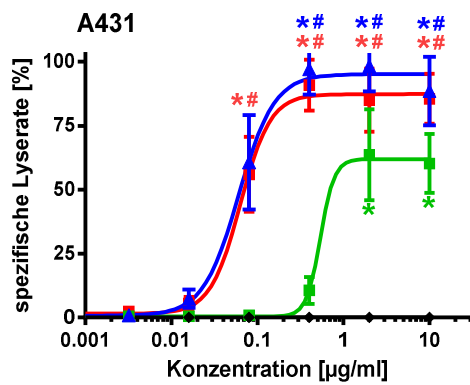


Antikörper	Max. Lyserate [%]	EC50 [µg/ml]	95 % CI [µg/ml]
Nimotuzumab	7,7 ± 4,2	1,9	0,1- 6,2
Cetuximab	26,3 ± 7,6	0,16	0,04- 0,55
Panitumumab	17,7 ± 7,1	0,1	0,001- 1,2

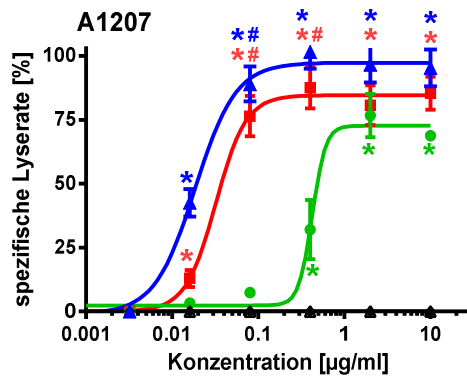


Antikörper	Max. Lyserate [%]	EC50 [µg/ml]	95 % CI [µg/ml]
Nimotuzumab	16,1 ± 9,6	0,7	0,08- 6,22
Cetuximab	35,0 ± 12,0	0,19	0,001- 29,80
Panitumumab	63,2 ± 10,2	0,08	0,03- 1,0

(B) PMN+GM-CSF

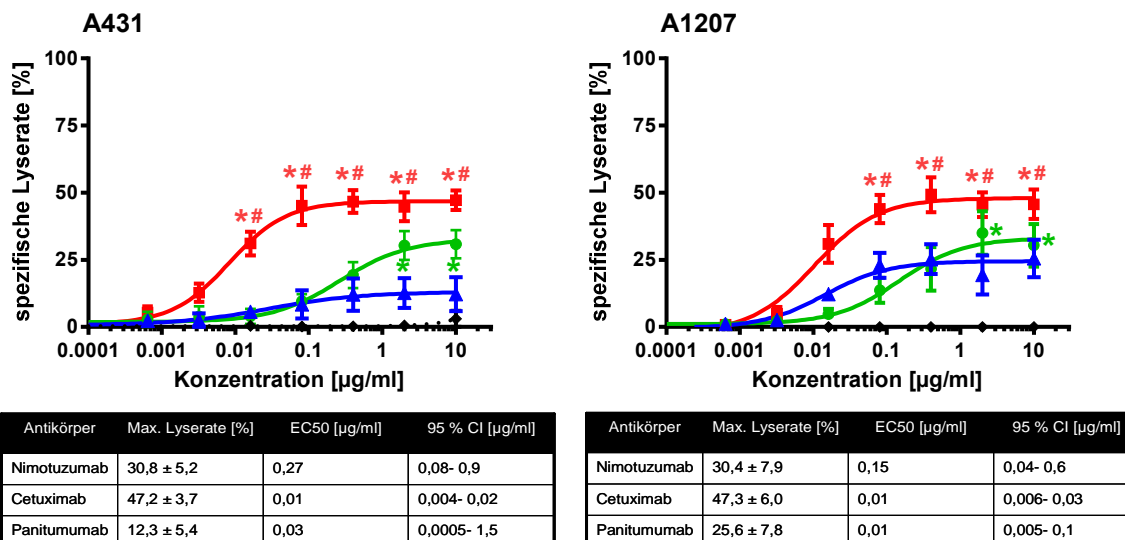


Antikörper	Max. Lyserate [%]	EC50 [µg/ml]	95 % CI [µg/ml]
Nimotuzumab	60,2 ± 11,6	0,54	0,0003- 55
Cetuximab	84,5 ± 12,6	0,05	0,02- 0,1
Panitumumab	91,97 ± 10,3	0,054	0,03- 0,1

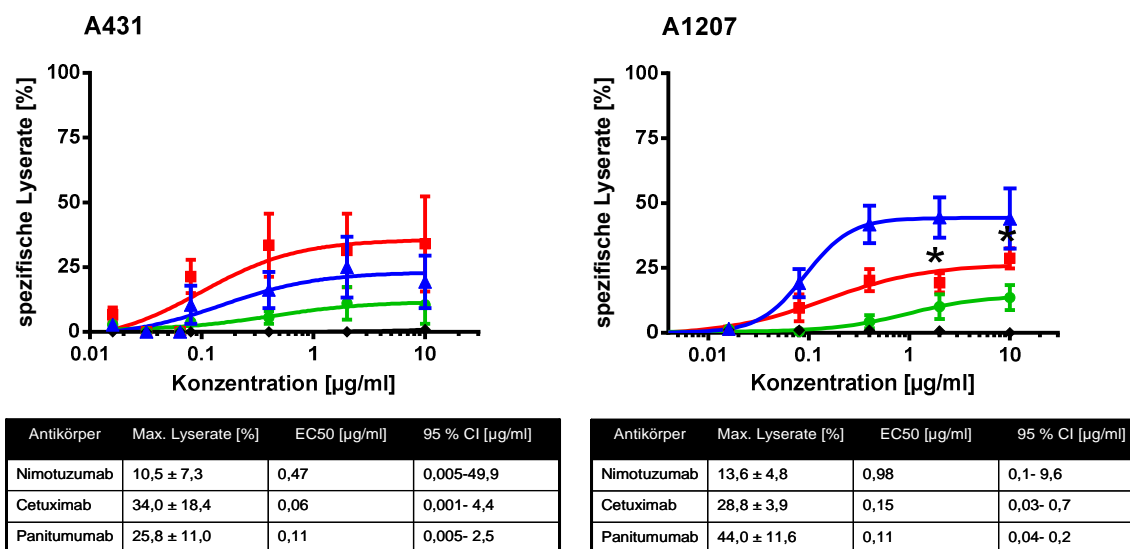


Antikörper	Max. Lyserate [%]	EC50 [µg/ml]	95 % CI [µg/ml]
Nimotuzumab	68,8 ± 1,2	0,42	0,004- 42,81
Cetuximab	85,5 ± 6,4	0,03	0,02- 0,05
Panitumumab	95,3 ± 7,2	0,02	0,01- 0,03

(C) MNC



(D) Vollblut



■ Cetuximab ▲ Panitumumab ● Nimotuzumab ◆ Kontrolle

Abbildung 12. Antikörper-abhängige Zelluläre Zytotoxizität (ADCC) von Tumorzellen durch Nimotuzumab. ADCC als Wirkungsmechanismus wurde mithilfe des ⁵¹Cr-release-assay untersucht. Mit radioaktivem Chrom markierte A431-Zellen und A1207-Zellen wurden mit ansteigenden Konzentrationen der jeweiligen Antikörper und isolierten (A) unstimulierten PMN, (B) *in vitro* mit GM-CSF stimulierten PMN (C) MNC (alle in einem Effektor/Target Verhältnis von 80:1) und (D) unfraktioniertem Vollblut (25 vol %) als Effektorzellen 3 Stunden inkubiert. Es wurde eine humane IgG1 Isotyp Kontrolle verwendet. Die Ergebnisse zeigten, dass Nimotuzumab in der Lage war, ADCC sowohl über PMN als auch MNC zu induzieren. Im Vergleich zu Cetuximab waren die Lyseraten aber niedriger. Panitumumab zeigte sich effektiv in der Aktivierung von PMN, dagegen nur schwach wirksam bei MNC.

Die Daten werden als Mittelwert \pm SEM von mindestens vier unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten mit unterschiedlichen gesunden Spendern gezeigt. Signifikante Lyse im Vergleich zu der Kontrolle (dargestellt als (*)) oder signifikante Unterschiede zwischen den Antikörpern (dargestellt als (#)) werden angegeben, wenn $p \leq 0,05$ zu bestimmen war.

3.6 Visualisierung des ADCC

Zusätzlich zu den funktionellen Untersuchungen sollte der ADCC visuell dargestellt werden. Dazu wurden A431-Zellen und PMN (Granulozyten) mit Hilfe von fluoreszierenden Farbstoffen (Vybrant Cell-Labeling Solutions) markiert, wobei A431-Zellen rot fluoreszierend bzw. PMN grün fluoreszierend gefärbt wurden. Nach der Färbung wurden die Zellen in einem Verhältnis von 1:80 mit je 20 $\mu\text{g/ml}$ Nimotuzumab, Cetuximab, Panitumumab und einer IgG-Isotypkontrolle 3 h Stunden inkubiert und sowohl zu Beginn der Inkubation ($t= 0\text{h}$) und nach 2 Stunden ($t= 2\text{h}$) unter dem Fluoreszenzmikroskop ausgewertet. Die Ergebnisse wurden photographisch festgehalten (Abbildung 13).

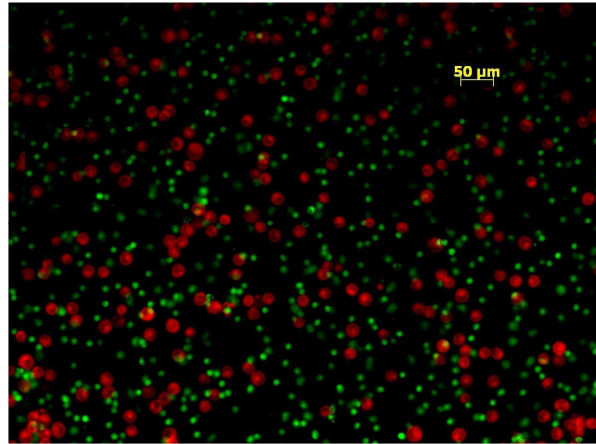
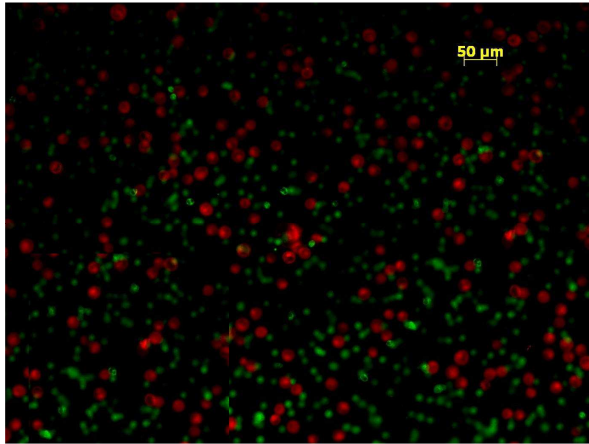
Zu Beginn des Versuches ($t= 0\text{h}$) zeigten alle Antikörper ein vergleichbares Bild: A431-Zellen (rot) und PMN (grün) stellten sich ohne räumliche Nähe zueinander dar. Zwei Stunden später ergaben sich aber deutliche Unterschiede zwischen den verschiedenen Antikörpern: die Inkubation mit der Isotypkontrolle führte zu keiner morphologischen Veränderung, wohingegen durch Nimotuzumab eine geringe Clusterbildung bzw. eine räumliche Annäherung der PMN an die A431-Zellen zu beobachten war. Die Zellen behielten weitgehend ihre Morphologie und wirkten vital. Bei Cetuximab und Panitumumab hatte sich das Bild noch deutlicher verändert: beide Antikörper bewirkten, dass die Tumorzellen fest miteinander verbunden waren und große Zellcluster bildeten. In den großen Zellclustern schien es, als ob die PMN Ansammlungen um die Tumorzellen bildeten. Die Granulozyten hatten ihre Morphologie vollständig verloren und stellten sich als zähe, konfluierende Masse dar. Die A431-Zellen veränderten im Cluster ihre Form. Nach 3 Stunden (Bild nicht gezeigt) war die Morphologie der Zellen nicht mehr erkennbar, es blieben nur Zellfragmente zurück.

Korrelierend zum ADCC zeigten Cetuximab und Panitumumab, die hohe Tumorzell-Lyseraten mit PMN erzielten, eine starke Aggregation der Zellen und induzierten Zelltod. Nimotuzumab bewirkte weniger hohe Lyseraten im ADCC und induzierte kaum die Bildung von Zellclustern.

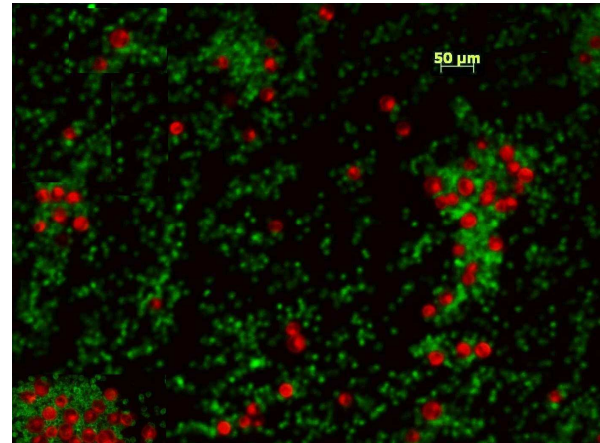
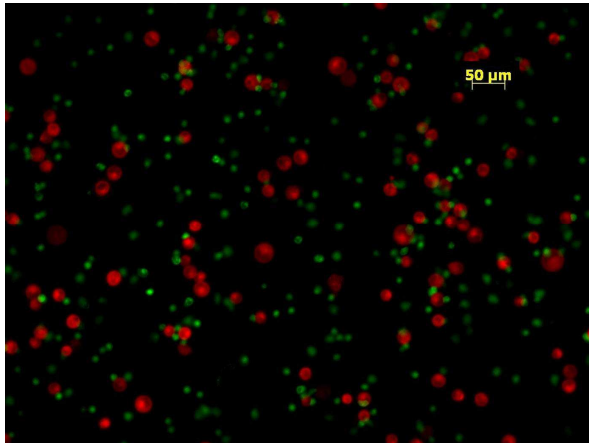
t= 0

t= 2h

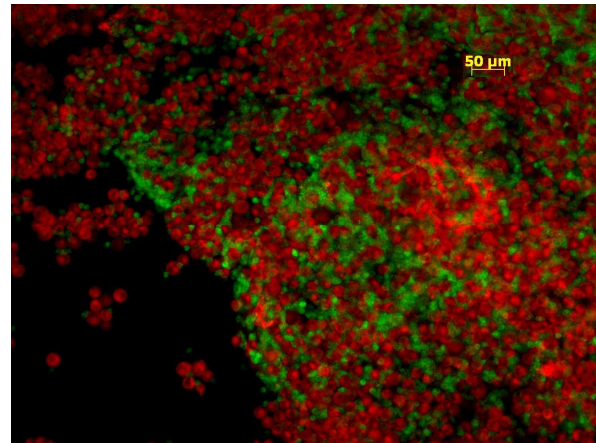
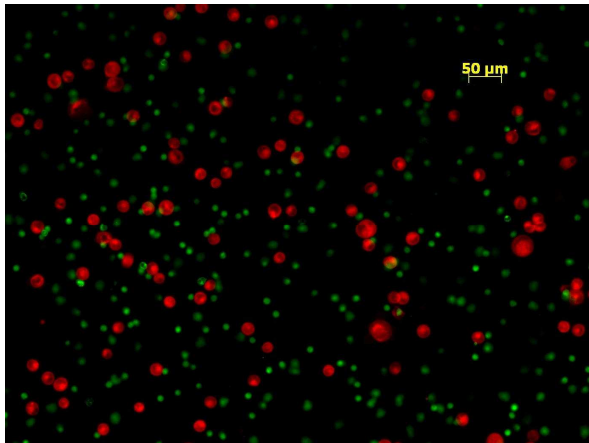
Kontrolle



Nimotuzumab



Cetuximab



Panitumumab

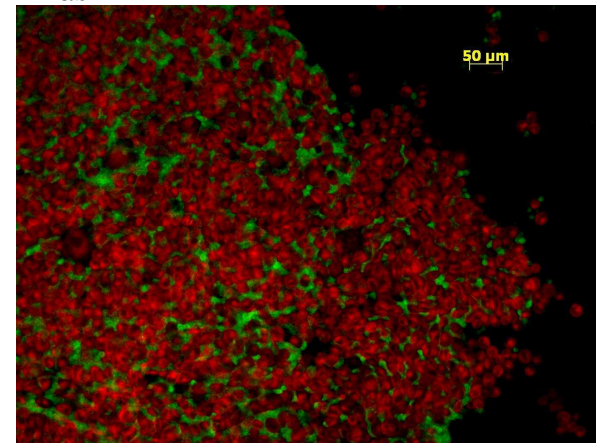
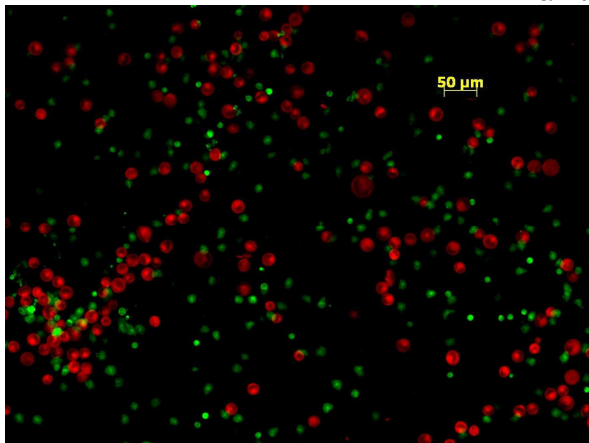


Abbildung 13. Fluoreszenzfärbung und Darstellung des ADCC

A431-Zellen (rot) wurden und PMN (grün) wurden mit fluoreszierenden Farbstoffen markiert und in einer Ratio von 1:80 mit je 20 µg/ml Nimotuzumab, Cetuximab, Panitumumab und einer Isotypenkontrolle 3 h Stunden inkubiert. Gezeigt sind exemplarische Ergebnisse von mehreren unabhängigen Färbungen zu Beginn des Versuches (t= 0h) und nach 2 Stunden (t= 2h). Die Bilder wurden im roten und grünen Filter fotografiert und anschließend fusioniert. Cetuximab und Panitumumab bewirkten eine Aggregation und einen Morphologieverlust der Zellen. Nimotuzumab zeigte kaum die Fähigkeit zur Aggregatbildung. Die Zellen behielten weitgehend ihre Morphologie.

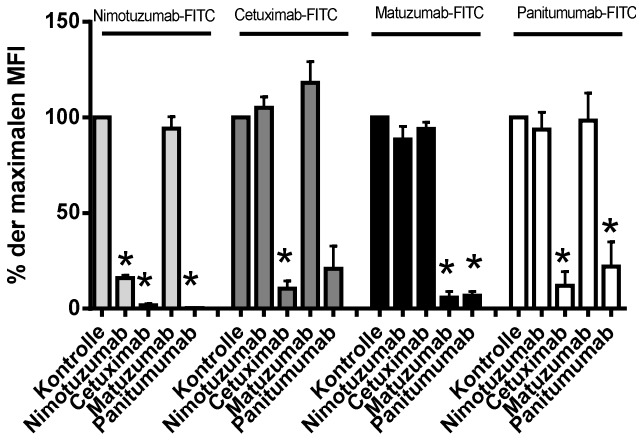
3.7 CDC

Auch das Komplementsystem kann mittels Antikörper für die Tumorzellbekämpfung aktiviert werden [112]. Untersuchungen zeigten, dass EGF-R gerichtete IgG-Antikörper dazu aber einzeln nicht in der Lage sind, sondern die Kombination von mindestens zwei Antikörpern mit nicht-überlappenden Epitopen notwendig ist [132]. Deshalb stellte sich die Frage, ob Nimotuzumab die Fähigkeit besitzt, das Komplementsystem zu aktivieren. Im ersten Schritt wurden die Bindungsepitope von Nimotuzumab, Cetuximab, Panitumumab und Matuzumab untersucht. Durch direkte Immunfluoreszenz wurde dies auf A431-Zellen analysiert, die mit 5 µg/ml eines FITC-markierten EGF-R-Antikörpers und einem 200-fachen Überschuss eines anderen EGF-R-Antikörper koinkubiert wurden. Als maximales Fluoreszenzsignal (maximale MFI) wird die Kombination mit der unspezifischen Isotypenkontrolle definiert (Abbildung 14A). Es ergab sich eine signifikante Inhibition des Signals von Nimotuzumab-FITC in Anwesenheit von Cetuximab ($1,8 \pm 0,7$ % der maximalen MFI) und Panitumumab ($0,18 \pm 0,03$ % der maximalen MFI), was für überlappende Epitope dieser Antikörper mit Nimotuzumab spricht. Gleichzeitig zeigt sich aber in Gegenwart von Nimotuzumab keine Reduzierung des Signals von Cetuximab-FITC ($105,0 \pm 5,8$ % der maximalen MFI) und Panitumumab-FITC ($93,7 \pm 9,1$ % der maximalen MFI). Dies kann mit der geringeren Affinität von Nimotuzumab zum EGF-R im Vergleich zu den beiden anderen Antikörpern erklärt werden. Cetuximab und Panitumumab weisen ihrerseits ebenfalls überlappende Epitope auf, da sowohl die Inkubation von Cetuximab mit Panitumumab-FITC ($12,05 \pm 7,3$ % der maximalen MFI) als auch die Inkubation von Panitumumab mit Cetuximab-FITC ($20,9 \pm 11,7$ % der maximalen MFI) zu einer signifikanten Reduzierung der Fluoreszenzintensitäten führt. Nimotuzumab ($88,5 \pm 6,9$ % der maximalen MFI) und Cetuximab ($94,1 \pm 3,5$ % der maximalen MFI) bewirkten hingegen keine Abschwächung des Signals von Matuzumab-FITC. Umgekehrt übt Matuzumab

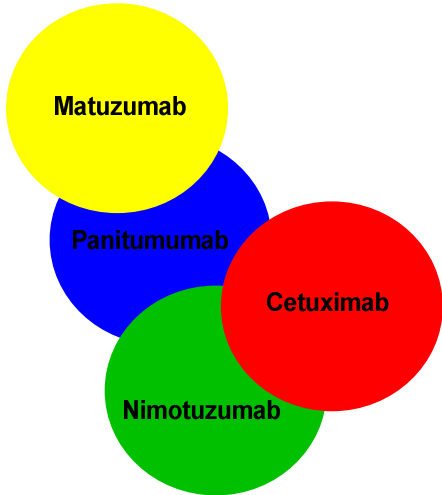
keinen Einfluss auf Cetuximab-FITC ($118,2 \pm 11,0$ % der maximalen MFI) und Nimotuzumab-FITC ($94,2 \pm 6,2$ % der maximalen MFI) aus. Cetuximab und Nimotuzumab besitzen also keine überlappenden Epitope mit Matuzumab. Auch das Signal von Panitumumab-FITC ($98,4 \pm 14,3$ % der maximalen MFI) wird nicht durch Matuzumab beeinflusst, wohingegen das Signal von Matuzumab-FITC signifikant durch Panitumumab ($6,8 \pm 2,1$ % der maximalen MFI) inhibiert wird. Auch dies könnte durch die geringere Affinität von Matuzumab zum EGF-R im Vergleich zu Panitumumab erklärt werden. Die Ergebnisse dieser Untersuchung wurden in (Abbildung 14B) graphisch zusammengefasst, wobei überlappende Kreisflächen überlappende Epitope veranschaulichen sollen. Aufgrund dieser Experimente wurden die Antikörper in ihrer Fähigkeit überprüft, das Komplementsystem zu aktivieren und damit Tumorzelllyse zu induzieren. A431-Zellen (Abbildung 14C) und A1207-Zellen (Abbildung 14D) dienten als Zielzellen. Diese wurden mit dem Serum gesunder Spender und den Antikörpern einzeln oder in Kombination in einer Gesamtkonzentration von $10 \mu\text{g/ml}$ inkubiert und im $^{51}\text{Chrom}$ -Freisetzungstest untersucht. Es zeigte sich Lyseraten für A431-Zellen mit Nimotuzumab von $5,1 \pm 2,8$ %, mit Cetuximab von $3,4 \pm 1,6$ %, mit Matuzumab von $9,5 \pm 4,4$ %, mit Panitumumab von $5,8 \pm 2,8$ % und mit der Isotypenkontrolle von $0,1 \pm 0,1$ %; für A1207-Zellen mit Cetuximab von $0,1 \pm 0,1$ %, mit Nimotuzumab von $4,0 \pm 2,5$ %, mit Matuzumab von $0,1 \pm 0,0$ %, mit Panitumumab von $2,1 \pm 1,1$ % und mit der Isotypkontrolle $0,0 \pm 0,0$ %. Keiner der Antikörper war also in der Lage, Tumorzellen über das Komplementsystem effektiv zu lysieren. Die Kombination aus Nimotuzumab und Matuzumab ergab signifikante Lyseraten bei A431-Zellen ($76,4 \pm 3,0$ %) und A1207-Zellen ($82,3 \pm 1,6$ %). Auch die Kombination aus Cetuximab und Matuzumab zeigte für A431-Zellen ($88,6 \pm 1,0$ %) und A1207-Zellen ($84,1 \pm 2,5$ %) signifikante Lyseraten. Alle anderen Kombinationen aktivierten das Komplementsystem wie erwartet nicht. Es zeigten sich maximale Lyseraten für A431-Zellen mit Nimotuzumab und Cetuximab von $2,7 \pm 1,3$ %, mit Nimotuzumab und Panitumumab von $2,5 \pm 1,4$ %, mit Cetuximab und Panitumumab von $2,0 \pm 1,2$ % und mit Panitumumab und Matuzumab von $0,9 \pm 0,6$ %, für A1207-Zellen mit Nimotuzumab und Cetuximab von $0,6 \pm 0,4$ %, mit Nimotuzumab und Panitumumab von $0,7 \pm 0,4$ %, mit Cetuximab und Panitumumab von $1,7 \pm 1,6$ % und mit Panitumumab und Matuzumab von $12,6 \pm 3,8$ %. Diese Versuche bestätigten, dass Nimotuzumab wie auch Cetuximab, Panitumumab und Matuzumab keine potente

Komplementaktivierung allein induzieren konnten. Bei nicht-überlappenden Bindungsepitopen der Antikörper wurden durch Zweierkombination jedoch signifikante Lyse zweier unterschiedlicher Tumorzelllinien mithilfe des Komplementsystems erreicht. Dies trifft sowohl auf die Kombination aus Cetuximab und Matuzumab als auch auf die Kombination aus Nimotuzumab und Matuzumab zu.

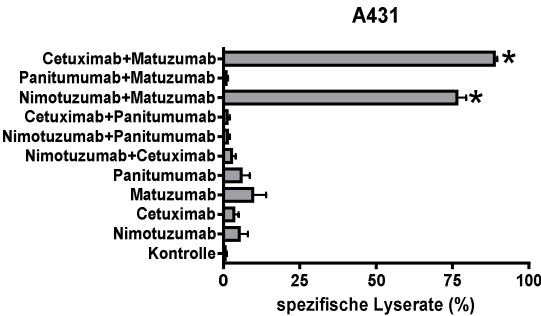
(A)



(B)



(C)



(D)

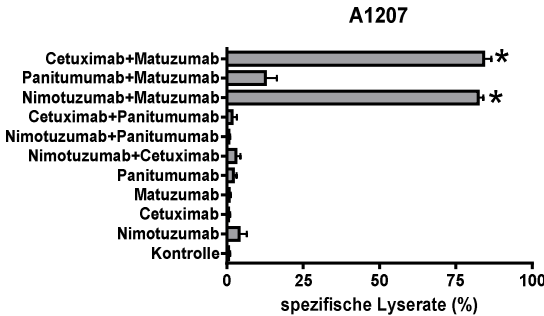


Abbildung 14. Nimotuzumab kann CDCvermitteln.

(A) A431-Zellen wurden mit einer nicht-sättigenden Konzentration der jeweiligen FITC-konjugierten Antikörper in Anwesenheit einer 200-fachen Konzentration der angegeben unmarkierten Antikörper markiert.

Die Immunofluoreszenzstärke in Anwesenheit von der Isotypen-Kontrolle wurde als maximale Immunofluoreszenzstärke festgelegt. Die Ermittlung der maximale MFI erfolgte wie im Material- und Methodenteil beschrieben.

Die Daten werden als Mittelwert \pm SEM von mindestens vier unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten gezeigt. Signifikante Inhibition im Vergleich zu der Isotyp Kontrolle (dargestellt als (*)) oder signifikante Unterschiede zwischen den Antikörpern (dargestellt als (#)) werden angegeben, wenn $p \leq 0,05$ zu bestimmen ist. In **(B)** werden die Daten der in **(A)** ermittelten Werte schematisch dargestellt: signifikante Verdrängung eines Antikörpers durch einen anderen ist in Form von überlappenden Kreisen dargestellt. Nicht-überlappende Kreise deuten daraufhin, dass sich die jeweiligen Antikörper nicht gegenseitig blockieren und verschiedene Bindungsepitope besitzen. Der Grad der Überlappung repräsentiert den Grad der Blockierung. Cetuximab und Nimotuzumab besitzen keine überlappende Epitope mit Matuzumab, Panitumumab hingegen schon. Cetuximab, Nimotuzumab und Panitumumab hindern sich gegenseitig in ihrer Bindung an den EGF-R. Aufgrund dieser Ergebnisse wurden Kombinationen von Antikörpern mit überlappenden und mit nicht überlappenden Epitopen auf ihre Fähigkeit hin untersucht, Komplement-abhängige Zytotoxizität (CDC) gegen **(C)** A431-Zellen und **(D)** A1207-Zellen auszulösen. Nimotuzumab sowie auch Cetuximab, Panitumumab und Matuzumab konnten alleine keine potente Komplementaktivierung für die Tumorzellbekämpfung induzieren. Die Kombination aus Cetuximab und Matuzumab als auch auf die Kombination aus Nimotuzumab und Matuzumab waren allerdings in der Lage, CDC zu aktivieren. Signifikante Lyse im Vergleich zu der Isotyp Kontrolle (dargestellt als (*)) wird angegeben, wenn $p \leq 0,05$ zu bestimmen ist.

4. Diskussion

Das Thema dieser Arbeit war die funktionelle Charakterisierung des EGF-R gerichteten Antikörpers Nimotuzumab. Dabei sollte dieser mit den bereits in der klinischen Anwendung etablierten IgG-Antikörpern Cetuximab und Panitumumab verglichen werden. Nimotuzumab ist ein humanisierter monoklonaler Antikörper, der auf Tumore ausgerichtet ist, die den EGF-R exprimieren. Er unterscheidet sich durch sein günstiges Nebenwirkungsprofil von anderen derzeit am Markt befindlichen EGF-R-gerichteten Medikamenten. Die Kombination von Nimotuzumab und Radiotherapie führte bei unter 10 % aller Patienten zu toxischen Hautreaktionen, davon < 1 % Grad III oder IV. Cetuximab und Radiotherapie oder Panitumumab und Radiotherapie verursachen dagegen bei bis zu 90 % der Patienten toxische Hautreaktionen, davon 25 bis 60 % Grad III oder IV [91, 92]. Verschiedene klinische Studien führten zur Zulassung von Nimotuzumab in mehr als 23 Ländern.

Das erste Ergebnis dieser Charakterisierung war, dass Nimotuzumab spezifisch sowohl an den EGF-R als auch an die Mutation EGF-R vIII bindet, wenn auch mit einer signifikant geringeren Affinität als Cetuximab und Panitumumab. Dieser Unterschied war unabhängig von der EGF-R-Dichte auf den Tumorzellen: sowohl auf A431-Zellen mit hoher EGF-R Expression ($2,2 \times 10^6$ EGF-R Moleküle/Zellen) als auch auf transfizierten BaF3-Zellen mit niedriger EGF-R Expression ($1,4 \times 10^4$ EGF-R Moleküle/Zelle). Dies steht im Widerspruch zu einer publizierten Studie, in der gezeigt wurde, dass die Affinität von Nimotuzumab zum EGF-R – passend zu unseren Ergebnissen – an sich nur mittelhoch ist, aber mit steigender EGF-R Dichte bivalente Bindungen möglich werden, so dass Nimotuzumab bei hoher EGF-R Dichte eine ähnliche Affinität wie Cetuximab besitzen soll [121]. Diese Eigenschaft soll dafür sorgen, dass der Antikörper an Geweben mit höherer EGF-R-Dichte - somit hauptsächlich an Tumorzellen - akkumuliert, was zu relativer Tumorspezifität führen soll. Diese „selektive Bindung“ sei ein Grund für das günstige Nebenwirkungsprofil von Nimotuzumab [104]. Die Ursache für die Divergenz der Ergebnisse beider Studien ist unklar. Auch in der beschriebenen Studie von Garrido wurde indirekte Immunfluoreszenz auf A431 Zellen gemessen. Auffällig ist jedoch, dass in diesen Experimenten kein Sättigungsbereich erreicht wurde, selbst bei so hohen Konzentration wie 1000 nM (ca. 150 µg/ml). Unsere Ergebnisse lassen jedoch ebenfalls den Schluss zu, dass Nimotuzumab durch seine geringere Affinität weniger

stark an EGF-R exprimierende Zellen wie z.B. auch normale Epithelzellen bindet und dadurch ein günstigeres Nebenwirkungsprofil haben könnte.

Das Verdrängen der Liganden und damit das Beeinflussen der Signalwege des EGF-R ist ein weiterer beschriebener Wirkungsmechanismus von EGF-R-gerichteten Antikörpern [60]. Nimotuzumab zeigte hier die Fähigkeit, EGF-Bindung signifikant zu blockieren. Die Inhibition durch Cetuximab und Panitumumab war aber in Relation wesentlich effektiver. Dies passt zu den Angaben in der Literatur, dass Nimotuzumab wie auch die anderen Antikörper an die extrazelluläre Domäne III bindet und die Liganden verdrängt, seine Affinität zum EGF-R sich jedoch nicht wesentlich vom Liganden EGF selbst unterscheidet ($4,5 \times 10^{-8}$ M).

Die Blockade des Liganden beeinflusst direkt die Signaltransduktion des EGF-R [70]. Über die Tyrosinreste Y1068 und Y1173 werden die Signalwege von MAPK, PI3K und PLC γ 1 und somit die Zellproliferation und Differenzierung gesteuert [33-35]. Die Ergebnisse der Western Blot Analysen zeigten, dass Nimotuzumab die Aktivierung des Rezeptors beeinflusst. Die Aktivierung der Tyrosinreste Y1068 und Y1173 konnten durch Nimotuzumab schwach inhibiert werden. Cetuximab und Panitumumab blockierten diese Aktivierung im Gegensatz dazu stärker. Dieser Umstand könnte damit erklären werden, dass Nimotuzumab in der Lage ist, mit der Bindungsstelle für Liganden zu interferieren, dem Rezeptor aber trotzdem den Übergang von der inaktiven in die aktive Form erlaubt. Dabei bindet Nimotuzumab zwar an die extrazelluläre Domäne III des Rezeptors und stört die Bindung der Liganden, ermöglicht aber eine Annäherung der Domäne I und der Domäne III. So kann eine Dimerisierung stattfinden und der Rezeptor aktiviert werden [68]. Andere etablierte Antikörper wie Cetuximab blockieren ebenfalls die Ligandenbindung, behindern aber zusätzlich den sterischen Übergang in die aktive Konformation und damit die Dimerisierung und letztendlich Aktivierung des Rezeptors [18, 105]. So werde demnach eine Balance zwischen aktiver und inaktiver Konformation erhalten. Dieser basale Level von Liganden-unabhängiger Rezeptoraktivierung sei notwendig, um die Grundfunktionen eines Gewebes aufrecht zu erhalten [106].

Nimotuzumab blockiert die Ligandenbindung aufgrund seiner geringeren Affinität schwächer und lässt im Vergleich zu Cetuximab und Panitumumab Rezeptoraktivierung in geringem Maße zu. Somit wäre durch die Wirkung von Nimotuzumab Tumorgewebe beeinträchtigt, gleichzeitig aber der basale Level an

EGF-R- Aktivierung für normales Gewebe, das es für seine Funktionen braucht, gegeben. Dies könnte ebenfalls zum günstigen Nebenwirkungsprofil von Nimotuzumab beitragen.

Anschließend wurde die Beeinflussung der Tumorzellviabilität durch die Antikörper untersucht. Die Ergebnisse zeigten, dass Nimotuzumab in höheren Konzentrationen das Wachstum von Tumorzellen nach Ligandenstimulierung signifikant reduzieren konnte. Dabei war die Inhibierung wesentlich stärker nach Aktivierung durch Epiregulin als nach Aktivierung durch EGF und TGF-alpha. Dies lässt sich damit erklären, dass Epiregulin eine geringere Affinität zum EGF-R besitzt als die übrigen Liganden [23]. Im Gegensatz zu Angaben in der Literatur blockierten Cetuximab und Panitumumab im Vergleich das Wachstum unabhängig vom Liganden auf ähnlichem Niveau effektiver als Nimotuzumab [107]. Auch diese Ergebnisse passen zu der bereits erwähnten Theorie der unterschiedlichen Beeinflussung der Rezeptorkonformation.

Ein Schwerpunkt dieser Arbeit war die Untersuchung der indirekten Wirkmechanismen EGF-R- gerichteter Antikörper. Dazu zählen ADCC (Antikörper-Abhängige zelluläre Zytotoxizität) und CDC (Komplement-abhängige Zytotoxizität). Als erstes Ergebnis konnte festgestellt werden, dass Nimotuzumab in der Lage war, ADCC sowohl gegen A431-Zellen als auch gegen A1207-Zellen zu induzieren. In der Literatur gibt es dazu bisher keine experimentellen Daten [104, 107]. Über Nimotuzumab liessen sich dabei zwei Populationen von Effektorzellen für den ADCC rekrutieren: PMN (Neutrophile Granulozyten) und MNC (Natürliche Killerzellen und Monozyten). Granulozyten sind ein Teil der angeborenen Immunabwehr und nehmen eine wichtige Rolle bei der Bekämpfung von bakteriellen Infektionen ein. Daneben gewinnen sie auch immer mehr Bedeutung bei der Bekämpfung von Tumoren [108-110]. So konnte in einer Studie das Überleben von Versuchstieren mit soliden Tumoren durch die Gabe von Granulozyten gesteigert werden [111]. Nimotuzumab aktivierte sowohl unstimulierte als auch signifikant mit GM-CSF (Granulozyten-Koloniestimulierenden-Faktor) stimulierte PMN. Im Vergleich dazu konnte aber gezeigt werden, dass Cetuximab und Panitumumab mit unstimulierten und stimulierten PMN deutlich effektiver ADCC induzierten. Als am wirksamsten erwies sich hier der humane IgG2 Antikörper Panitumumab, passend zu eigenen publizierten Daten [81].

MNC beinhalten als Effektorzellen hauptsächlich Monozyten und Natürliche Killerzellen. Es ist anerkannt, dass ADCC durch MNC einen wichtigen Effektormechanismus für EGF-R-gerichtete Antikörper darstellt [93, 113]. Auch durch Gabe von Nimotuzumab ließ sich signifikanter MNC-vermittelter ADCC von Tumorzellen erreichen. Hier erwies sich Nimotuzumab effektiver als Panitumumab, der passend zu seinem IgG2 Isotyp [81] nur zu geringen Lyseraten führte. Cetuximab erwies sich als am effektivsten. Die Ursache für die schwächere Aktivierung von PMN und MNC durch Nimotuzumab im Vergleich zu Cetuximab kann die bereits erwähnte geringere Affinität von Nimotuzumab zum EGF-R und damit geringere Opsonisierung der Tumorzellen sein. Laut Literatur sollen sich Nimotuzumab und Cetuximab bei der Bindung folgendermaßen unterscheiden: Cetuximab bindet hauptsächlich über die CDR 2 und 3 der schweren Kette sowie ferner über die CDR 1 der leichten Kette an die extrazelluläre Domäne III des Rezeptors. Die so in Kontakt kommenden Oberflächen des Antikörpers und Rezeptors sind größtenteils polar. Dies führt in der Summe zu der hohen Affinität von Cetuximab zum EGF-R [18]. Nimotuzumab bindet dagegen vor allem über die CDR 3 der schweren Kette an die Domäne III des EGF-R, über die anderen Regionen nur untergeordnet [68]. Diese Unterschiede in der Interaktion der Antikörper mit dem EGF-R könnten eine Erklärung für die verschiedenen Bindungsaffinitäten sein und eine Rolle bei der Induktion von ADCC spielen. Möglicherweise begünstigt auch die sehr stabile Konformation von Cetuximab bei der Bindung an den EGF-R eine effektivere Interaktion von Tumor- und Effektorzellen [18]. Nimotuzumab hingegen zeigt im Vergleich zu den anderen Antikörpern zwei Unterschiede im Aufbau in der variablen Region der schweren Ketten (CDR H1 und Trp H103) [68]. Es ist denkbar, dass diese Unterschiede in der Struktur die Stabilität der Bindung an den EGF-R und der Interaktion von Tumor- und Effektorzelle im ADCC beeinträchtigen. Ähnliche Beobachtungen konnten zwischen IgG1 und IgG3 Antikörpern gemacht werden, wobei der flexiblere Aufbau von IgG3 Antikörpern zu einer weniger effektiven ADCC-Vermittlung führte [114].

Interessante Ergebnisse ergab die Visualisierung des ADCC. Es zeigte sich, dass Cetuximab und Panitumumab, die effektiv ADCC mit PMN bewirkten, Zell-Zell-Verbindungen und große Zellcluster induzierten. Bei Nimotuzumab, der eher geringere Lyseraten im ADCC erbrachte, wurde dieses Phänomen kaum beobachtet. Die Zellen präsentierten sich in großen Aggregaten und waren fest untereinander

verbunden. Dieses „Clustering“ der Zellen könnte ebenfalls einen Einfluss darauf nehmen, ob ein Antikörper in der Lage ist, effektiv Zellen des Immunsystems gegen Tumorzellen zu richten oder nicht. In der Literatur findet man Belege, dass der EGF-R mit verschiedenen Proteinen interagiert, die für Zell-Zell-Kontakte wichtig sind. Dabei steht der EGF-R nicht nur strukturell, sondern auch funktionell in direkter Verbindung mit verschiedenen Integrinen [115]. So konnte bei A431-Zellen nachgewiesen werden, dass Zellkontakte durch Integrine ausgebildet wurden, wenn die Aktivierung des EGF-R durch Antikörper blockiert wurde [116]. Eine andere Untersuchung mit der Zelllinie MDA-MB-468 (humanes Mamakarzinom) zeigte, dass die Blockierung des EGF-R zu einer Aktivierung des E-Cadherin-Komplexes mit Vinculin and Actin und zu einer Aggregation der Zellen führte [117]. Der EGF-R spielt also eine wichtige Rolle bei der Regulierung von Zell-Zell Kontakten. Welchen Einfluss diese Effekte auf die Tumorzellbekämpfung mittels ADCC genau hat, müssen weiterführende Untersuchungen zeigen.

Die ADCC-Versuche ergaben zudem ein weiteres interessantes Ergebnis, das 2010 auch publiziert wurde [81]. Es konnte gezeigt werden, dass Panitumumab in der Lage war, ADCC zu induzieren. Dabei vermittelte Panitumumab sehr effektiv ADCC durch PMN, aber nur zu einem geringen Grad durch MNC. Bisher galt die Meinung, dass Panitumumab nicht in der Lage sei, ADCC zu vermitteln [96, 118]. Panitumumab war speziell als humaner IgG2 Antikörper konzipiert worden, um ausschließlich nicht-Fc-Teil-vermittelte Effekte auszulösen. Weitere Untersuchungen offenbarten, dass FcγRIIa der für den ADCC verantwortliche Fcγ-Rezeptor auf den PMN war. Die Interaktion zwischen Panitumumab und dem FcγRIIa wurde auch durch einen R/H Polymorphismus an der Position 131 des FcγRIIa beeinflusst. Panitumumab band effektiver an FcγRIIa-131H als an -131R. Dieser Unterschied war auch funktionell im ADCC wirksam; Effektorzellen von Spendern mit FcγRIIa-131H waren signifikant aktiver als die mit FcγRIIa-131R. Da über Percoll-Gradienten isolierte MNC als zytotoxische Effektorzellen hauptsächlich Monozyten und Natürlichen Killerzellen beinhalten und Monozyten im Gegensatz zu NK-Zellen ebenfalls den FcγRIIa exprimieren, wurden Monozyten und NK-Zellen weiter aufgereinigt und funktionell untersucht. Es zeigte sich, dass Panitumumab NK-Zellen kaum, Monozyten dagegen effektiv für ADCC rekrutieren konnte [81]. Diese Ergebnisse beweisen, dass neben IgG1 Antikörper auch humane IgG2

Antikörper in der Lage sind, ADCC zu vermitteln, was möglicherweise zur *in vivo* Wirksamkeit von Panitumumab beiträgt.

Ein weiteres Ziel dieser Arbeit war es, die Möglichkeit der Komplementaktivierung für die Tumorbekämpfung durch die IgG-Antikörper Nimotuzumab, Cetuximab, Panitumumab und Matuzumab zu untersuchen. Andere Studien zeigten, dass EGF-R gerichtete Antikörper nicht in der Lage sind, CDC zu induzieren [113, 119]. Auch bei uns war keiner der Antikörper einzeln in der Lage, Lyse von A431-Zellen oder A1207-Zellen durch das humane Komplementsystem zu induzieren. Andererseits ist belegt, dass Kombinationen von EGF-R-gerichteten IgG1-Antikörpern effektiv CDC von Tumorzellen aktivieren können [103]. Deshalb wurden in einem nächsten Schritt Doppelkombinationen der Antikörper betrachtet. Es ist beschrieben, dass Antikörper, die in Kombination effektiv CDC vermitteln, unterschiedliche Epitope des EGF-R erkennen [103]. Um diese Hypothese zu prüfen, wurde die Überlappung der Epitope von Nimotuzumab, Cetuximab, Panitumumab und Matuzumab mit der direkten Immunfluoreszenz untersucht. Die Ergebnisse dieser Kompetitions-Studien deuteten auf überlappende Epitope von Nimotuzumab, Cetuximab und Panitumumab hin, wohingegen Matuzumab nur ein mit Panitumumab überlappendes Epitop besitzt. Im Anschluss wurden die Kombinationen im CDC getestet. Die Ergebnisse zeigten, dass die Kombinationen aus Nimotuzumab und Matuzumab wie auch aus Cetuximab und Matuzumab sehr potent CDC von A431- und A1207-Zellen induzieren konnten. Zudem konnten kaum Unterschiede zwischen den Kombinationen festgestellt werden. Diese Ergebnisse bestätigte die bereits erwähnte Publikation (103). Nimotuzumab und Cetuximab blockierten beide nicht die Bindung von Matzumab an den EGF-R und bewirkten in Kombination mit Matuzumab sehr effektive Tumorzellyse. Andererseits inhibierten sich Cetuximab und Nimotuzumab gegenseitig in ihrer Bindung und vermittelten als Kombination keine CDC. Alle Kombinationen mit Panitumumab erzeugten keine Komplementaktivierung. Dies war zu erwarten, da Panitumumab als IgG2-Isotyp das Komplementsystem nicht aktivieren kann [114]. Weitere Untersuchungen ergaben, dass die Kombinationen aus Nimotuzumab/Matuzumab und Cetuximab/Matuzumab zu einer Fixierung von C1q und C4 führten und der klassische Weg des Komplementsystems zur Induzierung des CDC verantwortlich war. Es ist bekannt, dass etablierte Antikörper wie Rituximab und Campath das Komplementsystem für die Tumorkämpfung nutzen können [83]. Für Nimotuzumab

gibt es zwar Untersuchungen, die ihm die Fähigkeit zur Komplementaktivierung zusprechen [107]. Allerdings wurden diese Versuche mit tierischem Serum gegen humane Tumorzellen durchgeführt, was die Aussagekraft stark einschränkt, da die zelleigenen komplementregulierenden Oberflächenproteine wie CD55 und CD59 im heterologen System nicht funktionell sind.

Es konnte aber nun gezeigt werden, dass Nimotuzumab in Kombination mit Matuzumab die CDC Resistenz von soliden Tumoren überwinden kann. Dabei wurden die Versuche mit Tumorzellen durchgeführt, die in hohem Maße EGF-R exprimieren. Andere Studien zeigten, dass die Kombinationen von IgG1-Antikörpern gegen Zelllinien mit weniger EGF-R Expression kaum Lyse erzeugten [103]. Dies könnte die Nebenwirkungen durch die Aktivierung des Komplementsystems reduzieren, da die EGF-R Dichte auf normalem Gewebe geringer ist als auf Tumorzellen. Sowohl der Isotyp als auch das Epitop spielen daher eine entscheidende Rolle bei der Aktivierung des Komplementsystems durch Antikörper. Inwieweit dies für die Optimierung der Antikörpertherapie mit Nimotuzumab nutzbar ist, müssen weitere Studien zeigen.

Nimotuzumab befindet sich derzeit in 30 klinischen Studien weltweit, die 10 verschiedenen Tumortypen beinhalten [104]. Dabei liegt der Fokus hauptsächlich auf Plattenepithelkarzinomen des Kopf-Hals Bereiches (Head and neck squamous cell carcinoma, HNSCC) und Gliomen. Aufgrund vielversprechender Resultate ist Nimotuzumab u. a. in Brasilien, Indien, China und Argentinien für die Behandlung von Gliomen und Plattenepithelkarzinomen des Kopf- und Halsbereiches bereits zugelassen [88, 89].

In einer Phase II-Studie wurden 46 Gliompatienten (Kinder und Erwachsene) mit Nimotuzumab behandelt. Dabei zeigte sich ein klinischer Nutzen bei 14 der 46 Probanden [120]. In einer Folgestudie wurde die Kombination aus Nimotuzumab und Radiotherapie bei 21 Patienten mit Gliomen untersucht. Dabei zeigten sich bei 17% ein komplettes und bei 22% ein partielles Ansprechen. Die mittlere Überlebenserwartung lag bei 22 Monaten [89]. In einer weiteren Studie mit 22 HNSCC-Patienten wurde bei 16 Patienten ein dosisabhängiges Ansprechen beobachtet, von denen 9 eine komplette Tumorremission zeigten [88]. Nimotuzumab besitzt zudem ein günstiges Nebenwirkungsprofil. Bei der Kombination von Nimotuzumab und Radiotherapie treten toxische Hautreaktionen bei unter 10 % aller

Patienten auf, davon <1 % der Patienten Grad III oder IV. Cetuximab und Radiatio oder Panitumumab und Radiatio verursachen dagegen bei bis zu 90 % der Patienten toxische Hautreaktionen, davon 25 bis 60 % Grad III oder IV [91-93]. Im Rahmen dieser Arbeit zeigte die Charakterisierung, dass Nimotuzumab Ligandenbindung und Rezeptoraktivierung blockierte, das Zellwachstum inhibierte und antikörperabhängige zelluläre Zytotoxizität (ADCC) induzierte. Diese Ergebnisse können die Wirksamkeit von Nimotuzumab bei der Tumorbekämpfung bestätigen, die klinisch in den bereits erwähnten Studien gesehen wird. Sie zeigen aber auch, dass Nimotuzumab im Vergleich zu Cetuximab und Panitumumab weniger effektive Wirkmechanismen besitzt. Vergleichende klinische Studien mit Cetuximab und Panitumumab fehlen, wären aber eine sinnvolle Ergänzung. Für das bereits beschriebene günstige Nebenwirkungsprofil von Nimotuzumab könnte es verschiedene Gründe geben. Die geringere Bindungsaffinität im Vergleich zu anderen Antikörpern spielt offensichtlich eine Rolle. Dass Nimotuzumab eher an Gewebe mit sehr hoher EGF-R-Dichte bindet und daher weniger Nebenwirkungen verursachen könnte, liess sich nicht bestätigen. Außerdem könnte auch die im Vergleich zu Cetuximab und Panitumumab weniger effektive Aktivierung des Immunsystems eine weitere Erklärung darstellen. Zudem scheint die partielle Störung der Ligandenbindung von Bedeutung zu sein [68]. Ein direkter Vergleich von Nimotuzumab mit Cetuximab oder Panitumumab in klinischen Studien wäre interessant, um diese Antikörper hinsichtlich ihres Nebenwirkungsprofils miteinander im selben Patientenkollektiv verlässlich vergleichen zu können.

5. Ausblick

Wenn sich die Wirksamkeit von Nimotuzumab auch in großen Studien in Vergleich zu anderen Antikörpern beweisen sollte, könnte er mit seinem günstigen Nebenwirkungsprofil eine interessante Therapieoption darstellen. Zukünftige Untersuchungen müssen noch klären, inwieweit Nimotuzumab in Kombination mit mit TKIs wirkt, welche Auswirkung Mutationen des EGF-R wie die K-Ras Mutation auf die Wirksamkeit des Antikörpers haben, wie der Antikörper durch Polymorphismen von Rezeptoren des Immunsystems beeinflusst wird und welche Rolle weitere Zellmarker wie Zelladhesionsmoleküle spielen. All dies könnte genutzt werden, um die Therapie mit Nimotuzumab bestimmten Tumorgen- und phänotypen zuzuordnen und so einen weiteren Schritt in Richtung individualisierte Tumorthherapie zum Nutzen des Patienten zu beschreiten.

6. Zusammenfassung

Die Therapie solider Tumoren stellt einen wichtigen medizinischen Forschungsbereich dar. Um die Wirksamkeit der Therapien zu steigern und Nebenwirkungen zu reduzieren, werden immer spezifischere Behandlungsansätze wie die Antikörpertherapie entwickelt. Als eine geeignete Zielstruktur erwies sich dabei der epidermale Wachstumsfaktorrezeptor (Epidermal growth factor receptor; EGF-R), der eine wichtige Rolle bei der Regulation von Wachstum und Differenzierung von Zellen spielt. Störungen in diesem System können zum Entstehen und Wachstum von Tumoren führen. Die EGF-R-spezifischen Antikörper Cetuximab (Erbix[®]) und Panitumumab (Vectibix[®]) finden bereits klinische Anwendung. Nimotuzumab (Theraloc[®]), ein humanisierter IgG1-Antikörper, bewies in verschiedenen klinischen Studien ebenfalls seine Wirksamkeit, besonders bei der Behandlung von Gliomen und Plattenepithelkarzinomen des Kopf- und Halsbereiches. Darüber hinaus stach sein günstiges Nebenwirkungsprofil heraus. In dieser Arbeit sollten die Wirkmechanismen von Nimotuzumab im Vergleich zu den etablierten Antikörpern Cetuximab und Panitumumab herausgearbeitet werden, um im Anschluss der Frage nachzugehen, ob diese Erkenntnisse eine Erklärung für das Nebenwirkungsprofil liefern.

Die Ergebnisse der Arbeit zeigten, dass Nimotuzumab spezifisch an den EGF-R band, wobei Cetuximab und Panitumumab höhere Bindungsaffinitäten aufwiesen. Die Rezeptordichte auf den Tumorzellen beeinflusste dabei die Bindungseigenschaften der Antikörper nicht, was im Widerspruch zu einer publizierten Studie steht, wonach Nimotuzumab bei hoher EGF-R Dichte eine ähnlich hohe Affinität wie Cetuximab und somit eine relative Tumorspezifität besitzen soll [104]. Die geringere Bindungsaffinität könnte allerdings ein Grund für das günstigere Nebenwirkungsprofil sein, da Nimotuzumab so auch weniger stark an EGF-R exprimierende Zellen wie z.B. auch normale Epithelzellen bindet.

Im nächsten Schritt wurden die direkten Wirkmechanismen der Antikörper untersucht. Nimotuzumab bewirkte eine partielle Verdrängung verschiedener Liganden wie EGF oder TGF- α vom Rezeptor und damit einhergehend eine Verminderung der Rezeptoraktivierung. Es konnte gezeigt werden, dass die wichtigen Signaltransduktionswege des Rezeptors über MAPK, PI3K und PLC γ 1 in Tumorzellen durch Nimotuzumab gehemmt werden. Nimotuzumab blockierte die Ligandenbindung im Vergleich zu Cetuximab und Panitumumab aufgrund seiner

geringeren Affinität schwächer und könnte auf diese Weise Rezeptoraktivierung in geringem Maße zulassen. Somit wäre durch die Wirkung von Nimotuzumab im Tumorgewebe beeinträchtigt, gleichzeitig aber der basale Level an EGF-R-Aktivierung für normales Gewebe, den es für seine Funktionen braucht, gegeben [106]. Dies könnte ebenfalls zum günstigen Nebenwirkungsprofil von Nimotuzumab beitragen. Abschließend ließ sich auf Basis dieser Erkenntnisse eine signifikante Reduktion von Tumorzellwachstum *in vitro* durch Nimotuzumab erreichen. Ein weiterer zentraler Punkt dieser Arbeit war die Untersuchung der Fähigkeit, Zellen des Immunsystems zu rekrutieren und ADCC (antikörper-abhängige zelluläre Zytotoxizität) zu vermitteln. Es zeigte sich, dass Nimotuzumab sowohl in der Lage war, ADCC über neutrophile Granulozyten als auch monomorphonukleäre Zellen zu induzieren, wozu es bisher keine experimentellen Daten in der Literatur gibt [104, 107]. Cetuximab war aber auch in diesem Punkt effektiver als Nimotuzumab. Interessanterweise konnte als Teil dieser Arbeit erstmals gezeigt werden, dass sich über Panitumumab myeloische Effektorzellen effektiv zum ADCC von Tumorzellen aktivieren ließen. In der Literatur galt bisher, dass Panitumumab nicht in der Lage sei, ADCC zu vermitteln [127, 147]. Diese ADCC-Ergebnisse führten zu einer Koautorenschaft einer Publikation [81]. Weiter wurde die Möglichkeit der Komplementaktivierung durch Nimotuzumab untersucht, wobei keiner der EGF-R-Antikörper einzeln in der Lage war, komplementabhängige Lyse von Tumorzellen zu induzieren [103]. Dagegen erwies sich die Kombination aus Nimotuzumab/Matuzumab als sehr effektiv und bewirkte Lysen bis zu 100 %.

Zusammenfassend lässt sich durch die Ergebnisse dieser Arbeit sagen, dass Nimotuzumab durchaus potente Wirkmechanismen zur Tumorzellbekämpfung zuzuschreiben sind, diese aber im Vergleich zu bereits etablierten Antikörpern wie Cetuximab und Panitumumab zum Teil schwächer ausfallen. Wenn sich die Wirksamkeit von Nimotuzumab auch in großen Studien in Vergleich zu anderen Antikörpern beweisen sollte, könnte er mit seinem günstigen Nebenwirkungsprofil eine interessante Therapieoption darstellen. Zukünftige Untersuchungen müssen klären, inwieweit Nimotuzumab in Kombination mit Chemotherapeutika wirkt, welche Auswirkung Mutationen des EGF-R auf die Wirksamkeit des Antikörpers haben und wie der Antikörper durch Polymorphismen von Rezeptoren des Immunsystems beeinflusst wird, um so einen weiteren Schritt in Richtung spezifische Tumorthherapie zu gehen.

6. Referenzen

1. Zwick, E., J. Bange, and A. Ullrich, *Receptor tyrosine kinases as targets for anticancer drugs*. Trends Mol Med, 2002. **8**(1): p. 17-23.
2. van der Geer, P., T. Hunter, and R.A. Lindberg, *Receptor protein-tyrosine kinases and their signal transduction pathways*. Annu Rev Cell Biol, 1994. **10**: p. 251-337.
3. Schlessinger, J., *Ligand-induced, receptor-mediated dimerization and activation of EGF receptor*. Cell, 2002. **110**(6): p. 669-72.
4. Hynes, N.E. and H.A. Lane, *ERBB receptors and cancer: the complexity of targeted inhibitors*. Nat Rev Cancer, 2005. **5**(5): p. 341-54.
5. Downward, J., et al., *Close similarity of epidermal growth factor receptor and v-erb-B oncogene protein sequences*. Nature, 1984. **307**(5951): p. 521-7.
6. Yamamoto, T., et al., *A new avian erythroblastosis virus, AEV-H, carries erbB gene responsible for the induction of both erythroblastosis and sarcomas*. Cell, 1983. **34**(1): p. 225-32.
7. Cohen, S., *Isolation of a mouse submaxillary gland protein accelerating incisor eruption and eyelid opening in the new-born animal*. J Biol Chem, 1962. **237**: p. 1555-62.
8. Carpenter, G. and S. Cohen, *Epidermal growth factor*. Annu Rev Biochem, 1979. **48**: p. 193-216.
9. Ward, C.W., P.A. Hoyne, and R.H. Flegg, *Insulin and epidermal growth factor receptors contain the cysteine repeat motif found in the tumor necrosis factor receptor*. Proteins, 1995. **22**(2): p. 141-53.
10. Aifa, S., et al., *A basic peptide within the juxtamembrane region is required for EGF receptor dimerization*. Exp Cell Res, 2005. **302**(1): p. 108-14.
11. Thiel, K.W. and G. Carpenter, *Epidermal growth factor receptor juxtamembrane region regulates allosteric tyrosine kinase activation*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2007. **104**(49): p. 19238-43.
12. Ogiso, H., et al., *Crystal structure of the complex of human epidermal growth factor and receptor extracellular domains*. Cell, 2002. **110**(6): p. 775-87.
13. Shilo, B.Z., *Signaling by the Drosophila epidermal growth factor receptor pathway during development*. Exp Cell Res, 2003. **284**(1): p. 140-9.

14. Walker, F., et al., *CR1/CR2 interactions modulate the functions of the cell surface epidermal growth factor receptor*. J Biol Chem, 2004. **279**(21): p. 22387-98.
15. Sato, K., et al., *Solution structure of epiregulin and the effect of its C-terminal domain for receptor binding affinity*. FEBS Lett, 2003. **553**(3): p. 232-8.
16. Dawson, J.P., et al., *Epidermal growth factor receptor dimerization and activation require ligand-induced conformational changes in the dimer interface*. Mol Cell Biol, 2005. **25**(17): p. 7734-42.
17. Peipp, M., M. Dechant, and T. Valerius, *Effector mechanisms of therapeutic antibodies against ErbB receptors*. Curr Opin Immunol, 2008. **20**(4): p. 436-43.
18. Li, S., et al., *Structural basis for inhibition of the epidermal growth factor receptor by cetuximab*. Cancer Cell, 2005. **7**(4): p. 301-11.
19. Jorissen, R.N., et al., *Epidermal growth factor receptor: mechanisms of activation and signalling*. Exp Cell Res, 2003. **284**(1): p. 31-53.
20. Chardin, P., et al., *The Grb2 adaptor*. FEBS Lett, 1995. **369**(1): p. 47-51.
21. Rozakis-Adcock, M., et al., *The SH2 and SH3 domains of mammalian Grb2 couple the EGF receptor to the Ras activator mSos1*. Nature, 1993. **363**(6424): p. 83-5.
22. Schlessinger, J., *Common and distinct elements in cellular signaling via EGF and FGF receptors*. Science, 2004. **306**(5701): p. 1506-7.
23. Tsui, I.F., et al., *Multiple pathways in the FGF signaling network are frequently deregulated by gene amplification in oral dysplasias*. Int J Cancer, 2009. **125**(9): p. 2219-28.
24. Marmor, M.D., K.B. Skaria, and Y. Yarden, *Signal transduction and oncogenesis by ErbB/HER receptors*. Int J Radiat Oncol Biol Phys, 2004. **58**(3): p. 903-13.
25. Rommel, C., et al., *Differentiation stage-specific inhibition of the Raf-MEK-ERK pathway by Akt*. Science, 1999. **286**(5445): p. 1738-41.
26. Henson, E.S. and S.B. Gibson, *Surviving cell death through epidermal growth factor (EGF) signal transduction pathways: implications for cancer therapy*. Cell Signal, 2006. **18**(12): p. 2089-97.
27. Quest, A.F., et al., *DAG second messengers: molecular switches and growth control*. Adv Exp Med Biol, 1997. **400A**: p. 297-303.

28. Yi, K.S., et al., *Inhibition of the EGF-induced activation of phospholipase C-gamma1 by a single chain antibody fragment*. *Oncogene*, 2001. **20**(55): p. 7954-64.
29. Waterman, H., et al., *A mutant EGF-receptor defective in ubiquitylation and endocytosis unveils a role for Grb2 in negative signaling*. *Embo J*, 2002. **21**(3): p. 303-13.
30. Kisseleva, T., et al., *Signaling through the JAK/STAT pathway, recent advances and future challenges*. *Gene*, 2002. **285**(1-2): p. 1-24.
31. Samaga, R., et al., *The logic of EGF-R/ErbB signaling: theoretical properties and analysis of high-throughput data*. *PLoS Comput Biol*, 2009. **5**(8): p. e1000438.
32. Quesnelle, K.M., A.L. Boehm, and J.R. Grandis, *STAT-mediated EGF-R signaling in cancer*. *J Cell Biochem*, 2007. **102**(2): p. 311-9.
33. Biscardi, J.S., et al., *c-Src-mediated phosphorylation of the epidermal growth factor receptor on Tyr845 and Tyr1101 is associated with modulation of receptor function*. *J Biol Chem*, 1999. **274**(12): p. 8335-43.
34. Holbro, T., G. Civenni, and N.E. Hynes, *The ErbB receptors and their role in cancer progression*. *Exp Cell Res*, 2003. **284**(1): p. 99-110.
35. Yarden, Y. and M.X. Sliwkowski, *Untangling the ErbB signalling network*. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2001. **2**(2): p. 127-37.
36. Olayioye, M.A., et al., *The ErbB signaling network: receptor heterodimerization in development and cancer*. *Embo J*, 2000. **19**(13): p. 3159-67.
37. Miettinen, P.J., et al., *Epithelial immaturity and multiorgan failure in mice lacking epidermal growth factor receptor*. *Nature*, 1995. **376**(6538): p. 337-41.
38. Lee, K.F., et al., *Requirement for neuregulin receptor erbB2 in neural and cardiac development*. *Nature*, 1995. **378**(6555): p. 394-8.
39. Arteaga, C.L., *Epidermal growth factor receptor dependence in human tumors: more than just expression?* *Oncologist*, 2002. **7 Suppl 4**: p. 31-9.
40. Citri, A. and Y. Yarden, *EGF-ERBB signalling: towards the systems level*. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2006. **7**(7): p. 505-16.
41. Nagane, M., et al., *Aberrant receptor signaling in human malignant gliomas: mechanisms and therapeutic implications*. *Cancer Lett*, 2001. **162 Suppl**: p. S17-S21.

42. Normanno, N., et al., *Target-based agents against ErbB receptors and their ligands: a novel approach to cancer treatment*. *Endocr Relat Cancer*, 2003. **10**(1): p. 1-21.
43. Herbst, R.S. and D.M. Shin, *Monoclonal antibodies to target epidermal growth factor receptor-positive tumors: a new paradigm for cancer therapy*. *Cancer*, 2002. **94**(5): p. 1593-611.
44. Ferrara, N., *Role of vascular endothelial growth factor in the regulation of angiogenesis*. *Kidney Int*, 1999. **56**(3): p. 794-814.
45. Frederick, L., et al., *Diversity and frequency of epidermal growth factor receptor mutations in human glioblastomas*. *Cancer Res*, 2000. **60**(5): p. 1383-7.
46. Laskin, J.J. and A.B. Sandler, *Epidermal growth factor receptor: a promising target in solid tumours*. *Cancer Treat Rev*, 2004. **30**(1): p. 1-17.
47. Tang, C.K., et al., *Epidermal growth factor receptor vIII enhances tumorigenicity in human breast cancer*. *Cancer Res*, 2000. **60**(11): p. 3081-7.
48. Schlaeth, M., et al., *Fc-engineered EGF-R antibodies mediate improved antibody-dependent cellular cytotoxicity (ADCC) against KRAS-mutated tumor cells*. *Cancer Sci*, 2010. **101**(5): p. 1080-8.
49. Schubbert, S., K. Shannon, and G. Bollag, *Hyperactive Ras in developmental disorders and cancer*. *Nat Rev Cancer*, 2007. **7**(4): p. 295-308.
50. De Miguel, P., et al., *Immunohistochemical comparative analysis of transforming growth factor alpha, epidermal growth factor, and epidermal growth factor receptor in normal, hyperplastic and neoplastic human prostates*. *Cytokine*, 1999. **11**(9): p. 722-7.
51. Brandt, R., et al., *Mammary gland specific hEGF receptor transgene expression induces neoplasia and inhibits differentiation*. *Oncogene*, 2000. **19**(17): p. 2129-37.
52. Matsui, Y., et al., *Development of mammary hyperplasia and neoplasia in MMTV-TGF alpha transgenic mice*. *Cell*, 1990. **61**(6): p. 1147-55.
53. Tsutsui, S., et al., *Prognostic value of the combination of epidermal growth factor receptor and c-erbB-2 in breast cancer*. *Surgery*, 2003. **133**(2): p. 219-21.
54. Salomon, D.S., et al., *Epidermal growth factor-related peptides and their receptors in human malignancies*. *Crit Rev Oncol Hematol*, 1995. **19**(3): p. 183-232.

55. Rocha-Lima, C.M., et al., *EGF-R targeting of solid tumors*. Cancer Control, 2007. **14**(3): p. 295-304.
56. Kumar, A., et al., *Structure and clinical relevance of the epidermal growth factor receptor in human cancer*. J Clin Oncol, 2008. **26**(10): p. 1742-51.
57. Mamot, C., et al., *Epidermal growth factor receptor (EGF-R)-targeted immunoliposomes mediate specific and efficient drug delivery to EGF-R- and EGF-RvIII-overexpressing tumor cells*. Cancer Res, 2003. **63**(12): p. 3154-61.
58. Azemar, M., et al., *Regression of cutaneous tumor lesions in patients intratumorally injected with a recombinant single-chain antibody-toxin targeted to ErbB2/HER2*. Breast Cancer Res Treat, 2003. **82**(3): p. 155-64.
59. Ciardiello, F., et al., *Antisense oligonucleotides targeting the epidermal growth factor receptor inhibit proliferation, induce apoptosis, and cooperate with cytotoxic drugs in human cancer cell lines*. Int J Cancer, 2001. **93**(2): p. 172-8.
60. Ciardiello, F. and G. Tortora, *EGF-R antagonists in cancer treatment*. N Engl J Med, 2008. **358**(11): p. 1160-74.
61. Rivera, F., et al., *Current situation of Panitumumab, Matuzumab, Nimotuzumab and Zalutumumab*. Acta Oncol, 2008. **47**(1): p. 9-19.
62. Kohler, G. and C. Milstein, *Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity*. Nature, 1975. **256**(5517): p. 495-7.
63. Green, L.L., et al., *Antigen-specific human monoclonal antibodies from mice engineered with human Ig heavy and light chain YACs*. Nat Genet, 1994. **7**(1): p. 13-21.
64. Carter, P., *Improving the efficacy of antibody-based cancer therapies*. Nat Rev Cancer, 2001. **1**(2): p. 118-29.
65. Imai, K. and A. Takaoka, *Comparing antibody and small-molecule therapies for cancer*. Nat Rev Cancer, 2006. **6**(9): p. 714-27.
66. Nimmerjahn, F. and J.V. Ravetch, *Fcγ receptors as regulators of immune responses*. Nat Rev Immunol, 2008. **8**(1): p. 34-47.
67. Carter, P.J., *Potent antibody therapeutics by design*. Nat Rev Immunol, 2006. **6**(5): p. 343-57.
68. Talavera, A., et al., *Nimotuzumab, an antitumor antibody that targets the epidermal growth factor receptor, blocks ligand binding while permitting the active receptor conformation*. Cancer Res, 2009. **69**(14): p. 5851-9.

69. Lammerts van Bueren, J.J., et al., *Effect of target dynamics on pharmacokinetics of a novel therapeutic antibody against the epidermal growth factor receptor: implications for the mechanisms of action*. *Cancer Res*, 2006. **66**(15): p. 7630-8.
70. Mendelsohn, J. and J. Baselga, *Epidermal growth factor receptor targeting in cancer*. *Semin Oncol*, 2006. **33**(4): p. 369-85.
71. Yoshida, T., et al., *Matuzumab and cetuximab activate the epidermal growth factor receptor but fail to trigger downstream signaling by Akt or Erk*. *Int J Cancer*, 2008. **122**(7): p. 1530-8.
72. Sorokin, A. and L.K. Goh, *Endocytosis and intracellular trafficking of ErbBs*. *Exp Cell Res*, 2008. **314**(17): p. 3093-106.
73. Gong, Y., et al., *Induction of BIM is essential for apoptosis triggered by EGF-R kinase inhibitors in mutant EGF-R-dependent lung adenocarcinomas*. *PLoS Med*, 2007. **4**(10): p. e294.
74. Kurai, J., et al., *Antibody-dependent cellular cytotoxicity mediated by cetuximab against lung cancer cell lines*. *Clin Cancer Res*, 2007. **13**(5): p. 1552-61.
75. van de Winkel, J.G., *Fc receptors: role in biology and antibody therapy*. *Immunol Lett*, 2010. **128**(1): p. 4-5.
76. Rascu, A., et al., *Clinical relevance of Fc gamma receptor polymorphisms*. *Ann N Y Acad Sci*, 1997. **815**: p. 282-95.
77. Iannello, A. and A. Ahmad, *Role of antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity in the efficacy of therapeutic anti-cancer monoclonal antibodies*. *Cancer Metastasis Rev*, 2005. **24**(4): p. 487-99.
78. Babior, B.M., *NADPH oxidase*. *Curr Opin Immunol*, 2004. **16**(1): p. 42-7.
79. Borregaard, N. and J.B. Cowland, *Granules of the human neutrophilic polymorphonuclear leukocyte*. *Blood*, 1997. **89**(10): p. 3503-21.
80. Cullen, S.P. and S.J. Martin, *Mechanisms of granule-dependent killing*. *Cell Death Differ*, 2008. **15**(2): p. 251-62.
81. Schneider-Merck, T., et al., *Human IgG2 antibodies against epidermal growth factor receptor effectively trigger antibody-dependent cellular cytotoxicity but, in contrast to IgG1, only by cells of myeloid lineage*. *J Immunol*, 2010. **184**(1): p. 512-20.

82. Zhang, W., et al., *FCGR2A and FCGR3A polymorphisms associated with clinical outcome of epidermal growth factor receptor expressing metastatic colorectal cancer patients treated with single-agent cetuximab*. J Clin Oncol, 2007. **25**(24): p. 3712-8.
83. Gelderman, K.A., et al., *Complement function in mAb-mediated cancer immunotherapy*. Trends Immunol, 2004. **25**(3): p. 158-64.
84. Perez-Soler, R. and L. Saltz, *Cutaneous adverse effects with HER1/EGF-R-targeted agents: is there a silver lining?* J Clin Oncol, 2005. **23**(22): p. 5235-46.
85. Baselga, J., *The EGF-R as a target for anticancer therapy--focus on cetuximab*. Eur J Cancer, 2001. **37 Suppl 4**: p. S16-22.
86. Baselga, J., et al., *Phase I studies of anti-epidermal growth factor receptor chimeric antibody C225 alone and in combination with cisplatin*. J Clin Oncol, 2000. **18**(4): p. 904-14.
87. Mateo, C., et al., *Humanization of a mouse monoclonal antibody that blocks the epidermal growth factor receptor: recovery of antagonistic activity*. Immunotechnology, 1997. **3**(1): p. 71-81.
88. Crombet, T., et al., *Use of the humanized anti-epidermal growth factor receptor monoclonal antibody h-R3 in combination with radiotherapy in the treatment of locally advanced head and neck cancer patients*. J Clin Oncol, 2004. **22**(9): p. 1646-54.
89. Ramos, T.C., et al., *Treatment of high-grade glioma patients with the humanized anti-epidermal growth factor receptor (EGF-R) antibody h-R3: report from a phase I/II trial*. Cancer Biol Ther, 2006. **5**(4): p. 375-9.
90. Bayes, M., X. Rabasseda, and J.R. Prous, *Gateways to clinical trials*. Methods Find Exp Clin Pharmacol, 2007. **29**(10): p. 697-735.
91. Allan, D.G., *Nimotuzumab: evidence of clinical benefit without rash*. Oncologist, 2005. **10**(9): p. 760-1.
92. Lenz, H.J., *Anti-EGF-R mechanism of action: antitumor effect and underlying cause of adverse events*. Oncology (Williston Park), 2006. **20**(5 Suppl 2): p. 5-13.
93. http://www.ymbiosciences.com/products/nimotuzumab/safety_profile.php. 2009
94. Gill, G.N., et al., *Monoclonal anti-epidermal growth factor receptor antibodies which are inhibitors of epidermal growth factor binding and antagonists of*

- epidermal growth factor binding and antagonists of epidermal growth factor-stimulated tyrosine protein kinase activity.* J Biol Chem, 1984. **259**(12): p. 7755-60.
95. Agency, E.M., *European Public Assessment Report: Erbitux.* 2009.
 96. Goldstein, N.I., et al., *Biological efficacy of a chimeric antibody to the epidermal growth factor receptor in a human tumor xenograft model.* Clin Cancer Res, 1995. **1**(11): p. 1311-8.
 97. Pirker, R., *Cetuximab: potential role as first-line treatment for advanced non-small cell lung cancer.* Clin Adv Hematol Oncol, 2008. **6**(10): p. 735-6.
 98. Yang, X.D., et al., *Development of ABX-EGF, a fully human anti-EGF receptor monoclonal antibody, for cancer therapy.* Crit Rev Oncol Hematol, 2001. **38**(1): p. 17-23.
 99. Wu, M., A. Rivkin, and T. Pham, *Panitumumab: human monoclonal antibody against epidermal growth factor receptors for the treatment of metastatic colorectal cancer.* Clin Ther, 2008. **30**(1): p. 14-30.
 100. Agency, E.M., *European Public Assessment Report: Vectibix.* 2009.
 101. Peipp, M., et al., *Antibody fucosylation differentially impacts cytotoxicity mediated by NK and PMN effector cells.* Blood, 2008. **112**(6): p. 2390-9.
 102. Raffael, A., *Grundlagen der analytischen Durchflußzytometrie.* Labor Medizin. 1988. 89-97.
 103. Dechant, M., et al., *Complement-dependent tumor cell lysis triggered by combinations of epidermal growth factor receptor antibodies.* Cancer Res, 2008. **68**(13): p. 4998-5003.
 104. Boland, W.K. and G. Bebb, *Nimotuzumab: a novel anti-EGF-R monoclonal antibody that retains anti-EGF-R activity while minimizing skin toxicity.* Expert Opin Biol Ther, 2009. **9**(9): p. 1199-206.
 105. Schmiedel, J., et al., *Matuzumab binding to EGF-R prevents the conformational rearrangement required for dimerization.* Cancer Cell, 2008. **13**(4): p. 365-73.
 106. Keese, M., et al., *Imaging epidermal growth factor receptor phosphorylation in human colorectal cancer cells and human tissues.* J Biol Chem, 2005. **280**(30): p. 27826-31.

107. Diaz Miqueli, A., et al., *Biological activity in vitro of anti-epidermal growth factor receptor monoclonal antibodies with different affinities*. Hybridoma (Larchmt), 2007. **26**(6): p. 423-31.
108. van Egmond, M., *Neutrophils in antibody-based immunotherapy of cancer*. Expert Opin Biol Ther, 2008. **8**(1): p. 83-94.
109. Clark, A.J., et al., *Calicum microdomains form within neutrophils at the neutrophil-tumor cell synapse: role in antibody-dependent target cell apoptosis*. Cancer Immunol Immunother, 2010. **59**(1): p. 149-59.
110. Di Carlo, A., et al., *Evaluation of epidermal growth factor receptor, carcinoembryonic antigen and Lewis carbohydrate antigens in human colorectal and liver neoplasias*. Oncol Rep, 2001. **8**(2): p. 387-92.
111. Jaganjac, M., et al., *Granulocytes as effective anticancer agent in experimental solid tumor models*. Immunobiology, 2010. **215**(12): p. 1015-20.
112. Wallace, P.K., A.L. Howell, and M.W. Fanger, *Role of Fc gamma receptors in cancer and infectious disease*. J Leukoc Biol, 1994. **55**(6): p. 816-26.
113. Bleeker, W.K., et al., *Dual mode of action of a human anti-epidermal growth factor receptor monoclonal antibody for cancer therapy*. J Immunol, 2004. **173**(7): p. 4699-707.
114. Bruggemann, M., et al., *Comparison of the effector functions of human immunoglobulins using a matched set of chimeric antibodies*. J Exp Med, 1987. **166**(5): p. 1351-61.
115. Yu, X., S. Miyamoto, and E. Mekada, *Integrin alpha 2 beta 1-dependent EGF receptor activation at cell-cell contact sites*. J Cell Sci, 2000. **113** (Pt 12): p. 2139-47.
116. Genersch, E., D. Schuppan, and R.B. Lichtner, *Signaling by epidermal growth factor differentially affects integrin-mediated adhesion of tumor cells to extracellular matrix proteins*. J Mol Med, 1996. **74**(10): p. 609-16.
117. Hazan, R.B. and L. Norton, *The epidermal growth factor receptor modulates the interaction of E-cadherin with the actin cytoskeleton*. J Biol Chem, 1998. **273**(15): p. 9078-84.
118. Jakobovits, A., et al., *From Xenomouse technology to panitumumab, the first fully human antibody product from transgenic mice*. Nat Biotechnol, 2007. **25**(10): p. 1134-43.

119. Kimura, H., et al., *Antibody-dependent cellular cytotoxicity of cetuximab against tumor cells with wild-type or mutant epidermal growth factor receptor*. *Cancer Sci*, 2007. **98**(8): p. 1275-80.
120. Massimino, M., et al., *Nimotuzumab for pediatric diffuse intrinsic pontine gliomas*. *Expert Opin Biol Ther*, 2011.11(2):247-56
121. Garrido, G., et al., *Bivalent binding by intermediate affinity of nimotuzumab: a contribution to explain antibody clinical profile*. *Cancer Biol Ther*, 2011 15. 11(4): p. 373-82.

7. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Aufbau des EGF-R	2
Abbildung 2: Dimerisierung des EGF-R.....	4
Abbildung 3: Intrazelluläre Signaltransduktion.....	6
Abbildung 4: Struktureller Aufbau des Immunglobulins IgG.....	11
Abbildung 5: Wirkmechanismen monoklonaler Antikörper.....	14
Abbildung 6: Darstellung des Percoll-Gradienten.....	26
Abbildung 7: Quantitative EGF-R Expression.....	30
Abbildung 8: Nimotuzumab bindet spezifisch an EGF-R exprimierenden Zellen.....	31
Abbildung 9: Nimotuzumab blockiert die Bindung von Liganden an den EGF-R.....	33
Abbildung 10: Inhibition der EGF-R Phosphorylierung durch Nimotuzumab.....	35
Abbildung 11: Nimotuzumab beeinträchtigt das Zellwachstum.....	37
Abbildung 12: Antikörper-abhängige Zelluläre Zytotoxizität (ADCC)	41
Abbildung 13: Fluoreszenzfärbung und Darstellung des ADCC.....	43
Abbildung 14: Nimotuzumab kann CDC vermitteln.....	46

8. Anhang

8.1 Zellen

Zelllinie	Ursprung	Herkunft
A431	Humanes epidermoidales Karzinom	DSMZ (Dt. Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Braunschweig, Deutschland)
A1207	Glioblastom	Etabliert von Dr. Aaronson, National Cancer Institute, NIH, Bethesda, MD
BaF3	Murines Pro-B-Lymphom	DSMZ
BaF3 transfiziert mit EGF-R	Murines Pro-B-Lymphom	DSMZ; Peipp, 2008
BaF3 transfiziert mit EGF-R vIII	Murines Pro-B-Lymphom	DSMZ; Peipp, 2008

8.2 Kulturmedien

Kulturmedium	Basismedium	Zusätze
R10 ⁺ für A431-Zellen	RPMI 1640 (2 g/l Glukose), 500 ml	+ 10 % (v/v) fötales Kälberserum (FCS [50 ml]) + 1 % (v/v) Penicillin/Streptomycin (Pen/Strep) [5 ml]
D10 ⁺ für A1207-Zellen	DMEM (4 g/l Glukose), 500 ml	+ 10 % (v/v) FCS [50 ml] + 1 % (v/v) Pen/Strep [5 ml]
R10 ⁺ für transfizierte BaF3-Zellen	RPMI 1640 (2 g/l Glukose), 500 ml	+ 10 % (v/v) FCS [50 ml] + 1 % (v/v) Pen/Strep [5 ml] + 10 % (v/v) WEHI-3SB-SUP (50 ml) [1 mL] + 1 mg/mL G418 (Geneticin, 50 mg/mL) [200 µL]

8.3 Antikörper

Antikörper	Beschreibung/Antigen	Herkunft
Cetuximab (Erbitux®, C225)	Humaner EGF-R (humanes IgG1)	Merck, Darmstadt, Deutschland
Cetuximab, murin (m225)	Humaner EGF-R (chimäres IgG1)	Merck, Darmstadt, Deutschland
HuMab-KLH	Keyhole Limpet Hemocyanin (humanes IgG1)	Genmab, Utrecht, Niederlande
Matuzumab, human (h425)	Humaner EGF-R (humanes IgG1)	Merck, Darmstadt, Deutschland
m425	Humaner EGF-R (murines IgG1)	Merck, Darmstadt, Deutschland
Anti-β-Actin Antibody (clone AC-15)	N-terminales Ende der β- Isoform des Aktins (murines IgG1)	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Nimotuzumab (Theraloc®, hR3)	Humaner EGF-R (humanes IgG1)	Oncoscience, Wedel, Deutschland
Polyclonal Rabbit Anti- Human IgG FITC Rabbit F(ab') ₂	Humane γ-Kette	Dako, Glostrup, Dänemark
Polyclonal Goat Anti- mouse immunoglobulins FITC	Murine Immunglobuline	Dako, Glostrup, Dänemark
Polyclonal Goat Anti- Mouse Immunglobulins HRP	Murine Immunglobuline	Dako, Glostrup, Dänemark
Polyclonal Goat Anti Rabbit Immunoglobulin HRP	Kaninchen Immunglobuline	Dako, Glostrup, Dänemark
Phospho-EGF Receptor (Tyr1045) Antibody	Humaner EGF-R, pTyr1045	Cell Signaling, Massachusetts, USA
Phospho-EGF Receptor (Tyr1068) Antibody	Humaner EGF-R, pTyr1086	Cell Signaling, Massachusetts, USA
Mouse Anti-phospho- EGF-R (Tyr1173)	Humaner EGF-R, pTyr1173	Millipore, Billerica, USA
Rituximab (MabThera®)	Humanes CD20	Hoffmann-La Roche, Basel, Schweiz
TIB 92	Antigen: I-A von k, r, f und s haplotypes (murines IgG2)	Überstand eines murinen B-Zell-Hybridoms (ATCC)
Anti-EGF-R (1005): SC-03	Antigen: Humaner EGF-R	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg, Germany

8.4 Reagenzien

Reagenzien	Hersteller
Bovines Serum Albumin (BSA)	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Chromium-51 5 mCi/ml	Hartmann Analytic, Braunschweig, Deutschland
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Dulbecco's modified Eagle Medium High Glucose (4,5g/l) with L-Glutamin (DMEM)	PAA Laboratories, Pasching, Österreich
Ethanol > 99 %	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Fötales Kälberserum (FCS)	PAA Laboratories, Pasching, Österreich
FITC-konjugiertes EGF	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
GIBCO Destilliertes Wasser	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
G418 Sulphat (Geneticin) 50 mg/ml	PAA Laboratories, Pasching, Österreich
GIBCO RPMI 1640 with L-Glutamin	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
GM-CSF 250 µg	Behringwerke AG, Marburg, Deutschland
Hanks balanced salt solution (HBSS)	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
Heparin Natrium 25000 IE/ 5 ml	Ratiopharm GmbH, Ulm, Germany
Humanes EGF 1,25x10 ⁷ CFU	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
Humanes Epregrulin	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
Humanes HB-EGF	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
Humanes TGF- α	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
Magermilchpulver	Spinnrad GmbH, Bad Segeberg, Deutschland
Methanol	Merck, Darmstadt, Deutschland
Murines Interleukin-3	Produktion durch WEHI-Zellen
Natrium Azid	Merck, Darmstadt, Deutschland
NuPage Antioxidant	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
NuPage LDS Sample Buffer (4x)	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
NuPage Novex 3-8 % Tris Acetat-Fertiggel	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
NuPage Sample Reducing Agent (10x)	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
NuPage Tris Acetat SDS Running Buffer (10x)	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
Penicillin/Streptomycin (Pen/Strep)	PAA Laboratories, Pasching, Österreich
Perchlorsäure	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Percoll	Biochrom, Berlin, Deutschland
Phosphate Buffered Saline (PBS) 1x, ohne Calcium und Magnesium	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
Phosphate Buffered Saline (PBS) 10x, ohne Kalzium und Magnesium	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland

Precision Plus Protein Dual Colour Standard	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
PVDF Membran	Millipore, Billerica, USA
Simply Blue SafeStain	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
Tris (hydroxymethyl)- aminomethan	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Trypan Blau Solution	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Trypsin EDTA (10x)	PAA Laboratories, Pasching, Österreich
TWEEN 20	VWR International, Darmstadt, Deutschland
Vybrant Cell Labeling Solution	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland

8.5 Lösungen und Puffer

Puffer	Zusammensetzung
5 % Blotpuffer	1,25 g Magermilchpulver in 25 ml TBS (1x) lösen und 25 µl Thimerosal (0,001 %) dazu geben
1 % Blotpuffer	0,25 g Magermilchpulver in 25 ml TBS (1x) lösen und 25 µl Thimerosal (0,001 %) dazu geben
FACS-Puffer	5 g BSA (1 %) wird in 500 ml PBS und 500 µl Natrium- Azid (0,1 %) gelöst
Percoll-Dichtegradienten:	
70% Percoll	35 ml Percoll 15 ml 1xPBS
63% Percoll	31,5 ml Percoll 18,5 ml Hanks
Ripa-Puffer	2,5 ml Tris pH 7,4 (50 mM), 1,5 ml NaCl (150 mM), 5 ml NP-40 (1 %), 5 ml NaDOC (0,5 %), 0,5 ml SDS (1 %), 2,5 ml NaF (50 mM), 0,05 ml Na ₃ VO ₄ (1 mM), 1 Tabl. Complete Protease werden in 50 ml Aqua dest.
TBS (10x)	121.4 g Tris (100mM), 144.9 g Glycin (193mM) und 1 ml Thimerosal (0.005 %) werden mit Aqua dest. auf 1000 ml aufgefüllt
TBS-T (10x)	121.4 g Tris (100mM), 144.9 g Glycin (193mM), 1 ml Thimerosal (0.005 %) und 3 ml Tween 20 (0.003%) werden mit Aqua dest. auf 1000 ml aufgefüllt
Transferpuffer	5.8 g Tris (48 mM) und 2.93 g Glycin (39

	mM) werden in 800 ml Aqua dest. und 200 ml Methanol (20 %) gelöst
1.5 M Tris	45.42 g Tris wird in 200 ml Aqua dest gelöst und mit konzentrierter HCL (37 %) auf pH 7 eingestellt
0.5 M NaCl / 0.5 M Essigsäure	50 ml 5 M NaCL und 14.4 ml Essigsäure werden mit Aqua dest. auf 500 ml aufgefüllt

8.6 Kits

Kit	Verwendung	Hersteller
BCA Protein Assay Kit	Proteinquantifizierung	Thermo Scientific, Rockford, USA
Cell Proliferation Kit (MTT)	Wachstum und Vitalität von Zellen	Hoffmann-La Roche, Basel, Schweiz
Fluorescein Isthiocyanate (FITC) Protein Labeling Kit	FITC-Markierung von Antikörpern	Pierce (Thermo Scientific), Rockford, USA
MycoAlert® Assay Control Set	Nachweis einer Mycoplasmenkontamination	Lonza, Rockland, USA
MycoAlert® Mycoplasma Detection Assay	Nachweis einer Mycoplasmen Kontamination	Lonza, Rockland, USA
Qifikit	Quantifizierung von Zelloberflächenantigenen	Dako, Glostrup, Dänemark
Super Signal West Pico Chemiluminescent Substrate	Chemilumineszenz	Thermo Scientific, Rockford, USA

8.7 Geräte

Geräte	Name	Hersteller
Brutschrank	Hera Cell 240	Thermo Fisher Scientific, Karlsruhe, Deutschland
Cytospin	Shandon-2 Cytospin	Thermo Fisher Scientific, Karlsruhe, Deutschland
Durchflusszytometer	Coulter EPICS XL-MCL	Beckmann Coulter, Krefeld, Deutschland
Elektrophorese	Power Supply-EPS 301	Amersham Biosciences, Freinurg, Deutschland
Entwickler	Curix 60 Agfa	Röntgentechnik Thiele, Rieckling, Deutschland
Gamma-Counter	Wallac 1470 Wizard Automatic Gamma	PerkinElmer, Waltham, USA

	Counter	
ELISA-Reader	Sunrise	Tecan, Männedorf, Schweiz
Lichtmikroskop	AxioVert 40 CFL	Carl Zeiss MicroImaging GmbH, Hamburg, Germany
Photometer	Ultrospec 2100 pro	Amersham Biosciences, Freinurg, Deutschland
Semi-Dry Transferkammer	Phase	Bio-Rad, München, Deutschland
Schüttler	Bo-Rad	Biometra, Göttingen, Deutschland
Sicherheitswerkbank	HeraSafe HS 15	Thermo Fisher Scientific, Karlsruhe, Deutschland
Ultraschallbad	Ultra Sonic Cleaner	VWR International, Darmstadt, Deutschland
Wärmeblock	HB-1	Wealtec, Sparks, USA
Wasserbad		Gesellschaft für Labortechnik, Burgwedel, Deutschland
Western-Blot Kammer	X-Cell Sure Lock Mini Cell	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
Zentrifuge	Heraeus Multifuge 3S+	Thermo Scientific, Rockford, USA

8.8 Verbrauchsmaterialien

Material	Hersteller
Butterflykanüle Mikroflo	Becton Dickinson, Heidelberg, Deutschland
Cryo S Einfrieröhrchen 2 ml	Greiner Bio-One, Frickenhausen, Deutschland
Deckgläser Cellocate	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Dialyseschlauch	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Einmalkanülen Sterican (26 Gx 7/8", 2-G 21x 11/2)	Melsungen, Deutschland
Falcon (Reaktions-Röhrchen), 15 ml/ 50 ml	Heidelberg, Deutschland
Fuji Medical X-Ray Film Super RX	Norddeutscher Röntgenvertrieb, Hamburg, Deutschland
Gewebekulturflaschen, steril, 50 ml	Greiner Bio-One, Frickenhausen, Deutschland
Gewebekulturflaschen, steril, 250 ml	Greiner Bio-One, Frickenhausen,

	Deutschland
Küvetten	BioRad, Brüssel, Belgien
Mikrotiterplatten, 96 Wells, Flachboden steril	Becton Dickinson, Heidelberg, Deutschland
Mikrotiterplatten, 96 Wells, Rundboden steril	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Mikrotiterplatten, 96 Wells, V-Form steril	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Pipettenspitzen (1-10 µl, 10-200 µl, 100-1000 µl)	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Serologische Pipetten 2 ml steril	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Serologische Pipetten 5 ml steril	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Serologische Pipetten 10 ml steril	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Serologische Pipetten 25 ml steril	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
S-Monovetten 10 ml 9NC	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
S-Monovetten 9 ml Z	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Tube, 5ml, 75 x 12 mm	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Whatmanpapier (Blotpapier)	Gudenroth, Hamburg, Deutschland

8.9 Software

Adobe Photoshop 8.0	Adobe Mountain View, USA
Axiovision 3.0	Zeiss, Oberkochen, Deutschland
Endnote X1	Thomson Reuters, Carlsbad, CA, USA
GraphPad Prism 4	GraphPad Software, CA, USA
LumiAnalyst™ 3.0 für Windows™	Roche, Mannheim, Deutschland
Microsoft Office Paket 2003	Microsoft, Washington, USA
XL-System II V3.0	Beckman Coulter, Krefeld, Deutschland

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt meinem Doktorvater PD Dr. med. Michael Dechant. Für sein stetiges Engagement, die Anleitung zum wissenschaftlichen Arbeiten, für die außerordentlich gute Betreuung und sein immer offenes Ohr bin ich dankbar.

Herrn Prof. Dr. med. Thomas Valerius danke ich besonders für die Aufnahme in die Arbeitsgruppe, für die Bereitstellung der Mittel zur Durchführung der Doktorarbeit und seinem wissenschaftlichen Rat.

Dem Direktor der Klinik für Nieren- und Hochdruckkrankheiten der Universität Schleswig-Holstein, Campus Kiel, Herrn Prof. Dr. med. Ulrich Kunzendorf danke ich für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes.

Weiter möchte ich den wissenschaftlichen Mitarbeitern der Arbeitsgruppe Valerius, besonders Frau Dr. rer. nat. Tanja Schneider-Merck, Herrn Dr. rer. nat. Thomas Beyer und Frau Dr. rer. nat. Katja Klausz für die hilfsbereite Betreuung und die freundliche Bereitschaft zum Korrekturlesen danken. Ihre ständige Hilfsbereitschaft und die angenehme Arbeitsatmosphäre haben wesentlich zum Gelingen der Arbeit beigetragen.

Meinem Mitdoktoranden Herrn Martin Schlaeth danke ich für die vielen anregenden Diskussionen.

Den technischen Assistentinnen Frau Katja Bruch und Frau Christyn Wildgrube möchte ich danken für die stete Hilfsbereitschaft und die Aufrechterhaltung des Laborbetriebes.

Denny Wohlgethan möchte ich herzlich danken für seine immerwährende Geduld und seine mentale Unterstützung.

Mein größter Dank gilt meinen Eltern, ohne deren Unterstützung in allen Lebenslagen dies alles nie möglich gewesen wäre.

Curriculum vitae

Kai Rossen

Geburtsdatum 24.07.1984
Geburtsort Husum
Familienstand Ledig

Schullaufbahn

1991- 1995 Bürgerschule Husum (Grundschule)
1995- 2004 Hermann-Tast-Schule Husum (Gymnasium)

Studium

2004- 2010 Medizinstudium an der Christian-Albrechts-
Universität zu Kiel
08/2006 Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
10/2011 Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung

Famulaturen

08- 09/2007 Abteilung für Innere Medizin des Kreiskrankenhauses
Rendsburg
02- 03/2008 Klinik für Innere Medizin I, Universitätsklinikum
Schleswig-Holstein, Campus Kiel
03- 04/2008 Georges-Köhler-Haus, Klinik für Innere Medizin IV,
Nieren- und Hochdruckkrankheiten,
Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Campus Kiel
08/2008 Klinik für Neurologie, Universitätsklinikum Schleswig-
Holstein, Campus Kiel
09/2008 Facharztpraxis für Dermatologie,
Frau Dr. med. M. Möller, Kiel

Praktisches Jahr

08- 12/2009 Chirurgie: Kreiskrankenhaus Rendsburg
01- 04/2010 Innere Medizin: Kreiskrankenhaus Rendsburg
04- 08/2010 Urologie: Klinik für Urologie und Kinderurologie,
Universitätsklinikum Schleswig-
Holstein, Campus Kiel

Berufstätigkeit

seit 01/2011: Klinik für Innere Medizin IV, Nieren- und
Hochdruckkrankheiten, Universitätsklinikum
Schleswig-Holstein, Campus Kiel
(Direktor: Prof. Dr. med. Ulrich Kunzendorf)

Publikationsliste

Tanja Schneider-Merck, Jeroen J. Lammerts van Bueren, Sven Berger, Kai Rossen, Thomas Beyer, Stefan Lohse, Wim K. Bleeker, Paul W.H.I. Parren, Jan G.J. van de Winkel, Thomas Valerius and Michael Dechant, *Human IgG2 antibodies against epidermal growth factor receptor effectively trigger antibody-dependent cellular cytotoxicity but, in contrast to IgG1, only by cells of myeloid lineage*. J Immunol., 2010. **184**(1): p. 512-520.

Ulrich. Kunzendorf, Kai Rossen, *Profil einer EHEC-Endemie mit Escherichia coli O104:H4*. Der Nephrologe, 2011. **6**(12): p. 518-520.

Till Koch, Stefanie Derer, Matthias Staudinger, Kai Rossen, Pia Glorius, Matthias Peipp, Christian Kellner, Ulrich Kunzendorf, Thomas Valerius and Michael Dechant, *Antibody-dependent cellular cytotoxicity in patients on chronic hemodialysis*. Am J Nephrol., 2013. **38**(5): p. 379-387.

Kai Rossen, et al., *Effector mechanisms of Nimotuzumab*.
(Publikation in Vorbereitung).