

Aus der Klinik für Innere Medizin II mit den Schwerpunkten  
Hämatologie und Onkologie  
Sektion für Stammzell- und Immuntherapie  
(Leitender Arzt: Prof. Dr. med. Martin Gramatzki)  
im Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Campus Kiel  
an der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

**Der Einfluss der EGFR Expressionsdichte auf die  
EGFR Antikörper gerichteten Abwehrmechanismen**

Inauguraldissertation  
zur  
Erlangung der Doktorwürde der Medizinischen Fakultät  
der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

vorgelegt von

**Philip Jakob Bauer**

aus **Offenburg**

Kiel **2016**

Erster Berichterstatter: Prof. Dr. med. Thomas Valerius

Zweiter Berichterstatter: Prof. Dr. med. Susanne Sebens

Tag der mündlichen Prüfung: 09.02.2017

Zum Druck genehmigt: Kiel, den 20.09.2017

gez. Prof. Dr. med. Edmund Maser  
(Vorsitzender der Prüfungskommission)

## **Inhaltsübersicht**

Abkürzungsverzeichnis .....	V
Vorbemerkung .....	VIII
1 Einleitung .....	1
2 Material und Methoden .....	18
3 Ergebnisse .....	30
4 Diskussion.....	44
5 Zusammenfassung.....	51
Literatur-und Quellenverzeichnis .....	53
Anhang .....	60
Danksagung.....	64
Lebenslauf .....	65

## Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis .....	V
Vorbemerkung .....	VIII
1 Einleitung .....	1
1.1 Der epidermale Wachstumsfaktorrezeptor: .....	1
1.1.1 Aktivierung und Signalkaskade .....	2
1.1.2 Tumorantigen EGFR .....	5
1.2 EGFR-gerichtete Antikörper .....	8
1.2.1 Struktur und Aufbau von Antikörper .....	8
1.2.2 Monoklonale Antikörper .....	9
1.2.3 Wirkmechanismen von monoklonalen EGFR Antikörper: .....	10
1.2.3.1 Direkte oder Fab-vermittelte Wirkmechanismen .....	10
1.2.3.2 Indirekte oder Fc-vermittelte Wirkmechanismen .....	11
1.2.3.3 Komplement-abhängige Zytotoxizität (CDC) .....	13
1.2.4 Klinische Anwendung von EGFR-Antikörpern.....	15
1.3 Problemstellung und Ziel dieser Arbeit.....	16
2 Material und Methoden .....	18
2.1 Verwendete Materialien .....	18
2.1.1 Kultivierung der Zelllinien .....	18
2.1.2 Generierung von stabilen BHK-EGFR+ Zelllinien .....	20
2.1.3 siRNA Transfektion .....	21
2.1.4 Isolierung humaner Leukozyten .....	21
2.1.5 Zellzytotoxizitätstests .....	23
2.1.5.1 Antikörper-abhängige zelluläre Zytoxizität ( <i>engl.</i> ADCC) .....	24
2.1.5.2 Komplement-abhängige Zytotoxizität ( <i>engl.</i> CDC) .....	25
2.2 Biochemische Methoden.....	25
2.2.1 Proteinextraktion .....	25

2.2.2	Bestimmung der Proteinkonzentration .....	26
2.2.3	Natriumdodecylsulfat ( <i>engl.</i> SDS)- Polyacrylamidgelelektrophorese (PAGE).....	26
2.2.4	Elektrotransfer und Immundetektion von Proteinen .....	27
2.2.5	ELISA.....	27
2.2.6	Durchflusszytometrische Analysen .....	28
2.2.6.1	Direkte und indirekte Durchflusszytometrie .....	28
2.2.6.2	Kalibrierte Durchflusszytometrie.....	29
2.3	Statistische Auswertung.....	29
3	Ergebnisse .....	30
3.1	Generierung der BHK-EGFR+ Zelllinien .....	30
3.1.1	Charakterisierung Fab-vermittelter Wirkmechanismen .....	31
3.1.2	Charakterisierung Fc-vermittelter Mechanismen.....	33
3.2	Verifizierung auf humanen Tumorzelllinien .....	35
3.2.1	Auswahl und Charakterisierung der humanen Tumorzelllinien .....	35
3.2.2	Charakterisierung Fc-vermittelter Mechanismen.....	36
3.2.3	Korrelation.....	37
3.3	EGFR-spezifische siRNA-induzierte EGFR Herunterregulierung.....	40
3.3.1	Effizienzanalyse EGFR-spezifischer siRNA .....	40
3.3.2	Einfluss der EGFR Herunterregulierung auf die Fc-vermittelten Wirkmechanismen.....	42
4	Diskussion.....	44
4.1	Einfluss der EGFR Expressionsdichte auf die Fab- und Fc-vermittelten Wirkmechanismen der EGFR Antikörper .....	44
4.2	Bedeutung der Abwehrquellen für die Fc-vermittelte Zytotoxizität .....	46
4.3	Schlußfolgerung .....	49
5	Zusammenfassung.....	51
	Literatur-und Quellenverzeichnis .....	53

Anhang .....	60
A.I Verwendete Chemikalien und Reagenzien.....	60
A.II Verwendete Geräte, Säulen und Gebrauchsmaterialien .....	62
A.III Verwendete Antikörper .....	63
Danksagung.....	64
Lebenslauf .....	65

## Abkürzungsverzeichnis

Abkürzungen	Erklärung
<b>A</b>	Adenin
ADCC	antibody dependent cellular cytotoxicity
AK	Antikörper
AKT	Serin-Threonin-Kinase
AS	Aminosäure
ATCC	American Type Culture Collection
<b>BHK</b>	baby hamster kidney Zellen
BiTE	Bi-specific T-cells engagers
<b>C</b>	Cytosin
Ca <sup>2+</sup>	Calcium
CD	Cluster of Differentiation
CDC	Complement dependent cytotoxicity
C <sub>H</sub>	konstante schwere Kette
C <sub>L</sub>	konstante leichte Kette
CLS	Cell Line Service
CO <sub>2</sub>	Kohlenstoffdioxid
<sup>51</sup> Cr	Chrom-51
CRC	Colorectal Cancer
<b>Da</b>	Dalton
DAG	1,2-Diacylglycerol
DMEM	Dulbecco`s Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DSMZ	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen
EC <sub>50</sub>	mittlere effektive Konzentration
EGF	Epidermal growth factor
EGFR	Epidermal Growth Factor Rezeptor
ELISA	Enzyme Linked Immunsorbent Assay
EMA	Europäische Arzneimittelagentur
EMA	European Medicines Agency
ERK	Extracellular signal regulated kinase
E:T-Ratio	Verhältnis Effektorzelle:Targetzelle
Fab-Fragment	antigenbindendes Fragment
FACS <sup>TM</sup>	Fluorescence Activated Cell Sorting
FBS	Fetal Bovine Serum; Fötales Rinderserum
Fc-Fragment	fragment crystalline
Fc <sub>γ</sub> R	Fc gamma Rezeptor
FcR	Fc Rezeptor
FCS	Fetal Calf Serum
FDA	Food and Drug Administration (United States)
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
G	Guanin
GAP	GTPase activating protein
GDP	Guanosindiphosphat
ggf.	gegebenenfalls

Grb2	Growth-factor-receptor-bound-2 protein
GTP	Guanosintriphosphat
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Wasserstoffperoxid
H <sub>2</sub> O	Wasser
HB-EGF	heparine binding EGF
HER	human epidermal receptor
HLA-I	Human Leukocyte Antigen Class I
Ig	Immunglobulin
IHC	Immunhistochemie
IP <sub>3</sub>	Insositol-1,3,5-triphosphat
95 % KI	95 % Konfidenzintervall
KIR	Killer cell immunoglobulin-like receptor
KRAS	Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog protein
<b>L</b>	Liter
LBD	Ligandenbindungsdomäne
<b>M</b>	Molar oder Mega-
m	Milli-
mAB	monoklonaler Antikörper
MAC	Membranangriffskomplex
MACS	magnetic activated cell sorting
MAPK	Mitogen-activated Protein Kinase
mCRC	metastatic CRC
MEK	Mitogen-activated Extracellular-signal Regulated Kinase
MEM	Minimum Essential Medium
MFI	Mittlere Fluoreszenzintensität
MICA	MHC Class I Polypeptide-related Sequence A
MICB	MHC Class I Polypeptide-related Sequence B
MNC	Mononuclear Cells
MW	Mittelwert
NaCl	Natriumchlorid
NK-Zellen	natürliche Killerzellen
NKG2D	Killer cell lectin-like receptor subfamily K
NRG	Neureguline
NSCLC	Non-small cell lung cancer
O <sup>2-</sup>	Sauerstoffperoxid
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PBS	phosphate buffered saline
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PI3K	Phosphatidylinositol 3-kinase
PIP <sub>2</sub>	Phosphatidylinositol-(4, 5)-biphosphat
PIP <sub>3</sub>	Phosphatidylinositol-(3, 4, 5)-triphosphat
PKC	Proteinkinase C
PLC	Phospholipase C
PLC <sub>γ</sub>	Phospholipase C gamma
PMN	Polymorphnuclear cell = Granulozyten
Raf/RAF	Ras-activated factor
Ras/RAS	Rat sarcoma protein, G-Protein Ras
RFI	relative Fluoreszenzintensität
RNA	Ribonukleinsäure



<b>SCCHN</b>	Squamos cell carcinoma of head and neck
<b>SDS</b>	Natriumdodecylsulfat
<b>SEM</b>	Standard Error of the Mean
<b>Shc</b>	Src-homology-2-containing
<b>siRNA</b>	small interfered Ribonukleinsäure
<b>SOS</b>	Son-of-sevenless, ein zelluläres Signalprotein
<b>STAT</b>	Signal transducer and activator of transcription
<b>Tab</b>	Tabelle
<b>TGF</b>	Tumor Growth Factor
<b>TK</b>	Tyrosinkinase
<b>TKI</b>	Tyrosinkinaseinhibitor
<b>U</b>	Uracil
<b>UICC</b>	Union Internationale Contre le Cancer
<b>ULBPs</b>	UL16 Binding Proteins
<b>VEGF</b>	Vascular Endothelial Growth Factor
<b>V<sub>H</sub></b>	variable schwere Kette
<b>V<sub>L</sub></b>	variable leichte Kette
<b>v/v</b>	volume per volume
<b>w/v</b>	weight per volume

## Vorbemerkung

Es wird darauf hingewiesen, dass die Ergebnisse der vorliegenden Dissertation Bestandteil nachfolgender Publikationen sind:

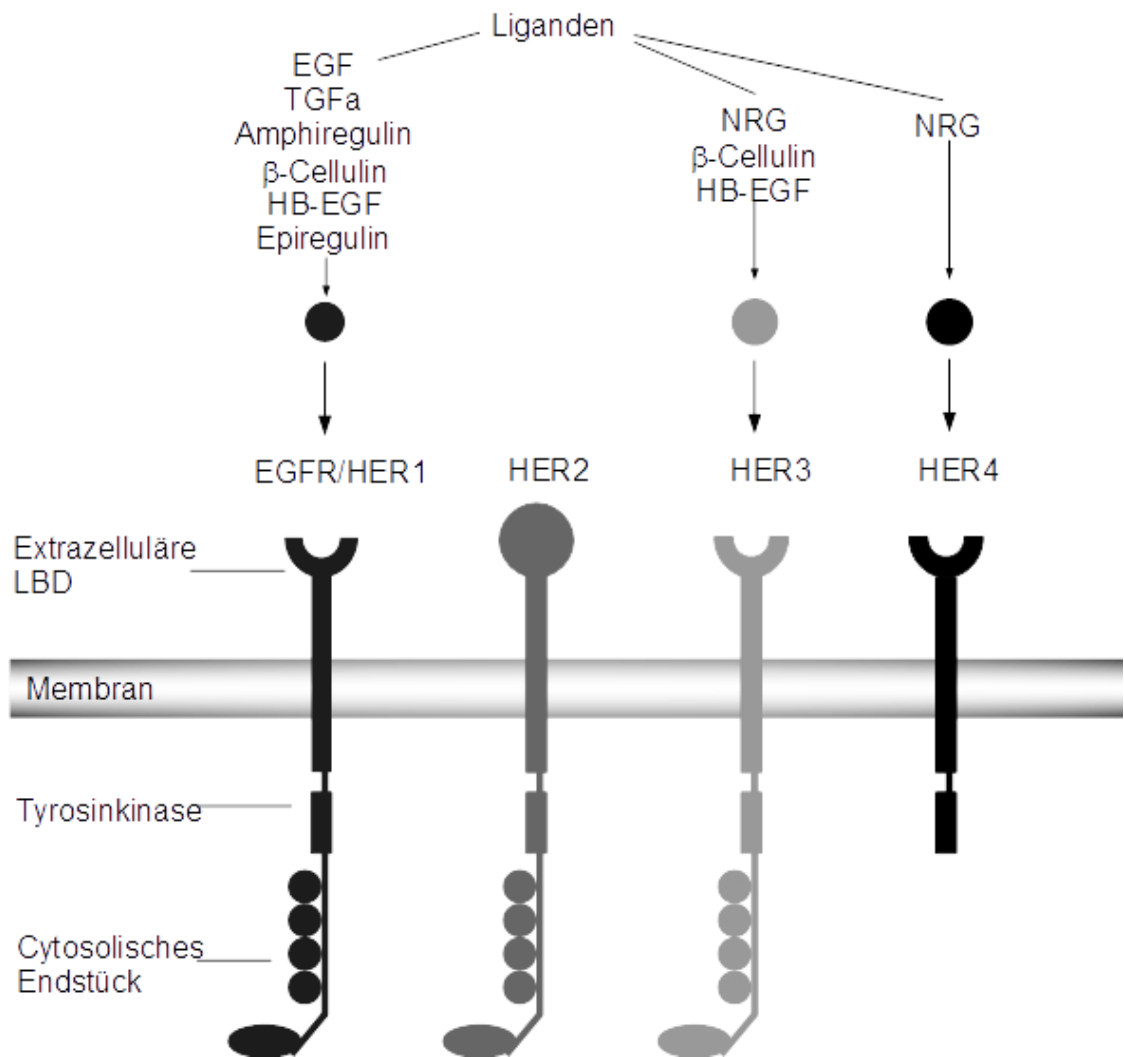
- **Bauer, P.**, Peipp, M., Lohse, S., Derer, S., and Valerius, T., *Efficient EGFR-directed antibody-mediated cytotoxicity highly depends on antigen density and effector source*, in *34th Symposium of the North-German Immunologists*. 2011: Research Center Borstel, Germany (Posterbeitrag und Abstract)
- Derer, S<sup>1</sup>., **Bauer, P**<sup>1</sup>., Lohse, S., Scheel, A.H., Berger, S., Kellner, C., Peipp, M., and Valerius, T. *Impact of epidermal growth factor receptor (EGFR) cell surface expression levels on effector mechanisms of EGFR antibodies*. *J Immunol*. 2012 Dec 1;189(11):5230-9.

<sup>1</sup>S.D. and P.B. contributed equally to this work

# 1 Einleitung

## 1.1 Der epidermale Wachstumsfaktorrezeptor

Der epidermale Wachstumsfaktorrezeptor (*engl.* epidermal growth factor receptor, EGFR) wurde erstmals von Stanley Cohen 1980 entdeckt (1). Eine genauere Beschreibung des Rezeptors wurde von Mendelsohn in den achtziger Jahren veröffentlicht (2). Der EGF-Rezeptor ist ein 170 kDa (1186 Aminosäuren) großes membrangebundenes Protein und gehört zu den humanen epidermalen Rezeptoren (HER), die wiederum zur Klasse der Rezeptortyrosinkinasen gehören und kommt bei dem Menschen auf den meisten Zellarten vor. In der Literatur wird er synonym mit HER1 oder ErbB1 gesetzt. Die bekanntesten Vertreter dieser Tyrosinkinase-Familie sind neben dem HER1-Rezeptor (ErbB1) der HER2/neu-(ErbB2), HER3- (ErbB3) und HER4-Rezeptor (ErbB4). Der humane epidermale Rezeptor besteht strukturell aus einer extrazellulären Liganden-Bindungsdomäne, einer Transmembrandomäne und einer intrazellulären Domäne mit Tyrosinresten und intrinsischer Tyrosinkinaseaktivität (Abb.1-1). Zur Aktivierung des Rezeptors ist einer seiner Liganden erforderlich. Bislang wurden davon 13 verschiedene Liganden entdeckt (3). Die wichtigsten davon sind folgende: Epidermaler Wachstumsfaktor (EGF), Tumorstromafaktor alpha (TGF $\alpha$ ), Amphiregulin,  $\beta$ -Cellulin, Heparin-bindender EGF (HB-EGF) und Epiregulin (4). Die beiden letzten sind auch Liganden für HER4. Dazu wurden sowohl für HER4 und HER3 sogenannte Neureguline (NRG) als Liganden beschrieben. Für den HER2 wurden noch keine Liganden gefunden und man geht davon aus, dass er keine Liganden-Bindungsdomäne besitzt (5).

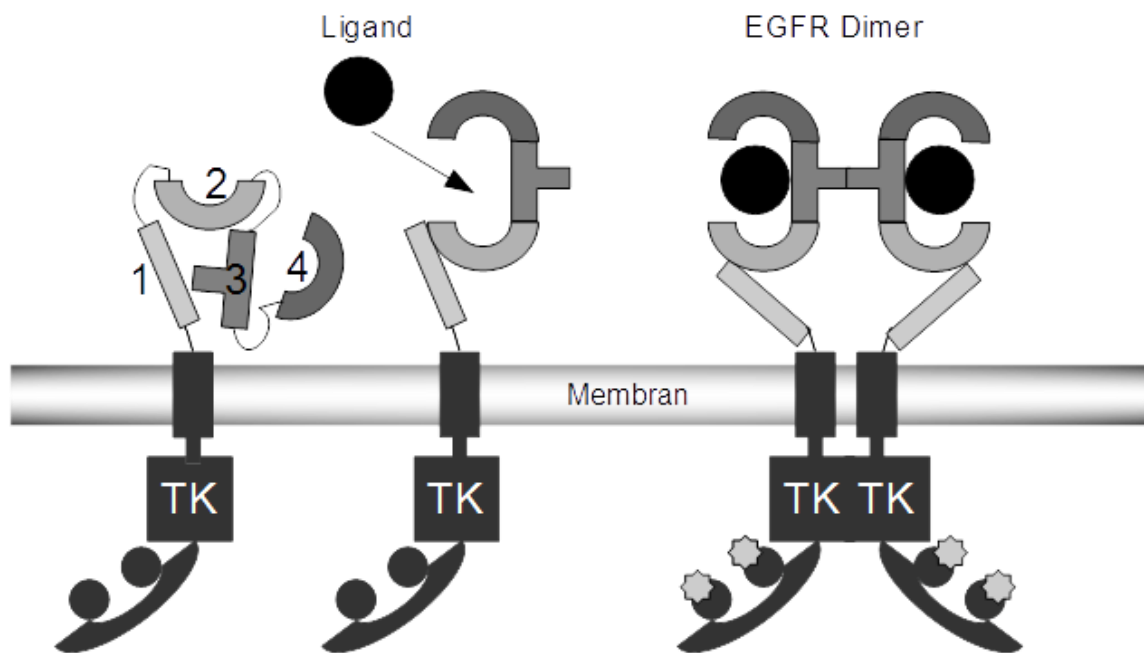


**Abb. 1-1: Mitglieder der Familie der epidermalen Wachstumsfaktoren-Rezeptoren.** Vier Mitglieder der epidermalen Wachstumsfaktor-Rezeptoren sind EGFR/HER1, HER2, HER3 und HER4. Das bekannteste Mitglied ist der EGFR/HER1. Zusammen mit HER2 und HER 4 hat er eine funktionierende intrazelluläre Tyrosinkinasedomäne und ein cytosolisches C-terminales Endstück, über die die weitere intrazelluläre Signalkaskade aktiviert wird. EGFR/HER1 besitzt die meisten bekannten Liganden. HER 4 besitzt kein cytosolisches Endstück. HER2 besitzt keine extrazelluläre Ligandenbindungsstelle (angelehnt an (4)).

### 1.1.1 Aktivierung und Signalkaskade

Nach Ligandenbindung kommt es zu einer Konformationsänderung und einer Dimerisierung des EGF-Rezeptors. Die Dimerbildung kann sowohl homodimerer Art sein, also die Interaktion zweier identischer Mitglieder der HER-Familie, als auch heterodimerer Art, also die Dimerbildung zwischen zwei unterschiedlichen Mitgliedern. Jedoch können nur der HER1 (EGFR) und der HER4 ein Homodimer bilden, da HER2 keine spezifischen Liganden und HER3

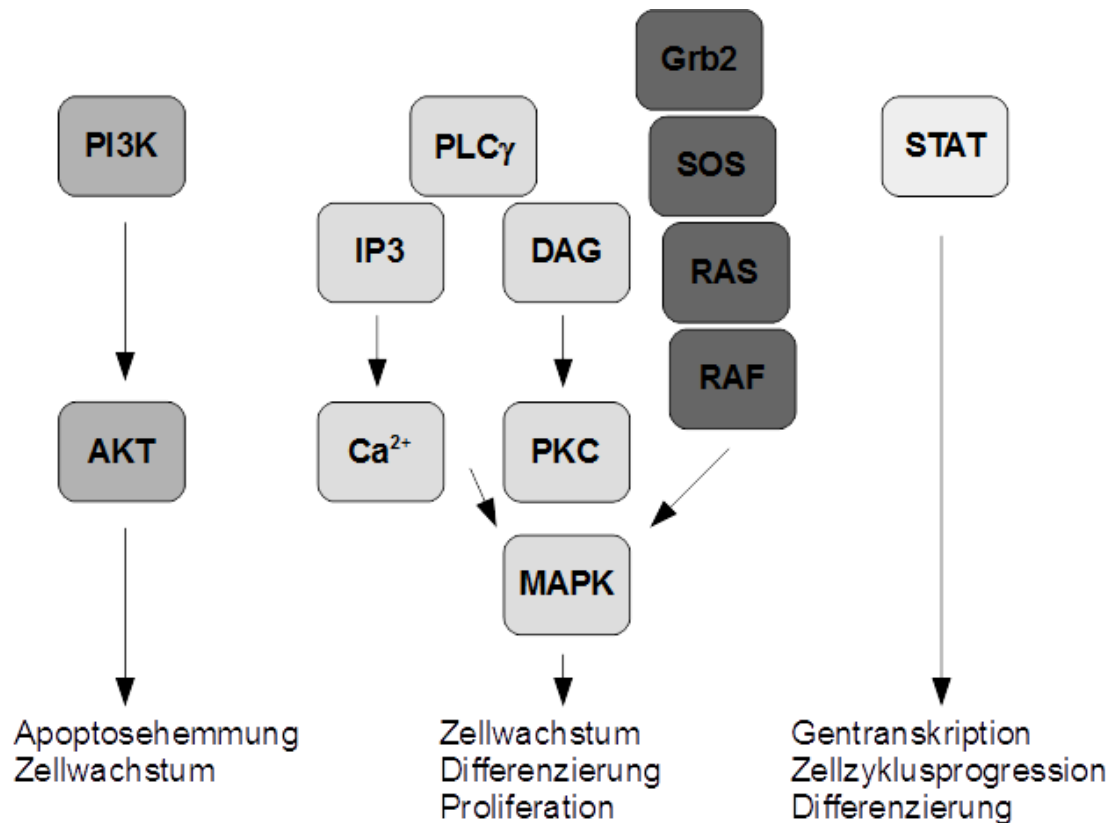
keine intrinsische Tyrosinkinaseaktivität besitzt. Somit wirken diese beiden Rezeptoren ausschließlich als Co-Rezeptoren zur Bildung von Heterodimeren. Die Dimerisierung führt zu einer Autophosphorylierung der intrazellulären Tyrosinreste am C-terminalen Ende der Rezeptoren (Abb. 1-2). Diese phosphorylierten Tyrosinreste dienen dann zum Andocken und schließlich zur Aktivierung von Signaltransduktoren der verschiedenen Signalkaskaden, welche verschiedene zelluläre Funktionen und Zustände steuern (6).



**Abb. 1-2 Aktivierung des EGF-Rezeptors durch Ligandenbindung.** Bindung des Liganden führt zu einer Konformationsänderung und einer Dimerisierung des EGF-Rezeptors. Dadurch kommt es zu einer Autophosphorylierung der intrazellulären Tyrosinreste am cytosolischen C-Terminus. Die intrazellulären Signalkaskaden werden aktiviert. TK=Tyrosinkinase (angelehnt an (7)).

Der aktivierte EGF-Rezeptor führt zu mehreren unterschiedlichen Signalwegen (Abb. 1-3). Der erste Signalweg ist der Phosphatidyl-3-Kinase(PI3K)-Weg. Dabei dient die PI3K als Enzym und phosphoryliert Phosphatidylinositol-(4,5)-biphosphat (PIP<sub>2</sub>) zu Phosphatidyl-inositol-(3, 4, 5)-triphosphat (PIP<sub>3</sub>). PIP<sub>3</sub> wirkt als sekundärer Botenstoff (*second messenger*) und führt zu einer Aktivierung der Serin-Threonin-Kinase AKT. Diese Kinase inhibiert zum einen zellzyklushemmende Proteine und fördert zum anderen die Apoptosehemmung (8). Zudem aktiviert Akt noch weitere Transkriptionsfaktoren, durch die Invasion

und Migration von Zellen gesteuert werden (9). Dieser Signalweg funktioniert jedoch nur über die Ausbildung eines Heterodimers von HER1 (EGFR) und HER3, da der EGF-Rezeptor selbst keine Andockstelle für die PI3K besitzt (10). Bei dem zweiten Signalweg handelt es sich um den Ras/Raf/Mitogen-activated Protein(MAP)-Kinase Weg, dem wohl wichtigsten Signalweg für die Zellteilung und somit für das Überleben von humanen Zellen (11). Dabei sorgen die phosphorylierten Tyrosinreste für eine Aktivierung des Adapterproteins Growth-factor-receptor-bound-2 (Grb2), welches wiederum einen Komplex mit dem Adapterprotein Son-of-Sevenless (SOS) bildet und schließlich direkt das Ras-Protein aktiviert. Die Aktivierung des Ras-Proteins kann auch indirekt über das Adapterprotein Src-homology-2-containing (Shc) mit dem Grb2/SOS-Komplex erfolgen (3). Das aktivierte Ras-Protein sorgt dann über die MAP-Kinase zu einer Aktivierung von den Kinasen Extracellular-signal regulated Kinase 1 (ERK1) und Extracellular-signal regulated Kinase 2 (ERK2). Diese beiden Kinasen steuern im Zellkern die Transkription und Translation von Genen, die zum Wachstum und zur Differenzierung der Zelle führen (12). Der dritte bedeutsame Signalweg ist die Interaktion des EGF-Rezeptors mit der Phospholipase-C $\gamma$  (PLC $\gamma$ ). Dabei sorgt die PLC $\gamma$  für eine Hydrolyse von PIP<sub>2</sub> zu Inositol-1, 3, 5-triphosphat (IP<sub>3</sub>) und 1,2-Diacylglycerol (DAG). Während IP<sub>3</sub> als ein wichtiger Faktor für die Calcium-Homöostase bekannt ist, führt DAG als wichtiger Co-Faktor zu einer Aktivierung der Proteinkinase C (PKC). Diese aktiviert schließlich die MAP-Kinase. Somit kommt es über die PLC $\gamma$  zu einer Vernetzung mit der Endstrecke des Ras/Raf/MAPK-Signalwegs (10) und zu einer wachstumsfördernden Wirkung auf die Zelle (13). Der vierte Signalweg ist die direkte Phosphorylierung der Signal-Transducers-and-Activators-of-Transcription(STAT)-Proteine über die Interaktion mit dem aktivierten EGF-Rezeptor (14). Diese translozieren in den Zellkern und wirken direkt auf die Transkriptionsfaktoren der Gene, welche die Zellzyklusprogression, die Apoptosehemmung, die Zelldifferenzierung, das Zellwachstum und die Proliferation steuern (8).



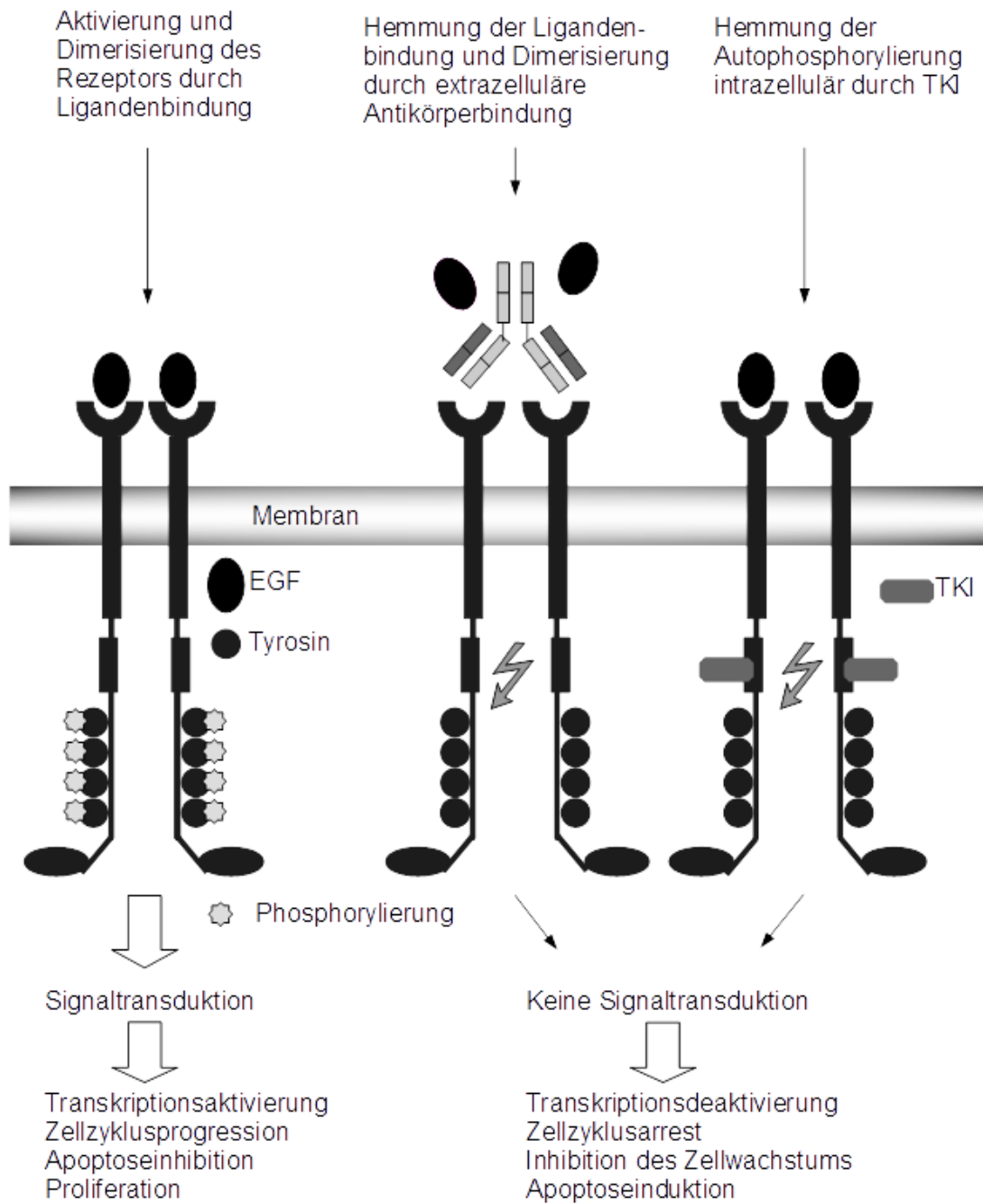
**Abb. 1-3 Intrazelluläre Signaltransduktion der verschiedenen Signalwege aktiviert durch Dimerisierung und Phosphorylierung des EGF-Rezeptors.** Apoptosehemmung und Zellwachstum durch Aktivierung des Phosphatidyl-3-Kinase(PI3K)-Signalwegs. Zellwachstum, Zelldifferenzierung und Zellproliferation aktiviert über den Ras/Raf/Mitogen-activated Protein(MAP)-Kinase-Weg und Phospholipase-C $\gamma$ -(PLC $\gamma$ )-Weg. Gentranskription, Zellzyklusprogression und Zelldifferenzierung induziert durch direkte Phosphorylierung der Signal-Transducers-and-Activators-of-Transcription(STAT)-Proteine (angelehnt an (4))

### 1.1.2 Tumorantigen EGF-Rezeptor

Der EGF-Rezeptor steuert über seine verschiedenen Signalwege schließlich das Überleben humaner Zellen und ist damit wichtig für die Differenzierung und Entwicklung der gastrointestinalen, dermatologischen, respiratorischen und neuralen Systeme. So konnte beispielsweise an EGFR-Knockout-Mäusen gezeigt werden, dass der Mangel an EGF-Rezeptoren aufgrund der starken Schäden und Fehlbildungen dieser Systeme früh zur Letalität führt (15). Aber nicht nur für die gesunden Zellen ist der EGF-Rezeptor von großem Nutzen, auch kommt es zu einer überwiegenden Expression an der Oberfläche von maligne entarteten Zellen. Diese Überexpression des EGF-Rezeptors kommt auf fast einem Drittel aller soliden Tumoren wie beispielsweise dem nicht-

kleinzelligen Bronchialkarzinom (non small cellular lung cancer, NSCLC), dem metastasierten Kolonkarzinom (colorectal carcinoma, mCRC) und den Kopf- und Halstumoren (squamos cell carcinoma of head and neck, SCCHN) vor (2). Somit spielt der EGF-Rezeptor auch eine wichtige Rolle bei der Entwicklung und Pathogenität von Tumoren. Durch diese Überexpression entsteht ein aggressiver Phänotyp des jeweiligen Tumors, die mit einer schlechten Prognose für den Patienten einhergeht (3). Die erhöhte Oberflächenantigendichte des EGF-Rezeptors führt zu einer Verschiebung des Gleichgewichts der Ausbildung von Homo- und Heterodimeren in Richtung des EGF-Rezeptors. Vor allem bei der vermehrten Bildung des Heterodimers EGFR/HER2 kommt es zu einer starken Signalübertragung (16). Durch die gesteigerte Signalwirkung kommt es zu einer verstärkten Proliferation (17). Die Tumorzellen wachsen unkontrolliert und können nicht durch Tumorsuppressoren gestoppt werden, da auch die Hemmung der Apoptose gesteigert ist (18). Auch die Angiogenese und Metastasierung wird von der gesteigerten Expression des EGF-Rezeptors durch vermehrte Bildung des vaskulären endothelialen Wachstumsfaktors (VEGF) gesteigert (19). Der verstärkte Signalweg über PLC $\gamma$  aktiviert eine gesteigerte Metastasierung des Tumors durch Reorganisation des Zytoskeletts (20). Durch die Erkenntnis, welche Rolle der EGF-Rezeptor und der induzierte Signalweg beim Wachstum von Tumoren spielen, wurden zwei verschiedene Therapieansätze mit dem EGF-Rezeptor als Zielstruktur entwickelt. Dabei handelt es sich zum einen um Tyrosinkinaseinhibitoren (TKI) und zum anderen um die monoklonalen Antikörper (mAk), welche gegen EGFR gerichtet sind. Während die TKI die ATP-Bindungsstelle der intrazellulären Tyrosinkinasedomäne des Rezeptors blockieren und hemmen, blockieren die mAk die extrazelluläre Ligandenbindungsstelle (LBS) des EGF-Rezeptors (4). Somit wird durch beide Substanzen die weitere Signalkaskade in der Zelle gehemmt (Abb. 1-4).



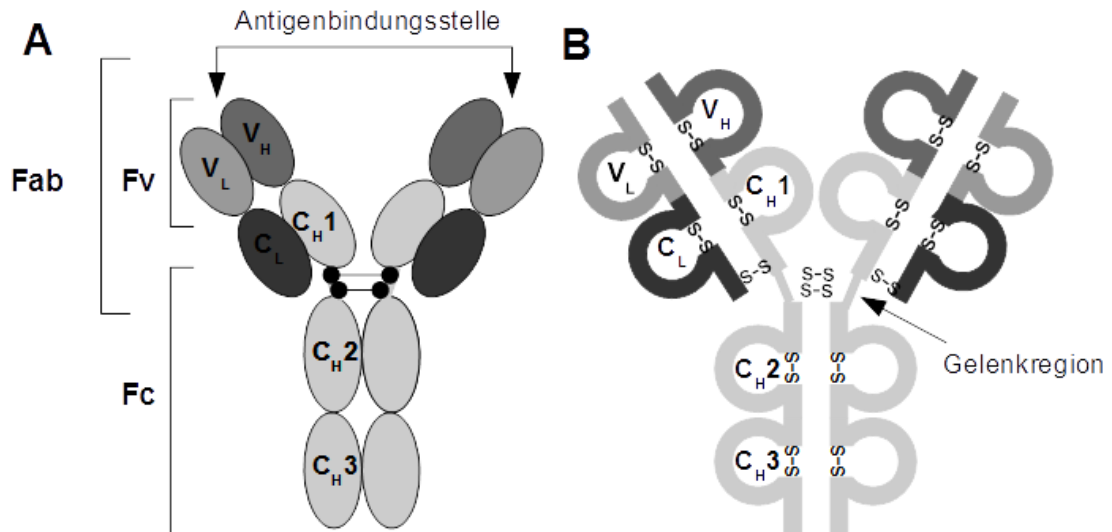


**Abb. 1-4 Wirkung monoklonaler Antikörper und TKI.** Blockierung der extrazellulären Ligandenbindungsstellen (LBS) durch monoklonale Antikörper (mAk) verhindern eine Dimerisierung des EGF-Rezeptors und damit die Signalübertragung. Tyrosinkinaseinhibitoren (TKI) hemmen durch intrazelluläre Bindung an der Tyrosinkinasedomäne die Phosphorylierung und die weitere Signalübertragung. (angelehnt an (21)).

## 1.2 EGFR-gerichtete Antikörper

### 1.2.1 Struktur und Aufbau von Antikörper

Alle Antikörper sind Proteine, die in erster Näherung eine Y-förmige Struktur ausbilden. Sie bestehen aus zwei schweren und zwei leichten Polypeptidketten, welche meist durch Disulfidbrücken miteinander verbunden sind. Die Antikörpermoleküle binden eine Vielzahl von Antigenen und fördern die Wechselwirkung mit einer begrenzten Anzahl von Effektormolekülen und Zellen. Die Immunglobuline (Ig) werden in fünf verschiedene Klassen anhand ihrer konstanten Region unterschieden: IgM, IgD, IgG, IgA und IgE. Bei den monoklonalen EGFR-Antikörpern handelt es sich um Isotypen der Antikörperklasse IgG (Abb. 1-5). Ein IgG-Antikörper hat ungefähr die Molekülmasse von 150 kDa. Die eine Kette hat die molare Masse von 50 kDa und wird als schwere oder H(*heavy*)-Kette bezeichnet, die andere hat eine molare Masse von 25 kDa und wird daher als leichte oder L(*light*)-Kette bezeichnet. Jeder IgG besteht aus zwei schweren und zwei leichten Ketten. Über Disulfidbrücken werden sowohl die schwere Kette mit der leichten Kette, als auch die beiden schweren Ketten miteinander verbunden. Bei Antikörpern gibt es zusätzlich zwei Typen von leichten Ketten, die als Lambda-( $\lambda$ -) oder Kappa-( $\kappa$ -)Kette bezeichnet werden. Das Verhältnis von  $\kappa$  zu  $\lambda$  in menschlichen Antikörpern beträgt 2:1. Die schwere Kette legt durch ihre Struktur die Klasse eines Antikörpers fest. Dazu erhalten die schweren Ketten durch ihre carboxyterminale Hälfte ihre charakteristischen funktionellen Eigenschaften. Die leichte Kette wird in eine variable ( $V_L$ ) und in eine konstante Region ( $C_L$ ) geteilt. Auch die schwere Kette besitzt eine variable Region ( $V_H$ ), jedoch unterteilt sich der Rest in drei konstante Regionen ( $C_{H1}$ ,  $C_{H2}$  und  $C_{H3}$ ). Die Unterschiede in der variablen Region führen innerhalb der Ig-Klassen zu einer unterschiedlichen Spezifität der Antigenbindung.



**Abb. 1-5 Schematische Darstellung der Struktur eines IgG-Moleküls. A** Darstellung der Y-Struktur bestehend aus zwei identischen schweren Ketten (H=heavy) und zwei identischen leichten Ketten (L=light). Der konstante Abschnitt der leichten und die erste konstante Domäne der schweren Kette ( $C_L$ ,  $C_{H1}$ ) bilden mit den variablen Abschnitten (Fv) der leichten und schweren Kette ( $V_L$ ,  $V_H$ ) das antigenbindende Fragment (Fab). Der Fc-Teil besteht aus der zweiten und dritten Domäne der schweren Kette ( $C_{H2}$ ,  $C_{H3}$ ). **B** Darstellung der Disulfidbrückenverbindungen (S-S) im IgG1-Antikörper. Die Gelenkregion kommt über eine oder mehrere Disulfidbrücken zwischen den identischen Kettenpaaren zustande. (angelehnt an (22) und (23)).

### 1.2.2 Monoklonale Antikörper

Monoklonale Antikörper sind von Zellklonen eines bestimmten B-Lymphozyten produzierte immunologisch aktive Proteine, welche sich gegen ein einziges Epitop richten. Daher spricht man aufgrund ihrer einzigen Spezifität von "monoklonal". Die Methode zur Herstellung dieser homologen Antikörperpopulation wird auch Hybridom-Technik bezeichnet. Sie wurde 1975 von Georges Köhler, Cesar Milstein und Niels Jerne entwickelt, die dafür 1984 den Nobelpreis für Medizin erhielten (24). Die Technik beruht auf einer Verschmelzung von Antikörper-produzierenden B-Zellen mit Zellen einer Myelom-Zelllinie (Krebszelle). Dabei entsteht eine neue Hybrid-Zelllinie, die unbegrenzt Antikörper mit einer einzigen Spezifität produziert. Damit wurde eine neue Ära der modernen Immuntherapie gestartet, denn aufgrund der rasanten Weiterentwicklung dieser Technik konnten große Mengen von Antikörpern mit homogener Struktur und Spezifität für ein bestimmtes Antigen hergestellt und erprobt werden (25). Dazu wurden heute durch die moderne Gentechnologie Antikörper mit humanen Eigenschaften, verbesserter

Effektivität und in einem industriellen Maßstab entwickelt (26). Diese Antikörper sind heute zu therapeutischen und diagnostischen Zwecken im Einsatz und nicht mehr aus dem medizinischen Alltag wegzudenken (25). In dieser Studie befassen wir uns ausschließlich mit den monoklonalen Antikörpern, welche sich gegen das EGFR-Antigen richten. Aktuell sind zwei EGFR-Antikörper zur Therapie solider Tumoren zugelassen. Zum einen Cetuximab (Erbix®; Merck) und Panitumumab (Vectibix®; Amgen) (4, 27). Der Antikörper Cetuximab ist eine Chimäre aus murinen variablen Ketten und schweren Ketten des humanen IgG1, während der Antikörper Panitumumab dem humanen IgG2-Allotyp entspricht. Zwei weitere Antikörper befinden sich in klinischen Studien. Dabei handelt es sich einmal um Nimotuzumab (TheraCim; YM Biosciences) für die Behandlung des metastasierenden Kolonkarzinoms und zum anderen um Zalutumumab (HuMax-EGFR; Genmab) für die Behandlung von Kopf- und Halstumoren und des nicht-kleinzelligen Bronchialkarzinoms (28). Nimotuzumab ist ein humanisierter IgG1-Antikörper und bei Zalutumumab handelt es sich um einen humanen IgG1-Isotyp.

### **1.2.3 Wirkmechanismen von monoklonalen EGFR Antikörper**

Die Wirkmechanismen monoklonaler Antikörper gegen den EGF-Rezeptor können in direkte und indirekte Mechanismen unterschieden werden. Der direkte Mechanismus wird über die Fab-Region vermittelt, während der indirekte Mechanismus durch weitere Interaktionen mit der Fc-Region einhergeht.

#### **1.2.3.1 Direkte oder Fab-vermittelte Wirkmechanismen**

Durch die Bindung der Fab-Fragmente des Antikörpers an die extrazelluläre Domäne des EGF-Rezeptors werden die direkten Effekte vermittelt. Die direkten Effekte des Antikörpers können durch Verdrängung und Blockierung des Liganden an der extrazellulären Bindungsstelle des EGF-Rezeptors eine Induktion der Apoptose und eine Hemmung der Signaltransduktoren bewirken. Durch diese Effekte kann es zu einem verzögerten oder sogar rückläufigen Tumorwachstum kommen (29). Die Antikörper gegen den EGF-Rezeptor sind beispielsweise in der Lage mittels der Fab-vermittelten Effekte Apoptose in Kolonkarzinomzellen zu induzieren (30). Auch konnte in weiteren Studien

gezeigt werden, dass die direkten Mechanismen von EGFR-Antikörpern zu einer Hemmung des Tumorzellwachstums und zu einer Hemmung der Autophosphorylierung des EGF-Rezeptors von Tumorzellen führen (21, 31). Dazu induzieren die Fab-Fragmente von EGFR-Antikörpern auch den Zellzyklusarrest von humanen Plattenepithelkarzinomzellen indem es zu einer reduzierten Aktivität der Cyclin-abhängigen Kinasen kommt, welche für das Zellwachstum zuständig sind. Zusätzlich kommt es zu einer Expression von Zellzyklusinhibitoren, die zu einem Zellzyklusarrest führen (32-34). Dieser Zellzyklusarrest findet in der G<sub>1</sub>-Phase der Zellteilung statt und führt zu einer darauffolgenden Apoptose der betroffenen Tumorzelle (21). Durch ihre Spezifität unterscheiden sich die einzelnen EGFR-Antikörper auch in ihren direkten Effekten voneinander. Beispielsweise bindet Cetuximab (Erbix®) am selben Epitop wie die natürlichen Liganden des EGF-Rezeptors und blockiert diesen. Während bei der Opsonisierung durch Cetuximab eine Aufnahme des EGF-Rezeptors in das Zellinnere stattfindet, wird dieser Vorgang durch Panitumumab (Vectibix®) jedoch gehemmt (35).

#### **1.2.3.2 Indirekte oder Fc-vermittelte Wirkmechanismen**

Die Bindung der Fab-Fragmente ist auch die Grundlage für die indirekten Wirkmechanismen. Durch ihre Markierung des Antigens kann die Fc-abhängige Interaktion mit bestimmten Rezeptoren und Proteinen stattfinden und schließlich die indirekten Wirkmechanismen aktiviert werden (31, 36, 37). Zwei dieser indirekten Wirkmechanismen sind zum einen die Interaktion der Fc-Region mit den Fc-Rezeptoren der unterschiedlichen Effektorzellen, welche zu einer Antikörper-abhängigen zellulären Zytotoxizität (antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity, ADCC) führt, und zum anderen die Interaktion der Fc-Region mit dem Komplementsystem, welche eine Komplement-abhängige Zytotoxizität (complement-dependent cytotoxicity, CDC) zur Folge hat (38).

#### **Antikörper-abhängige zelluläre Zytotoxizität (ADCC)**

Auf humanen Zellen werden unterschiedliche Typen von Fc-Rezeptoren exprimiert. Antikörper besitzen die Fähigkeit über ihre Fc-Region diese Zellen zu rekrutieren. Dadurch können die zytolytischen, phagozytischen und immunmodulatorischen Eigenschaften der Leukozyten aktiviert werden. Die

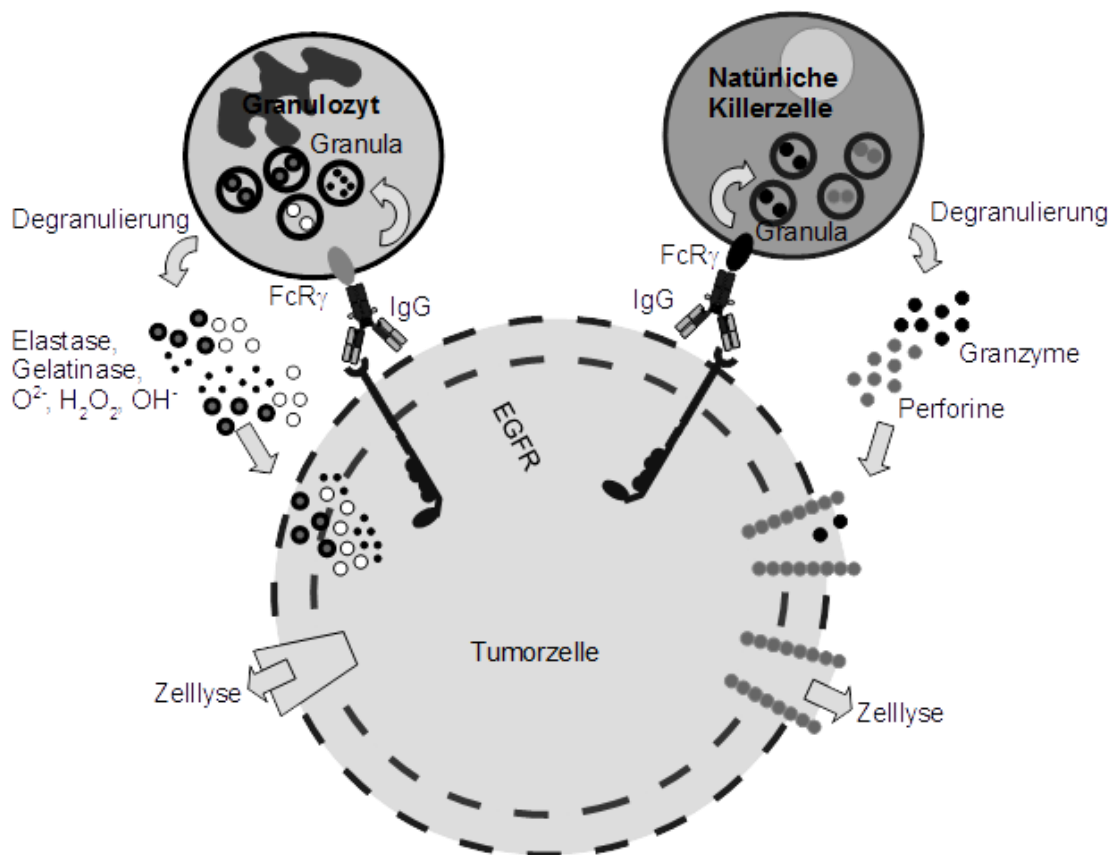
EGFR-Antikörper sind vom IgG-Isotyp und interagieren mit der Gruppe Fc-Rezeptoren vom Typ Gamma (Fc $\gamma$ ). Drei Subtypen der Fc $\gamma$ -Rezeptoren werden über die Fc-Region der EGFR-Antikörper aktiviert: Fc $\gamma$ I (CD64)-, Fc $\gamma$ II (CD32)- und Fc $\gamma$ IIIa (CD16)-Rezeptor (Tab. 1-1).

**Tab. 1-1 Übersicht der Fc $\gamma$ -Rezeptoren** (angelehnt an (39))

<b>Rezeptor</b>	Fc $\gamma$ RI (CD64)	Fc $\gamma$ RII-A (CD32)	Fc $\gamma$ RII-B2 (CD32)	Fc $\gamma$ RII-B1 (CD32)	Fc $\gamma$ RIII (CD16)
<b>Struktur</b>	$\alpha$ 72 kDa	$\alpha$ 40 kDa	$\alpha$ 40 kDa	$\alpha$ 40 kDa	$\alpha$ 50-70 kDa
<b>Zelltyp</b>	Makrophagen Neutrophile Eosinophile Dendritische Zellen	Makrophagen Neutrophile Eosinophile Blutplättchen Langerhans Zellen	Makrophagen Neutrophile Eosinophile	B-Zellen, Mastzellen	NK-Zellen Eosinophile Makrophagen Neutrophile Mastzellen
<b>Wirkung und Bindung an den Liganden</b>	Aufnahme, Stimulation, Freisetzung reaktiver Sauerstoff- spezies, Tötungs- startsignal	Aufnahme, Freisetzung von Granula (Eosinophile)	Aufnahme, Hemmung der Stimulation	Keine Aufnahme, Hemmung der Stimulation	Tötungs- startsignal (NK-Zellen)

Durch ihre gemeinsame Interaktion werden die jeweiligen Effektorzellen, wie die Natürlichen Killerzellen (NK-Zellen), sowie Monozyten und Granulozyten aktiviert (40). Ein EGFR-Antikörper bindet 1:1 an einen Fc $\gamma$ -Rezeptor an der oberen C<sub>H2</sub>-Region und an der unteren Gelenkregion. Für diese Bindung benötigt der IgG-Isotyp eine geknickte Konformation (41). Nach der Bindung des jeweiligen Fc $\gamma$ -Rezeptors entsteht zwischen der jeweiligen Effektorzelle und der opsonierten Zielzelle eine immunologische Synapse, durch die die antikörper-abhängige zelluläre Zytotoxizität (ADCC) initiiert wird (Abb. 1-6). Granulozyten und Monozyten schütten durch ihre Aktivierung freie Granula aus.

Dabei handelt es sich um Sauerstoffradikale wie Wasserstoffperoxid ( $H_2O_2$ ), Superoxidanion ( $O_2^-$ ) und Hydroxidation ( $OH^-$ ). Auch zytolytische Substanzen wie Serinproteasen, Lactoferrin und Gelatinasen werden ausgeschüttet und zerstören die Zielzelle (42). Über die Interaktion des  $Fc\gamma IIIa$ -Rezeptors schütten die NK-Zellen Perforine und Granzyme aus. Dabei fügen die Perforine der Zielzelle ein Loch in ihre Zellmembran zu, was ein Auslaufen der Zielzelle bewirkt. Zusätzlich können die Granzyme eindringen und beispielsweise die DNA der Zielzelle fragmentieren (43).

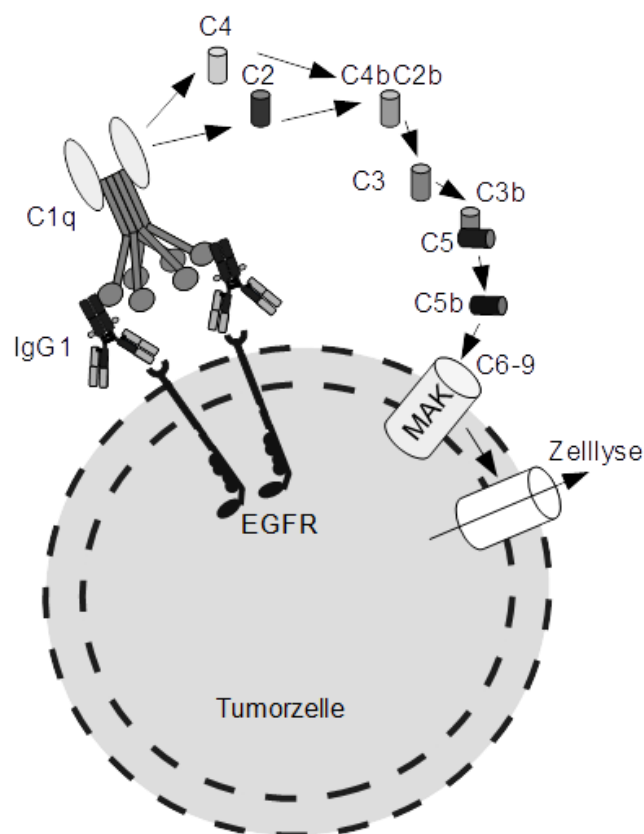


**Abb. 1-6 Vereinfachte Darstellung der Antikörper-abhängigen zellulären Zytotoxizität (ADCC)** Monoklonale Antikörper binden an  $Fc\gamma$ -Rezeptoren der Granulozyten, Monozyten und NK-Zellen und aktivieren diese. Es kommt zur Degranulierung. Granulozyten und Monozyten produzieren Sauerstoffradikale und zytolytische Substanzen, welche die Zielzelle angreifen und eine Zellyse bewirken. NK-Zellen induzieren die Zellyse über Bildung von Perforinen und Granzymen (angelehnt an (39)).

### 1.2.3.3 Komplement-abhängige Zytotoxizität (CDC)

Neben der Aktivierung der Effektorzellen können EGFR-Antikörper auch einen weiteren Teil der angeborenen Immunität beeinflussen. Dabei handelt es sich

um die Komplementaktivierung. Diese kann über drei Wege gestartet werden. Erstens über den klassischen Weg durch das C1q-Protein, zweitens über den Lektinweg durch das Mannan-bindende Lektin (MBL) und drittens über den alternativen Weg durch das C3-Protein. Durch die EGFR-Antikörper wird die Komplementkaskade hauptsächlich über den klassischen Weg initiiert, indem das C1q-Protein mit der Fc-Region eine Bindung eingeht (Abb.1-7). Dadurch wird der finale Membranangriffskomplex (MAC) aktiviert und es kommt zur Komplement-abhängigen Zytotoxizität (CDC) der Zielzelle. Durch den MAC wird die Zelle schließlich lysiert (44, 45). Jedoch wird die Effektivität der Antikörper unter der Beteiligung der Komplementaktivierung in der Literatur kontrovers diskutiert (46-49). Auch wurde in weiteren Studien gezeigt, dass EGFR-Antikörper vom IgA-Typ keine CDC vermitteln können (36, 50).



**Abb. 1-7 Vereinfachte Darstellung der Komplement-abhängigen Zytotoxizität (CDC)** Die Tumorzelle wird durch Bindung der monoklonalen Antikörper am EGF-Rezeptor opsoniert. Dadurch kommt es zur Aktivierung der Komplementkaskade über den klassischen Weg und schließlich zur Bildung des Membranangriffskomplexes (MAC), welche zur Lyse der Zelle führt. (angelehnt an (39)).



#### **1.2.4 Klinische Anwendung von EGFR-gerichtete Antikörpern**

Seit 2004 wurden monoklonale Antikörper erstmals als molekulare zielgerichtete Therapieoption bei soliden Tumoren durch die amerikanische Arzneimittelbehörde FDA zugelassen. Dabei handelt es sich um eine Therapiealternative beim fortgeschrittenen Kolonkarzinom (CRC). Die zugelassenen monoklonalen Antikörper sind der EGFR-Antikörper Cetuximab (Erbix®) und der VEGF-Antikörper Bevacizumab (Avastin®). Zwei Jahre später wurde ein weiterer EGFR-Antikörper zugelassen, nämlich Panitumumab (Vectibix®). Die Zulassung dieser monoklonaler Antikörper erfolgte für die Therapie des metastasierten CRC in Kombination mit Chemotherapie (5-Fluorouracil, Oxaliplatin, Irinotecan) (51). Außerdem konnten weitere Phase II- und III-Studien die Wirksamkeit der EGFR-Antikörper als Monotherapie bei Versagen der herkömmlichen Chemotherapie oder bei Nichtvertragen dieser durch den Patienten belegen (4, 52). Jedoch besteht eine Einschränkung der Therapie mit EGFR-Antikörper bei Mutation des intrazellulären Proteins KRAS (Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog protein), da bei einer solchen Mutation der Patient nicht von einem Einsatz der monoklonalen Antikörper profitiert. Die Expertenkommission der American Society of Clinical Oncology (ASCO) empfiehlt daher seit 2009 vor einer EGFR-Antikörper-Gabe eine Untersuchung des KRAS-Status als Tumorbiomarker bei CRC (53). Cetuximab wurde 2006 von der FDA für die Therapie des Plattenepithelkarzinoms des Kopfes und Halses (SCCHN) in Kombination mit Strahlentherapie oder als Gabe bei Patienten mit voriger Chemotherapie zugelassen. Cetuximab zeigt in Studien eine Reduzierung der Mortalität in Kombination der Strahlentherapie ohne ansteigenden Nebenwirkungen für Patienten bei lokal fortgeschrittenem SCCHN (54). Mit der 2009 publizierte EXTREME-Studie (Erbix in 1er-line treatment of recurrent or metastatic head and neck cancer) wurde erstmals seit 30 Jahren ein Überlebensvorteil durch die Zugabe von Cetuximab zur Platin-basierenden Standardchemotherapie bei rezidivierenden oder metastasierenden SCCHN gezeigt (55). Dies wird als Meilenstein in der Therapieentwicklung bei den schwierig zu behandelnden Kopf und Halstumoren gewertet.

Im September 2008 wurde die Erstlinienbehandlung des fortgeschrittenen oder metastasierenden nicht-kleinzelligen Bronchialkarzinoms (NSCLC) mit Cetuximab von der Herstellerfirma Merck bei der Europäischen Arzneimittelagentur (EMA) beantragt. Der Antrag zur Zulassung stützt sich auf die Ergebnisse der Phase-III-Studie FLEX (First-line in lung cancer with Erbitux). Diese vergleicht die herkömmliche Chemotherapie (Cisplatin, Vinorelbin, Gemcitabin) mit zusätzlicher Gabe von Cetuximab oder Placebo. Dabei konnte ein kleiner statistisch signifikanter Überlebensvorteil zugunsten der Kombination Chemotherapie und Cetuximab nachgewiesen werden (56). Die bisherigen Erkenntnisse zum Nutzen von Cetuximab wurden durch aktuellere Veröffentlichungen bestätigt (57). Eine weitere Auswertung der ermittelten Daten der FLEX-Studie konnte einen positiven Einfluss von hoher EGFR Expression auf die therapeutische Wirksamkeit durch Chemotherapie und Gabe von Cetuximab zeigen (58). Die Autoren deuteten anhand dieser Ergebnisse an, dass die EGFR Zelloberflächenexpressionsdichte vermutlich als Tumormarker für die Voraussage des Überlebensvorteils bei der zusätzlichen Gabe von Cetuximab zur herkömmlichen Chemotherapie bei Patienten mit fortgeschrittenem NSCLC benutzt werden kann. Somit kann eine quantitative Untersuchung der EGFR Expressionsdichte durch immunhistochemischen Untersuchungen (IHC) vor dem Beginn einer Cetuximab-Therapie von therapeutischen Nutzen sein (58).

### **1.3 Problemstellung und Ziel dieser Arbeit**

In der Literatur gibt es schon lange kontroverse Diskussionen über den Einfluss der EGFR Expressionsdichte von Tumorzellen auf die therapeutischen Wirkmechanismen der EGFR-gerichteten Antikörper, wie beispielsweise Cetuximab oder Panitumumab. So zeigten Studien, dass wahrscheinlich die Menge der EGFR Zelloberflächenexpression den Erfolg einer EGFR Antikörperbasierten Tumorthherapie bei Patienten sowohl mit fortgeschrittenem NSCLC als auch mit CRC vorhersagen kann (59-61). Eine weitere Studie bestätigte den Zusammenhang zwischen erhöhter EGFR Expressionsdichte und dem Erfolg der EGFR Antikörpertherapie mit Cetuximab, jedoch konnte ein Schwellenwert der EGFR Expression für diesen therapeutischen Nutzen noch nicht angegeben werden (62). Auf der anderen Seite zeigten andere Studien, dass die EGFR

Expressionsdichte keine Aussagekraft für das Nutzen der EGFR-gerichteten Antikörpertherapie bei Patienten mit CRC hat (63, 64). Bei diesen Studien wurde unseres Wissens jedoch nicht systematisch der Einfluss der EGFR Zelloberflächenexpression auf die einzelnen durch EGFR Antikörper vermittelten Wirkmechanismen untersucht und genau definiert. Aufgrund der beschriebenen Problematik ergaben sich für die folgende Arbeit folgende Arbeitsziele:

1. Generierung eines stabilen EGFR Expressionssystems.
2. Systematische Untersuchung des Einfluss der EGFR Expressionsdichte auf die EGFR Antikörper gerichteten Abwehrmechanismen.
3. Bedeutung der unterschiedlichen Abwehrquellen für die Fc-vermittelte Zytotoxizität in Abhängigkeit zur EGFR Zelloberflächenexpression.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Verwendete Materialien

#### 2.1.1 Kultivierung der Zelllinien

Die adhärennten Zellen lagerten in Kryogefäßen in einem stickstoffhaltigen Tank mit einer Anzahl von  $5 \times 10^6$  Zellen in Kulturmedium mit 16% Dimethylsulfoxid (DMSO). Zur Kultivierung wurden die Zellen in einem Wasserbad mit der Temperatur bei 37°C schnell aufgetaut, mit warmem Kulturmedium aufgenommen und zentrifugiert. Anschließend der Überstand verworfen und das Zellpellet mit Kulturmedium wieder resuspendiert. Die suspendierten Zellen wurden dann in neue Kulturflaschen überführt und mit einem Endvolumen von 20 ml im Brutschrank (37°C und 5 v/v % CO<sub>2</sub>) inkubiert. Die Passage der Zellen erfolgte, in dem das Medium verworfen, mehrmals mit 1 x PBS gewaschen, 0,5 ml des Enzyms Accutase zugegeben und für 10 min im Brutschrank inkubiert wurde. Die Zellen wurden in ihrem entsprechenden Medium (Tab. 2-1) aufgenommen und in Verhältnissen von 1:2 bis 1:20, je nach Bedarf, in neue Kulturflaschen (25, 75, 175 cm<sup>2</sup>) überführt und im Brutschrank gelagert. Zur Verwendung der Zellen für die Versuche wurden die Zellsuspensionen in einem Verhältnis von 1:5 mit einer Trypanblau-Lösung (40µl) verdünnt und vermischt. Anschließend konnten 10µl der Verdünnung auf eine Neubauer-Zählkammer überführt und die Anzahl der vitalen Zellen mit Hilfe eines Lichtmikroskops bestimmt werden. Die Anzahl der Zellen pro Milliliter errechnete sich mit folgender Formel:

$$\frac{\text{Zellzahl}}{\text{ml}} = \frac{\text{gezählte Zellzahl aller Großquadrate}}{4} \times \text{Verdünnungsfaktor} \times 10000$$

Im Laufe der Arbeit wurden Aliquots der einzelnen Zelllinien wieder eingefroren. Dafür wurden die resuspendierten Zellen in 15 ml Falcon-Röhrchen von den Kulturflaschen überführt, zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Zellpellet wurde mit 2 ml Einfriermedium (16% DMSO in FCS) resuspendiert, in ein Kryogefäß überführt und anschließend in einem Gefrierschrank bei -80°C

eingefroren. Die langfristige Lagerung erfolgte in einem Tank mit flüssigem Stickstoff. Um eine Infektion der kultivierten Zellen mit Mycoplasmen zu verhindern, erfolgte in regelmäßigen Abständen die Untersuchung der Zellen mit dem MycoAlert® Mycoplasma Detection Kit (Lonza, Rockland, ME, USA) gemäß dem Herstellerprotokoll. Im Rahmen der Versuche wurden folgende Zellen verwendet.

**Tab. 2-1: Übersicht über die verwendeten Zelllinien**

Zelllinie	Ursprung	Medium	Bestandteile	Bezugsquelle:
<b>A431</b>	Humanes epidermoidales Karzinom	RPMI-1640	10 % fötales Kälberserum (FCS), 1% Penicillin/ Streptomycin(Pen/Strep) 1 mg/ml Geneticin(Gen)	DSMZ, Braunschweig
<b>A549</b>	Humanes nicht-kleinzelliges Bronchialkarzinom	Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)	10 % FCS 1 % Pen/Strep 1 mg/ml Gen	Salisbury, UK
<b>A1207</b>	Humanes Glioblastom	DMEM	10 % FCS 1 % Pen/Strep 1 mg/ml Gen	Dr. Aaronson, NCI, NIH, Bethesda, MD
<b>BHK-21</b>	Immortalisierte Baby-Hamster-Nieren-Zellen	RPMI-1640	10 % FCS 1 % Pen/Strep 1 mg/ml Gen	DSMZ, Braunschweig
<b>DiFi</b>	Humanes Kolonkarzinom	DMEM	10 % FCS 1 % Pen/Strep 1 mg/ml Gen	ATCC, Manassas, VA
<b>HEK-293T</b>	Humane embryonale Nierenzellen	DMEM	10 % FCS 1 % Pen/Strep 1 mg/ml Gen	ATCC, Manassas, VA
<b>PANC1</b>	Humanes Adenokarzinom des Pankreas	RPMI-1640	10 % FCS 1 % Pen/Strep 1 mg/ml Gen	ATCC, Manassas, VA
<b>PANC89 (T3M4)</b>	Humane Lymphknoten-metastase des Pankreas	RPMI-1640	10 % FCS 1 % Pen/Strep 1 mg/ml Gen	Dr. T. Okabe, Tokio, Japan
<b>SW480</b>	Humanes Adenokarzinom des Colons	RPMI-1640	10 % FCS 1 % Pen/Strep 1 mg/ml Gen	DSMZ, Braunschweig

### **2.1.2 Generierung von stabilen BHK-EGFR+ Zelllinien**

Für die Generierung wurden BHK-21 Zellen mit dem Plasmid pUSE-EGFR (Upstate Biotechnology) stabil transfiziert. Die Transfektion erfolgte mittels Lipofektion durch Benutzen von Lipofectamine 2000-Reagenz (Invitrogen, Carlsbad, CA). Dabei wurde am 1. Tag jeweils  $1 \times 10^6$  BHK-21 Zellen pro Platte in 10 ml RPMI-1640 Medium ausgesät. Am 2. Tag wurden in ein 15 ml Tube 24  $\mu$ l pUSE-EGFR und in ein anderes 15 ml Tube 30  $\mu$ l Lipofectamine 2000 zugegeben und auf 1,5 ml mit RPMI-1640 Medium aufgefüllt. Das 2. Tube wurde vorgetextet, mehrmals invertiert und kurz zentrifugiert. Anschließend der Inhalt nach 5 min Inkubationszeit bei Raumtemperatur in das 1. Tube überführt und gemixt. Nach weiteren 20 min Inkubation wurden die 3 ml auf eine Platte tröpfchenweise pipettiert. Eine Platte wurde zur Kontrolle untransfiziert belassen. Am 4. Tag wurden die Zellen mit Gabe von 1 mg/ml Geneticin selektiert und alle 2 Tage das Medium gewechselt. Nach circa 2 Wochen bildeten sich einzelne Zellklone. Diese wurden anschließend dann mittels indirekter Immunfluoreszenz auf ihre EGFR Zelloberflächenexpressionslevel überprüft. Um die ausschließlich EGFR exprimierenden Zellen zu erhalten, wurde eine positive Selektion mittels MACS (magnetic activated cell sorting) Technologie durchgeführt. Dafür wurden die Zellen in 37,5  $\mu$ l MACS-Puffer aufgenommen und 12,5  $\mu$ l des murinen EGFR-gerichteten Antikörpers m425 (200  $\mu$ g/ml) hinzugegeben. Anschließend geschüttelt und auf Eis für 15 min inkubiert. Danach Zugabe von weiteren 30  $\mu$ l MACS-Puffer und 20  $\mu$ l Anti-mouse IgG Micro Bead Cocktail. Nach weiteren 15 min Inkubationszeit auf Eis wurden 2 ml des MACS-Puffers hinzugegeben und die Proben 10 min bei 4°C zentrifugiert (1200 rpm, Zentrifuge). Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet in 500  $\mu$ l MACS-Puffer resuspendiert. Auftragen der Lösung auf die Magnetsäule und dreimaliges Spülen der Säule mit 3 ml MACS-Puffer. Durch die positive Selektion befanden sich die EGFR-positiven Zellen auf der Säule des Magneten. Um die BHK-EGFR+ Zellen zu erhalten, wurde der Magnet von der Säule entfernt und mit 3 ml MACS-Puffer gespült. Dann die Lösung 5 min zentrifugiert (1000 U/min, Zentrifuge), der Überstand verworfen, das Zellpellet in Kulturmedium (RPMI+10% FCS und 1% Pen/Strep und 1mg/ml Gen)

resuspendiert und in einer kleinen Zellkulturflasche stehend ( $2 \times 10^6$  Zellen/ml) kultiviert.

### **2.1.3 siRNA Transfektion**

Die Zellen wurden bei einer Dichte von  $1 \times 10^5$ /Well in 6-Well-Platten ausgesät und für eine Nacht im Brutschrank wachsen gelassen. Am nächsten Tag erfolgte die Durchführung der Transfektion unter Zugabe der jeweils drei EGFR-spezifischen siRNAs #1, #2 und #3 mit einer Konzentration von 25 nM und des Enzyms Lipofectamine 2000 für 48 h. Um die Herunterregulierung der EGFR Expression darzustellen, wurde eine Proteinauftrennung mittels SDS-PAGE (siehe Kapitel 2.2.3) und anschließendem Elektrotransfer und Immundetektion (siehe Kapitel 2.2.4) gegen EGFR und  $\beta$ -Aktin durchgeführt. Zur Kontrolle wurde die unspezifische siRNA Negative Control #1 (Applied Biosystems/Ambion, Foster City, CA, USA) verwendet. Für alle Versuche kamen die Standardprotokolle nach den Angaben des Herstellers zum Tragen. Synthetische EGFR-spezifische siRNAs wurden von der Firma Applied Biosystems/Ambion (Foster City, CA) erworben. Zielsequenzen waren folgende:

EGFR siRNA #1 (ID s563) sense 5'-GAAUAGGUUUGGUGAAUUt-3' und Antisense 5'-AAUUCACCAAUACCUAUUCcg-3'

EGFR siRNA #2 (ID s564) sense 5'-CCAUAAAUGCUACGAAUAUt-3' und antisense 5'-AUUUUCGUAGCAUUUAUGGag-3'

EGFR siRNA#3 (ID s565) sense 5'-GAUCUUUCCUUCUUAAGAtt-3' und antisense 5'-UCUUUAAGAAGGAAAGAUCat-3'.

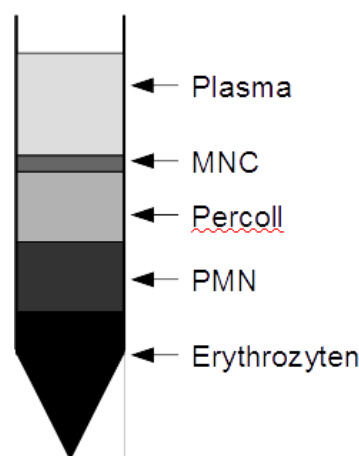
### **2.1.4 Isolierung humaner Leukozyten**

Für die Aufreinigung humaner Leukozyten erfolgte die Entnahme von venösem Blut aus den Cubitalvenen gesunder Spender. Die Spender wurden vor der ersten Blutentnahme ärztlich untersucht und haben schriftlich zugestimmt, dass ihr Blut zu Forschungszwecken verwendet werden darf.

Die humanen Leukozyten werden grob in zwei Fraktionen gegliedert, den mononukleären Zellen (MNC) und den polymorphnukleären Zellen (PMNs). Die MNC-Fraktion besteht aus den Lymphozyten, Monozyten und NK-Zellen. Zur

PMN-Fraktion gehören die neutro-, baso-, und eosinophilen Granulozyten. Durch eine Percoll-Dichtegradientenzentrifugation von Vollblut lassen sich beide Fraktionen voneinander trennen.

Zur Durchführung der Percoll-Dichtegradientenzentrifugation wurden in einem 15 ml Falcon 3 ml 70%-iges Percoll vorgelegt. Im Anschluss mit 3 ml 63%-igem Percoll überschichtet und auf diese 2 Phasen etwa 9 ml Citratblut zugegeben. Daraufhin erfolgte die Zentrifugation des Gradienten für 20 min bei 2500 rpm ohne Bremse. Danach bestand der fertige Gradient aus 5 Schichten (Abb. 2-1).



**Abb. 2-1 Graphische Darstellung des 5-schichtigen Percoll-Gradienten nach Zentrifugation.**

Zur Aufreinigung der MNC-Fraktion Entnahme der Schicht zwischen Plasma und Percoll mit einer Pipette und Überführung in ein 50 ml Falcon. Die MNC-Fraktion wurde dann mit 1 x PBS auf das Gesamtvolumen von 50 ml aufgefüllt und daraufhin für 5 min bei 1800 rpm zentrifugiert. Danach der Überstand verworfen, das Pellet aufgeklopft und erneut in 50 ml 1 x PBS resuspendiert. Eine weitere Zentrifugation folgte darauf. Der Überstand erneut verworfen, die mononukleären Zellen im Medium der Zielzellen aufgenommen und via Trypanblaufärbung auf einer Neubauer-Zählkammer unter dem Lichtmikroskop gezählt.

Eine weitere Anreicherung bestimmter Zellpopulationen konnte mit Hilfe der magnetisch aktivierten Zellsortierung (magnetic activated cell sorting, MACS) erreicht werden. Hierzu werden Zellen durch magnetische Kügelchen anhand ihrer Oberflächenantigene unterschiedlich markiert. Daraufhin kann mit dem



jeweiligen verwendeten Kit eine Positiv- oder Negativselektion durchgeführt werden. Die magnetisch markierten Zellen werden in speziellen MACS Säulen durch Magneten zurückgehalten, während die nicht markierten Zellen den Filter passieren und gesammelt werden können.

Für die Versuche wurden mittels dieser MACS Technologie aus der MNC-Fraktion sowohl Monozyten als auch NK-Zellen selektioniert. Die Anreicherung der NK-Zellen erfolgte durch Negativselektion mit dem NK cell Isolation Kit (Miltenyi Biotec GmbH) und die Anreicherung der Monozyten durch Negativselektion mit dem Monocyte Isolation Kit II von der gleichen Firma nach Herstellerprotokoll. Zur Aufreinigung der PMN-Fraktion wurde die Percoll-Schicht mittels Pipette durchstoßen und die darunterliegenden Schichten aus PMN und Erythrozyten entnommen. Die Zellsuspension in 5 ml auf 50 ml Falcons verteilt und dann mit 45 ml 1 x PBS aufgefüllt. Darauf folgte eine Zentrifugation bei 2000 rpm ohne Bremse. Der Überstand wurde vorsichtig abgekippt. In einem weiteren Schritt folgte die Lyse der Erythrozyten. Hierzu wurden die Zellen mit kaltem destilliertem Wasser auf 45 ml aufgefüllt, dreimal invertiert und für 30 s inkubiert. Danach 5 ml 10 x PBS zugegeben, die Lösung einmal invertiert und zentrifugiert. Der Überstand verworfen und die Erythrozyten-Lyse ein weiteres Mal wiederholt. Danach wurden auch die PMNs im Medium der Zielzellen aufgenommen und gezählt.

### **2.1.5 Zellzytotoxizitätstests**

Um die Fc-vermittelte Zytotoxizität von EGFR gerichteten Antikörpern auf die BHK-EGFR+ Zelllinien und auf die unterschiedlichen Tumorzelllinien quantitativ zu untersuchen, wurden Chromat-51[<sup>51</sup>Cr]-Freisetzungsanalysen durchgeführt.

Zellen sind in der Lage, [<sup>51</sup>Cr] über Ionenpumpen aufzunehmen und in ihrem Zytoplasma durch kovalente Bindung an zytoplasmatische Proteine zu akkumulieren.

Hierzu wurden jeweils  $0,6 \times 10^6$  Zielzellen mit 100 µl radioaktivem Isotop Na<sup>51</sup>-Chromat (5 mCi/ml) versetzt und für 2 h bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> in einem Brutschrank inkubiert. Währenddessen wurden die Effektorzellen und die zu untersuchenden Antikörper in 96-well-Mikrotiter-Platten vorgelegt. Nach

zweistündiger Inkubationszeit erfolgte dreimaliges Waschen der Zielzellen mit dem jeweiligen Zellkulturmedium. Anschließend wurden jeweils  $5 \times 10^3$  Zielzellen in die Vertiefungen der vorbereiteten Mikrotiter-Platten pipettiert und für weitere 3 h (PMNs, MNC, Plasma) bzw. 18 h (Monozyten) im Brutschrank bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> inkubiert. Um die Zellen zu pelletieren, erfolgte die Zentrifugation der Mikrotiter-Platten bei 2000 rpm für 5 min. Anschließend wurden 25 µl Überstand mit 125 µl OptiPhase SuperMix (Szintillationsmix, PerkinElmer) auf optisch aktiven 96-Well-Mikrotiter-Platten vermengt, für 15 min auf einem Orbitalschüttler geschüttelt und in einem Szintillationsmessgerät (1450 MircoBetaTriLux, PerkinElmer) analysiert. Danach Messen der Strahlung der [<sup>51</sup>Cr]-Radioisotopen, welche durch die lysierten Zielzellen in den Überstand freigesetzt wurden. Diese [<sup>51</sup>Cr]-Radioisotopenfreisetzung wurde in „counts per minute“ (cpm) gemessen. Die relative, spezifische Lyserate errechnete sich mit folgender Formel:

$$\% \text{ spezifische Lyse} = \frac{(\text{experimentelle cpm} - \text{basal cpm})}{(\text{maximal cpm} - \text{basal cpm})} \times 100.$$

Die maximale Freisetzung von [<sup>51</sup>Cr]-Radioisotopen und somit die vollständige Lyse der Zielzellen (=100%) wurde durch Zugabe von 2% TritonX in 1x PBS erreicht. Die Ermittlung der basalen Lyse erfolgte in Abwesenheit von Effektorquellen und Antikörpern. Eine unspezifische Lyse der Zielzellen durch die Effektorquellen ohne Antikörper konnte nicht beobachtet werden.

#### 2.1.5.1 Antikörper-abhängige zelluläre Zytotoxizität (*engl.* ADCC)

Um eine messbare Aktivität der jeweiligen Effektorzellen zu erreichen, wurden unterschiedliche EGFR-gerichtete Antikörper benutzt. Der EGFR-spezifische chimäre humane IgG1-Antikörper Cetuximab (C225, Merck; Darmstadt; GER) wurde in einer Konzentration von 2 µg/ml, sowohl für die NK-Zellen-vermittelte ADCC, als auch für die Monozyten-vermittelte ADCC eingesetzt. Für die PMN-vermittelte ADCC fiel die Wahl auf einen chimären humanen IgA2-Antikörper mit den variablen Regionen von Cetuximab (225-IgA2) mit einer Konzentration

von 10 µg/ml. Als Kontrolle diente ein unspezifischer humaner IgA2-Antikörper. Das Verhältnis der jeweiligen Effektorzellen zu den Zielzellen, die sogenannte „Effektor:Target-Ratio (E:T Ratio)“, ist in folgender Tabelle dargestellt (Tab. 2-2).

**Tab. 2-2 Verhältnis von Effektorzellen und Zielzellen.**

<b>Effektorzellen</b>	<b>E:T Ratio</b>
NK-Zellen	10:1
Monozyten	40:1
PMN	80:1

### **2.1.5.2 Komplement-abhängige Zytotoxizität (engl. CDC)**

Für die Durchführung der CDC wurde frisches Blutplasma (25% v/v) benutzt und mit 10 U/ml Heparin versetzt. Um auch hier eine messbare Aktivität zu erreichen, diente als Antikörper der CDC optimierte chimäre IgG1-Antikörper H425-E3 (H425-E3-IgG1: VL und VH-Regionen des humanisierten EGFR spezifischen IgG1-Antikörpers H425; Patent Cooperation Treaty Application WO 92/15683, (65)) mit einer Konzentration von 10 µg/ml. Dieser Antikörper erhöht die C1q-Bindung. Als Kontrolle wurde ein unspezifischer humaner Antikörper benutzt.

## **2.2 Biochemische Methoden**

### **2.2.1 Proteinextraktion**

Für die Proteinextraktion wurde 1 x Cell Lysis Buffer angesetzt. Dabei wurden 10 x Cell Lysis Buffer (CST Europe, Leiden, Niederlande) mit 1 x demineralisiertem Wasser (ddH<sub>2</sub>O) 1:10 verdünnt und 10 x Protease Inhibitor Cocktail (CST Europe, Leiden, Niederlande) dazugegeben. Pro Proteinlysate wurden die Zellpellets (1x10<sup>6</sup> Zellen) jeweils in 200 µl des angesetzten 1 x Cell Lysis Buffer in 1,5 ml Tubes resuspendiert und anschließend 5 min auf Eis inkubiert. Daraufhin kamen die Tubes jeweils dreimal für 10 s in ein Ultraschallbad. Nach Resuspendierung folgte die Zentrifugation der Tubes für 10 min mit 4000 rpm bei 4°C. Der Überstand wurde in neue 1,5 ml Tubes überführt und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Lagerung der Proben nach Herstellerangaben bei -80°C.

### **2.2.2 Bestimmung der Proteinkonzentration**

Die Bestimmung der Proteinkonzentration erfolgte mittels Bradford-protein-colorimetric-assay (BioRad, München) nach der Bradford-Methode.

In diesem Test ändert sich die Intensität der blauen Farbe in Anwesenheit von Proteinen proportional zu der Proteinkonzentration.

Für die Proteinstandards wurden 83,3 µl phospho EGFR Standard mit 416,7 µl IC Diulent #12 (1 x Cell Lysis Buffer und 10 % Glycerol ) angesetzt und in einer 1:2 Verdünnungsreihe bis zu 7 x verdünnt (0,16 mg/ml bis 0,0025 mg/ml phospho EGFR Standard). Die Proteinproben wurden ebenfalls 1:2 in destilliertem Wasser verdünnt. Zugabe von jeweils 100 µl der Proteinstandards und Proben in die nach Herstellerangaben (R&D Systems) vorbereiteten Mikrotiterplatten pro Well. Nach mehrmaligem Waschen mit Waschbuffer (0,05 % Tween20 in PBS) wurden 100 µl Detection Antikörper (1:180 in Reagent Diulent (0,05 % Tween20, 0,1 % BSA in sterilem PBS) verdünnt) zugefügt und nochmals nach Inkubation gewaschen. Anschließend wurden 100 µl Substrat Solution dazu pipettiert, die Platte mit Alufolie abgedunkelt, bis eine deutliche Blaufärbung der Standards erkennbar war, und inkubiert. Nach Zugabe von 50 µl Stop Solution (3M HCl) erfolgte das Messen der Platte im ELISA Plate Reader bei 492 nm (670 nm Referenz Wellenlänge) gemessen (TECAN „Sunrise“, Männedorf, CH).

### **2.2.3 Natriumdodecylsulfat (*engl.* SDS)- Polyacrylamidgelelektrophorese (PAGE)**

Mittels Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) wurden die Proteine entsprechend ihrer molekularen Masse aufgetrennt. Verdünnung der Proteinextrakte mit destilliertem Wasser auf eine Endkonzentration von 10µg Gesamtproteinextrakt pro 20µl. Nach Zugabe von 5µl 5x SDS Probenpuffer Kochen der Proben für 5 min bei 95°C und sofortiges Lagern auf Eis. Anschließend wurden 4-12% Bis/Tris-Gele (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) mit den Proben beladen und im ersten Schritt bei 15mA für 30 min mittels X Cell Sure Lock System (Invitrogen, Carlsbad, CA) laufen gelassen. In einem zweiten Schritt vollständiges Auftrennen der Proteinproben

bei 45mA. Danach wurden die Gele einem Elektrotransfer und einer Immundetektion von Protein unterzogen.

#### **2.2.4 Elektrotransfer und Immundetektion von Proteinen**

Nach der Auftrennung der Proteinproben mittels SDS-PAGE erfolgte das Übertragen der Proteine auf Polyvinyliden-Difluorid (PVDF) Membranen (Millipore, Billerica, MA) bei  $0,8\text{mA/cm}^2$  für 1,5 h. Nach dem Blockieren für 1 h mit 5% (w/v) Magermilchpulver in TTBS wurden die Membranen mit einem EGFR-spezifischen Primärantikörper (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA) über Nacht bei  $4^\circ\text{C}$  markiert, anschließend gewaschen und mit HRP-konjugiertem IgG als Sekundärantikörper für 1 h bei Raumtemperatur inkubiert. Nach weiteren Waschschrritten wurden die Proteine mittels Chemilumineszenz (ECL, Thermo Fisher Scientific, IL) sichtbar gemacht. Als Beladungskontrolle der Gele erfolgte die Markierung der Membrane mit einem  $\beta$ -Aktin-spezifischen Antikörper (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) und eine Wiederholung der Analyse.

#### **2.2.5 ELISA**

Der Phosphorylierungsstatus der EGF-Rezeptoren auf den BHK-EGFR+ Zelllinien #1, #2, #3, #4, #5 und #6 wurde mit Hilfe eines spezifischen Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA, R&D Systems, Minneapolis, MN) untersucht.

Der ELISA gehört zu den enzymatischen Immunsorptionsverfahren. Beim durchgeführten Assay handelt es sich um einen „Sandwich“-ELISA, bei dem das nachzuweisende Antigen (EGFR) über einen Erstantikörper an eine Mikrotiterplatte gebunden und angereichert wird. Anschließend führt ein Enzymgekoppelter Detektionsantikörper zu einer enzymatischen Farbreaktion.

Es folgte die Zählung der BHK-EGFR + Zelllinien #1, #2, #3, #4, #5, #6 und die Überführung von  $0,8 \times 10^6$  Zellen pro Well in eine 6-Well-Platte. Als Erstantikörper wurde der EGFR-spezifische Antikörper Cetuximab (Erbix®, Merck, Darmstadt) benutzt. Die Zellen wurden für 10 min mit Cetuximab inkubiert oder blieben unbehandelt. Daraufhin Stimulierung der Zellen für 1 h mit 100 ng/ml rekombinanten humanen epidermalen Wachstumsfaktor (EGF). Anschließend wurden sie mit eiskalter PBS-Lösung gewaschen und zu Pellets

zentrifugiert. Die Auflösung der Zellpellets erfolgte dann in einem Lyse-Buffer (CST, Danvers, MA). Anschließend Durchführung des Phosphorylierungsstatus durch den ELISA nach Protokoll des Herstellers (R&D Systems, Minneapolis, MN). Die maximale relative Phosphorylierung der EGF-Rezeptoren wurde gleich 100% gesetzt und für jede BHK-EGFR+ Zelllinie eine Cetuximab konzentrationsabhängige Dosis-Wirkungskurve für die Hemmung der Phosphorylierung von EGF-Rezeptoren konstruiert (Abb. 3-2B-G). Als Kontrolle wurde der Versuch ohne Beisein von EGF wiederholt. Anschließend erfolgte die Bestimmung der mittleren effektiven Konzentration ( $EC_{50}$ ), bei der die Hälfte der Phosphorylierung aller EGF-Rezeptoren gehemmt wurde.

## **2.2.6 Durchflusszytometrische Analysen**

### **2.2.6.1 Direkte und indirekte Durchflusszytometrie**

Die Durchflusszytometrie ist ein Verfahren zur Analyse von Zellen anhand physischer und/oder chemischer Eigenschaften. Um die zellulären Oberflächenantigene mittels Durchflusszytometrie nachzuweisen, nutzt man die Methoden der direkten oder der indirekten Immunfluoreszenz. Bei der direkten Immunfluoreszenz wird mithilfe eines spezifischen Fluorochrom-gekoppelten Antikörpers das zu untersuchende Antigen markiert. Bei der indirekten Immunfluoreszenz werden ein Primär- und ein Fluorochrom-gekoppelter Sekundärkörper eingesetzt. Im Durchflusszytometer werden die behandelten Zellen an einem Vorwärtsstreulicht und einem Seitwärtsstreulicht einzeln und in hohem Tempo vorbeigeführt. Dadurch wird die Größe und Granularität bestimmt und durch die Fluorochrom-gekoppelten Antikörper zusätzlich die Fluoreszenz ermittelt.

Bei der indirekten Immunfluoreszenz wurden jeweils  $1 \times 10^5$  Zellen mit dem EGFR spezifischen murinen Antikörper m425 (Endkonzentration 50  $\mu\text{g/ml}$ ) in FACS-Puffer (1x PBS, 0,5% bovines Serumalbumin und 0,1% Natriumazid) für 30 min auf Eis inkubiert. Danach wurden die Zellen mit kaltem FACS-Puffer gewaschen und bei 1800 rpm bei 4°C für 3 min zentrifugiert, um nicht gebundene Antikörper zu entfernen. Dreimaliges Wiederholen dieses Waschschrilles. Im Anschluss wurden die Zellen mit einem FITC-gekoppelten

Antikörper (anti-mouse IgG-FITC) auf Eis für weitere 30 min inkubiert und erneut dreimal gewaschen.

### **2.2.6.2 Kalibrierte Durchflusszytometrie**

Um quantitativ die EGFR Expressionsdichte auf der Zelloberfläche zu bestimmen, wurde das Qifikit<sup>®</sup> (DAKO Deutschland GmbH, Hamburg) entsprechend der Anleitung des Herstellers verwendet. Dann erfolgte die Messung der Zellen in einem Durchflusszytometer (Epics Profile; Beckman Coulter, Fullerton, CA). Als Kontrolle diente ein unspezifischer muriner Antikörper. Für die Berechnung der relativen Fluoreszenzintensität (RFI) wurde folgende Formel herangezogen:

$$RFI = \frac{DFI\ EGFR - Antikörper}{DFI\ Kontrollantikörper}$$

*(Relative Fluoreszenzintensität (RFI), Durchschnittsfluoreszenzintensität (DFI))*

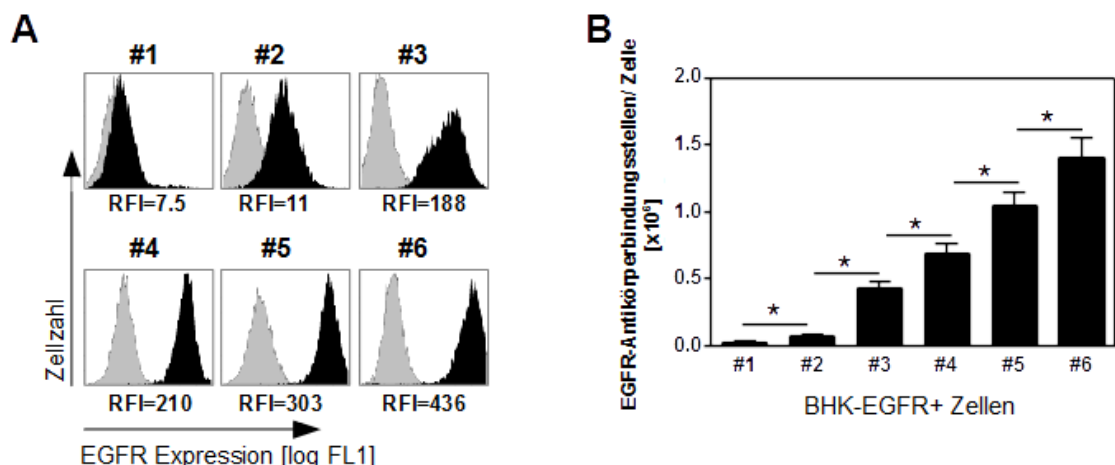
### **2.3 Statistische Auswertung**

Für die graphische Darstellung und die statistische Auswertung der Daten wurde die Software Prism<sup>®</sup> 4.0 (GraphPad Software Inc., CA. USA) verwendet. Hierbei Darstellen der Kurven unter Verwendung eines nichtlinearen Regressionsmodells mit sigmoidaler Dosis-Wirkungs-Kurve (variabel). Die Bestimmung der statistischen Signifikanz erfolgte durch den ANOVA Wiederholungsmessungs-Test mit dem Bonferroni-Post-Test. Die Ergebnisse wurden aus Mittelwert +/- Standardfehler des Mittelwerts (SEM) anhand von mindestens drei unabhängigen Experimenten dargestellt. Korrelationen zwischen EGFR Antikörperbindungsstellen pro Zelle und der zytotoxischen Aktivität wurde mittels Pearson Korrelations-Test festgestellt. Als statistisch signifikant galten Ergebnisse mit einem \*p-Wert < 0,05.

### 3 Ergebnisse

#### 3.1 Generierung der BHK-EGFR+ Zelllinien

Um eine systematische Untersuchung für den Einfluss der EGFR Expressionsdichte auf die EGFR-gerichtete Antikörper-abhängige Zytotoxizität durchzuführen, wurden Zielzellen benötigt, die unterschiedliche EGFR Zelloberflächenexpressionslevel aufwiesen. Hierzu wurde die BHK-21 (baby hamster kidney) Zelllinie stabil mit einem humanen EGFR-kodierenden Plasmid (pUSE-EGFR, Upstate Biotechnology) transfiziert und anschließend die stabilen Transfektanten mit Hilfe der MACS Methode (siehe Material und Methoden) anhand der EGFR Expressionsdichte sortiert. Aus den BHK-EGFR+ Zelllinien wurden dann anhand der EGFR Zelloberflächenexpression sechs Zelllinien ausgewählt und diese aufsteigend der EGFR Expressionsdichte von #1 bis #6 nummeriert. Die genaue EGFR Expressionsdichte wurde mittels der indirekten Immunfluoreszenz und der kalibrierten Durchflusszytometrie ermittelt (Abb. 3-1A, 3-1B). Dabei konnten Werte von  $0,03 \times 10^6$  EGFR Antikörperbindungsstellen pro Zelle (BHK-EGFR+ Zelllinie #1) aufsteigend bis  $1,4 \times 10^6$  EGFR Antikörperbindungsstellen pro Zelle (BHK-EGFR+ Zelllinie #6) festgestellt werden. Als Kontrolle zeigte eine nicht mit humanem EGFR-transfizierte BHK-21 Zelllinie keine messbare EGFR Antikörperbindung.



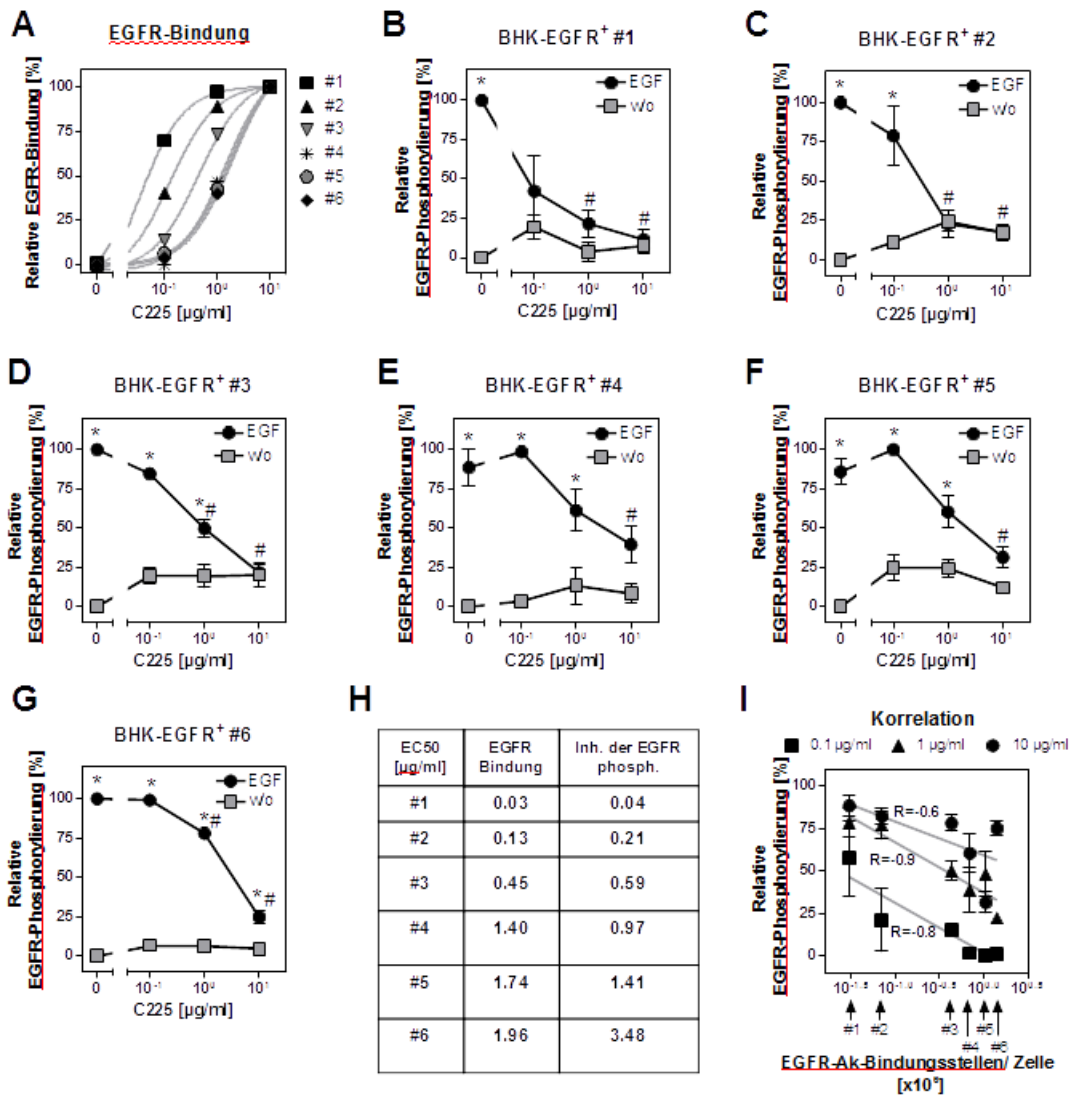
**Abb. 3-1 Generierung von BHK-21 Zelllinien mit ansteigender EGFR Zelloberflächenexpression.** BHK-21 Zelllinien wurden mit einem EGFR kodierendem Plasmid transfiziert. Sechs BHK-EGFR+ Zelllinien sind dargestellt. **A** Die EGFR Zelloberflächenexpression wurde durch indirekte Immunfluoreszenz untersucht und durch **(B)** kalibrierte



Immunfluoreszenzanalysen quantifiziert. Ein exemplarisches von vier Experimenten ist abgebildet (A). Die Ergebnisse wurden aus Mittelwert +/- Standardfehler des Mittelwerts (SEM) anhand von mindestens drei unabhängigen Experimenten dargestellt (B). \*=statistisch signifikant.

### 3.1.1 Charakterisierung Fab-vermittelter Wirkmechanismen

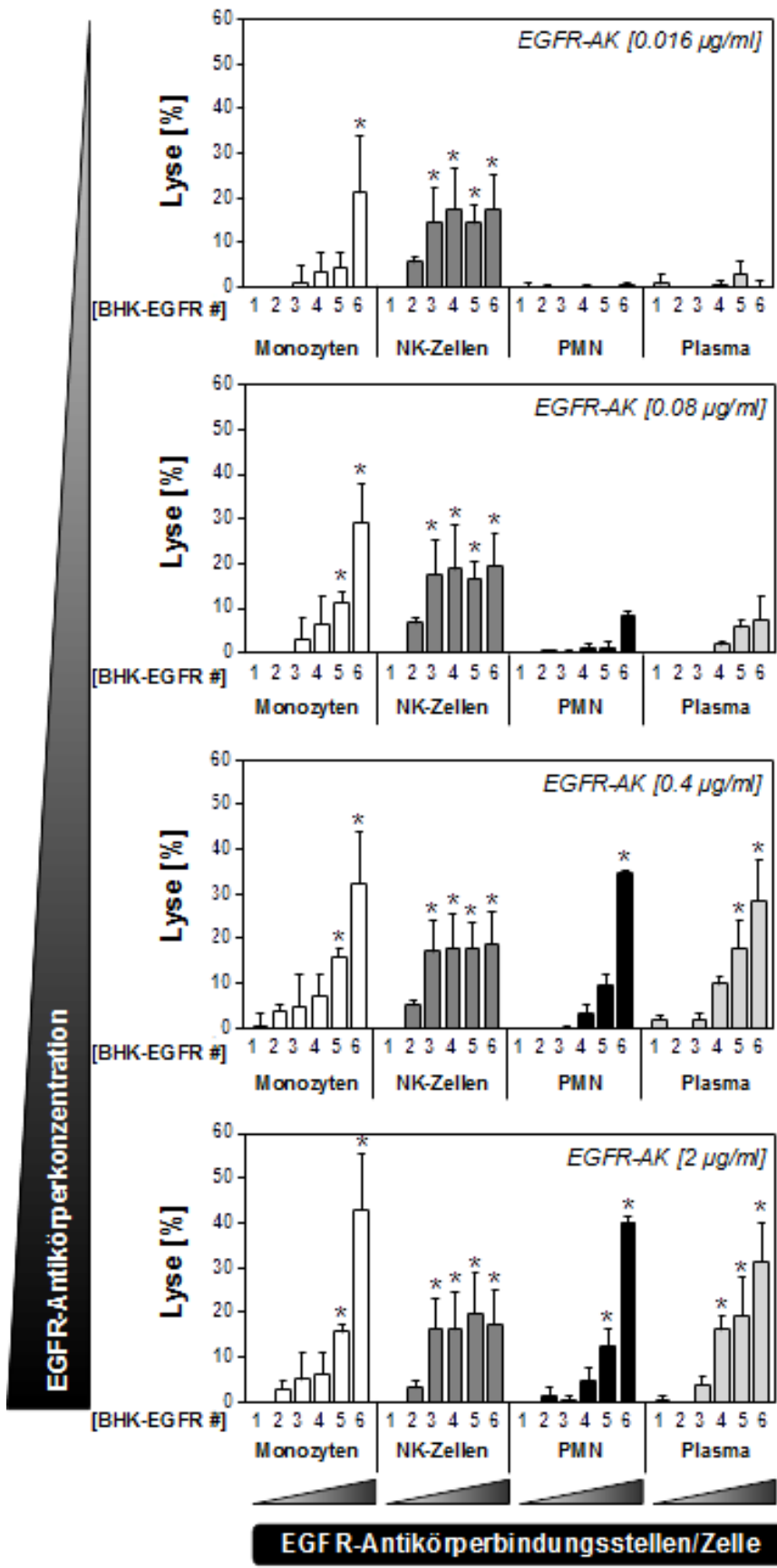
In diesem Schritt sollten die Fab-vermittelten Wirkmechanismen des EGFR Antikörpers näher betrachtet werden. Zur Ermittlung des Einflusses der EGFR Zelloberflächenexpressionslevel auf die Fab-vermittelten Wirkmechanismen von Cetuximab wurden die generierten BHK-EGFR+ Zelllinien #1 bis #6 auf die konzentrationsabhängige Antikörperbindung von Cetuximab und die EGF induzierte Phosphorylierung des EGF-Rezeptors durch Cetuximab untersucht und die Ergebnisse miteinander verglichen. Zuerst wurden die BHK-Zelllinien #1 bis #6 zusammen mit dem Antikörper Cetuximab (C225) in aufsteigender Konzentration inkubiert und nach Färbung im Durchflusszytometer untersucht. Anschließend konnte mittels der RFI die relative Bindung an den EGF-Rezeptoren für die jeweilige BHK-EGFR+ Zelllinie #1 bis #6 ermittelt werden (Abb. 3-2A). Anhand dieser Kurve erfolgte die Bestimmung der mittleren effektiven Konzentration ( $EC_{50}$ ) für die BHK-EGFR + Zelllinien #1 bis #6. Diese repräsentiert die Konzentration, bei der die Hälfte der EGF-Rezeptoren an der Zelloberfläche durch Cetuximab (C225) besetzt ist. Dabei ergaben sich die niedrigsten  $EC_{50}$ -Werte von 0.03  $\mu\text{g/ml}$  für die BHK-EGFR+ Zelllinie #1, aufsteigend bis zu den höchsten  $EC_{50}$ -Werten von 1.96  $\mu\text{g/ml}$  für die BHK-EGFR + Zelllinie #6 (Abb. 3-2H). Anschließend erfolgte die Ermittlung der Hemmung der EGF induzierten Phosphorylierung der EGF-Rezeptoren durch Cetuximab mittels ELISA (Abb. 3-2B-G). Dabei zeigten sich die niedrigsten  $EC_{50}$ -Werte von 0.04  $\mu\text{g/ml}$  für die BHK-EGFR + Zelllinie #1, aufsteigend bis zu den höchsten  $EC_{50}$ -Werten von 3.48  $\mu\text{g/ml}$  für die BHK-EGFR + Zelllinie #6 (Abb. 3-2H). Die Ergebnisse der Untersuchungen wurden miteinander verglichen. Dabei konnte eine konzentrationsabhängige Hemmung der Phosphorylierung der EGF-Rezeptoren durch Cetuximab auf allen sechs BHK-EGFR+ Zelllinien beobachtet werden, welche sich in einer negativen Korrelation zwischen den EGFR Antikörperbindungsstellen pro Zelle und der Fähigkeit der Hemmung der Phosphorylierung der EGF-Rezeptoren widerspiegelt ( $R_{0.1 \mu\text{g/ml C225}} = -0,8$ ,  $R_{1 \mu\text{g/ml C225}} = -0,9$ ,  $R_{10 \mu\text{g/ml C225}} = -0,6$ ; Abb. 3-2I).



**Abb.3-2 Fab-vermittelte Wirkmechanismen sind effektiver gegen Zellen, die wenig EGFR auf der Oberfläche exprimieren.** (A) Dosis-abhängige Kurven für C225 in den angegebenen Konzentrationen wurden durch indirekte Immunfluoreszenz der BHK-EGFR+ Zellen #1 bis #6 untersucht. Die maximale RFI wurde für die BHK-EGFR+ Zelllinie #6 auf 100% gleichgesetzt und damit die relative Bindung an den EGFR für alle sechs BHK-EGFR+ Zelllinien ermittelt. (B-G) Die Hemmung der EGF-induzierten Phosphorylierung der humanen EGF-Rezeptoren der BHK-EGFR+ Zellen #1 bis #6 durch C225 mit den angegebenen Konzentrationen wurde durch den EGFR (Tyr1068)-spezifischen ELISA untersucht. (H) Die EC<sub>50</sub>-Werte (µg/ml) für die untersuchten BHK-EGFR + Zelllinien wurden aus den in (A)-(G) dargestellten Daten ermittelt. (I) Die Korrelation zwischen EGFR Antikörperbindungsstellen pro Zelle und Cetuximab (C225)-vermittelter Hemmung der EGF-induzierten EGFR Phosphorylierung wurde für alle sechs BHK-EGFR + Zelllinien in den Konzentrationen von 0,1µg/ml, 1µg/ml und 10 µg/ml Cetuximab berechnet. \*=statistisch signifikant

### 3.1.2 Charakterisierung Fc-vermittelter Mechanismen

Nachdem zuvor die direkten, Fab-vermittelten Wirkmechanismen untersucht wurden, folgten im nächsten Schritt die indirekten, Fc-vermittelten Wirkmechanismen, welche durch [<sup>51</sup>Cr]-Zytotoxizitätstests, wie ADCC und CDC, untersucht wurden. Als Effektorquellen dienten aus dem Blut gesunder Spender frisch isolierte Monozyten, NK-Zellen, PMN-Zellen und frisches Plasma. Es zeigte sich, dass die höchste Zytotoxizitätsaktivität gegen die BHK-EGFR+ Zelllinie #6 mit der höchsten EGFR Expressionsdichte erreicht wurde (Abb. 3-3). Dazu passend wurde außerdem beobachtet, dass bei der BHK-EGFR + Zelllinie #1, die Zelllinie mit der niedrigsten EGFR Expression an ihrer Oberfläche, praktisch keine Zytotoxizitätsaktivität gemessen werden konnte. Mit Ausnahme der NK-Zellen, welche bereits die maximale Zytotoxizitätsaktivität ab der BHK-EGFR+ Zelllinie #3 erreichten, war die Zytotoxizitätsaktivität, vermittelt durch Monozyten, PMN- und dem Komplement-System, abhängig von den EGFR Antikörperbindungsstellen pro Zelle. Also benötigten die Monozyten, die PMNs und das Komplement-System mehr EGFR Antikörperbindungsstellen pro Zelle im Vergleich zu den NK-Zellen. Somit resultierte nur eine mangelnde Zytotoxizitätsaktivität, sowohl gegen die BHK-EGFR+ Zelllinien #1 und #2, als auch im Falle der PMNs gegen die BHK-EGFR+ Zelllinie #3 (Abb. 3-3). Darüber hinaus zeigte sich eine Abhängigkeit der PMN- und Komplement-vermittelten Zytotoxizitätsaktivität auf die Antikörperkonzentration. Bei Antikörperkonzentrationen unter 0,016 µg/ml konnte keine Wirkung beobachtet werden. Im Gegensatz dazu erreichte die NK-Zellen-vermittelte Zytotoxizitätsaktivität schon die maximale Lyse bei niedrigen Antikörperkonzentrationen von 0,016 µg/ml. Bei Durchführung der [<sup>51</sup>Cr]-Zytotoxizitätstests ohne Effektorquellen konnten durch alleinige Gabe von Antikörpern keine direkten Effekte beobachtet werden.

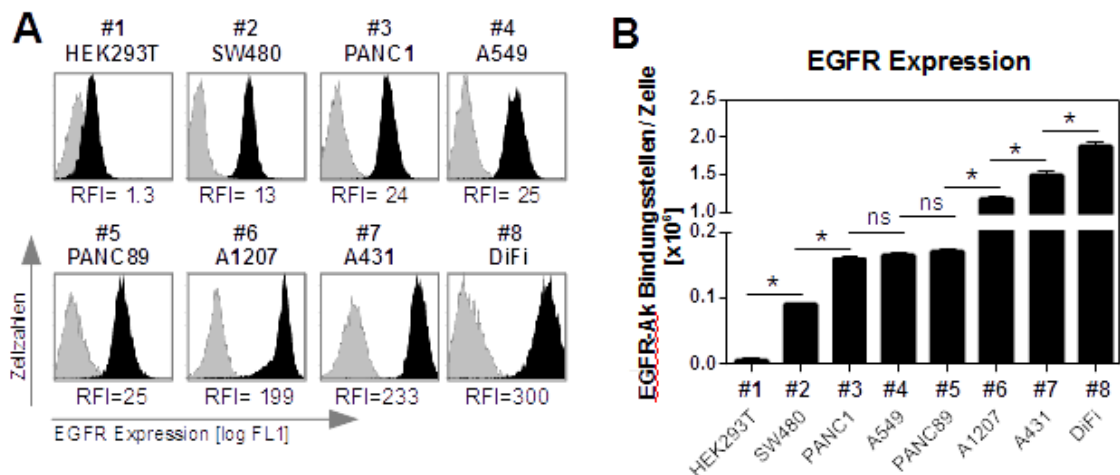


**Abb. 3-3 Darstellung der [<sup>51</sup>Cr]-Zytotoxizitätstests ADCC und CDC mit BHK-EGFR+ Zelllinien #1 bis #6.** In den Zytotoxizitätstests wurden die BHK-EGFR+ Zelllinien in Ab- oder Anwesenheit von EGFR-gerichteten Antikörpern in ansteigenden Konzentrationen und mit unterschiedlichen Effektorquellen, wie NK-Zellen, Monozyten, PMNs oder Plasma, inkubiert. Die Ergebnisse wurden in Abhängigkeit der zunehmenden EGFR Antikörperbindungsstellen pro Zelle und der ansteigenden Antikörperkonzentrationen von 0,016 µg/ml, 0,08 µg/ml, 0,4 µg/ml und 2,0 µg/ml analysiert. Die Ergebnisse wurden aus Mittelwert +/- Standardfehler des Mittelwerts (SEM) aus mindestens drei unabhängigen Experimenten dargestellt. Korrelationen zwischen EGFR Antikörperbindungsstellen pro Zelle und der zytotoxischen Aktivität wurde mittels Pearson Korrelations-Test festgestellt. Als statistisch signifikant galten Ergebnisse mit einem \*p-Wert <0,05.

## **3.2 Verifizierung auf humanen Tumorzelllinien**

### **3.2.1 Auswahl und Charakterisierung der humanen Tumorzelllinien**

Anschließend wurde analysiert, ob die Ergebnisse, welche wir mit den BHK-EGFR+ Zellklonen erhalten hatten, auf humane Zelllinien mit unterschiedlich genetischen Eigenschaften übertragen werden können. Dafür wurden acht verschiedene humane Tumorzelllinien miteinander verglichen und in Anbetracht ihrer EGFR Zelloberflächenexpressionsdichte sortiert. Die EGFR Zelloberflächenexpressionslevel der humanen Tumorzelllinien wurden mittels indirekter Immunfluoreszenz ermittelt (Abb. 3-4 A). Für die weiteren Versuche wurden die folgenden humanen Tumorzelllinien nach aufsteigender Reihenfolge anhand der EGFR Oberflächenexpression ausgewählt: HEK293T, SW480, PANC1, A549, PANC89, A1207, A432 und DiFi. Mittels quantitativer Immunfluoreszenz wurden die Werte der EGFR Antikörperbindungsstellen pro Zelle ermittelt. Diese reichen von  $0,01 \times 10^6$  EGFR Antikörperbindungsstellen pro Zelle für die HEK293T Zelllinie bis  $1,89 \times 10^6$  EGFR Antikörperbindungsstellen pro Zelle für die DiFi Zelllinie (Abb. 3-4B).

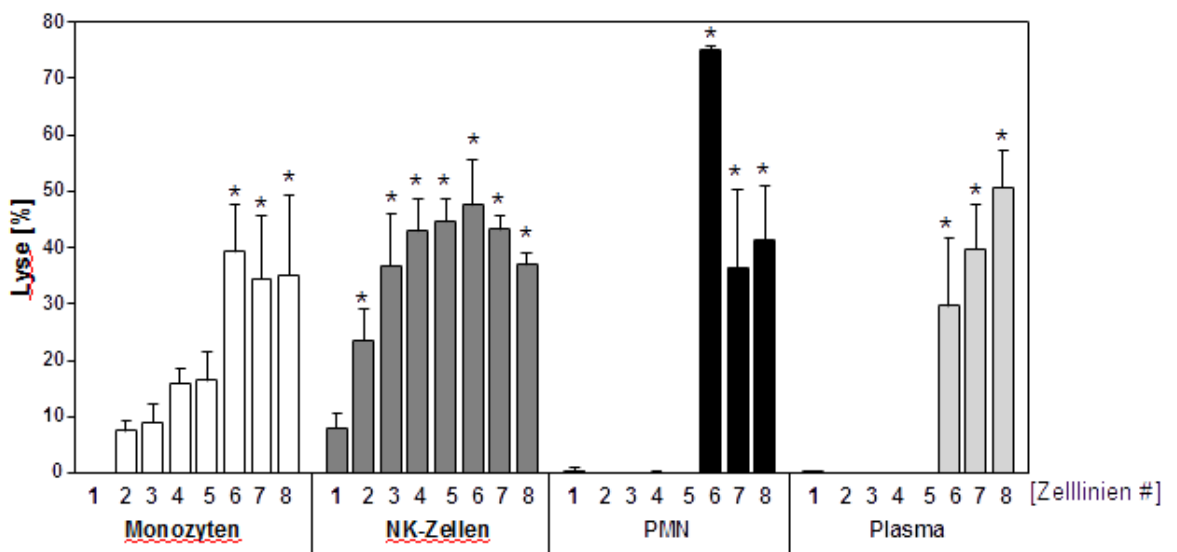


**Abb. 3-4 Humane Tumorzelllinien mit ansteigender EGFR Zelloberflächenexpression.** Eine Reihe von unterschiedlichen Tumorzelllinien (außer HEK293T) wurde anhand unterschiedlicher EGFR Zelloberflächenexpressionslevel ausgewählt, durch indirekte Immunfluoreszenz (A) untersucht und durch kalibrierte Durchflusszytometrie (B) quantifiziert. Ein exemplarisches von vier Experimenten ist abgebildet (A). Die Ergebnisse wurden aus Mittelwert +/- Standardfehler des Mittelwerts (SEM) anhand von mindestens drei unabhängigen Experimenten dargestellt (B). \*=statistisch signifikant, ns= nicht statistisch signifikant.

### 3.2.2 Charakterisierung Fc-vermittelter Mechanismen

Um die Ergebnisse der Fc-vermittelten Zytotoxizität der BHK-EGFR+ Zelllinien vergleichen zu können, wurden [ $^{51}\text{Cr}$ ]-Zytotoxizitätstests mit humanen Tumorzelllinien durchgeführt. Als Effektorquellen dienten NK-Zellen, Monozyten, PMNs und humanes Plasma. Die durchgeführten Zytotoxizitätstests zeigten im Falle der NK-Zellen-vermittelten Zytotoxizität eine Zelledestruktion bei allen Tumorzelllinien (Abb. 3-5). Auch wurde bereits die maximale Zytotoxizitätsaktivität bei ca.  $0,16 \times 10^6$  EGFR Antikörperbindungsstellen pro Zelle (PANC1 Zelllinie) erreicht. Ähnlich dazu zeigte die Monozyten-vermittelte Zytotoxizität eine ansteigende Aktivität ab der Anzahl von  $0,08 \times 10^6$  EGFR Antikörperbindungsstellen pro Zelle (SW480 Zelllinie) und erreichte ihre maximale Zytotoxizitätsaktivität bei  $1,51 \times 10^6$  EGFR Antikörperbindungsstellen pro Zelle (A1207 Zelllinie)(Abb. 3-5). Jedoch konnte keine messbare Aktivität der Monozyten-vermittelten Zytotoxizität gegen die HEK293T Zelllinie im Vergleich zu der NK-Zellen-vermittelten Zytotoxizität gemessen werden. Ganz im Gegensatz dazu wurde beobachtet, dass die PMN- und Komplement-vermittelte Zytotoxizität gegen die Tumorzelllinien (außer den HEK293T

Zelllinien) stark von der Anzahl der EGFR Oberflächenexpression abhängig ist. Dabei konnte eine Schwelle für eine messbare zytotoxische Aktivität auf etwa  $1 \times 10^6$  EGFR Antikörperbindungsstellen pro Zelle ermittelt werden (Abb. 3-5). Diese hohe Anzahl erreichten nur die Tumorzelllinien A1207 ( $1,19 \times 10^6$  EGFR Antikörperbindungsstellen pro Zelle), A431 ( $1,51 \times 10^6$  EGFR Antikörperbindungsstellen pro Zelle) und DiFi ( $1,89 \times 10^6$  EGFR Antikörperbindungsstellen pro Zelle).



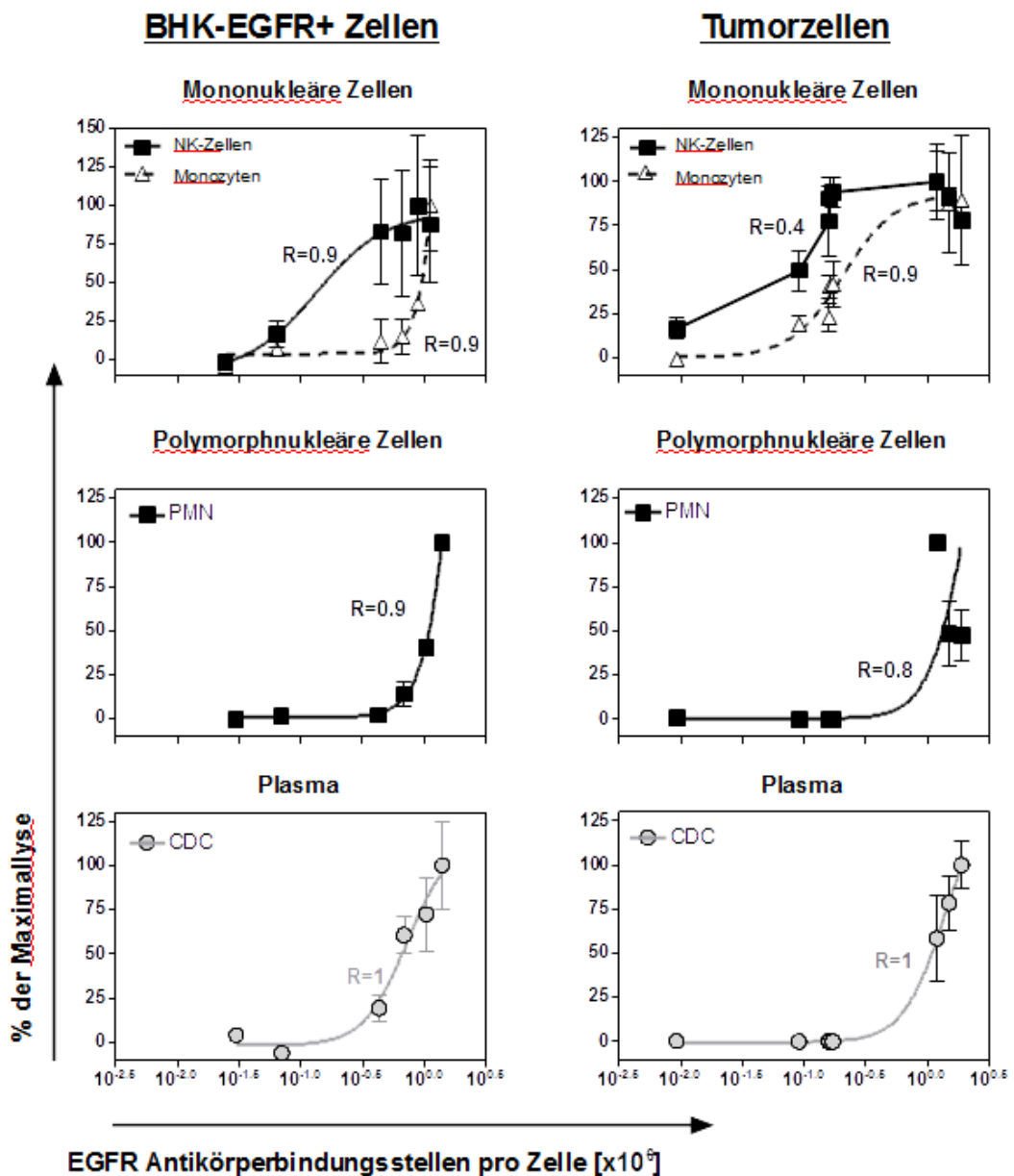
**Abb. 3-5 EGFR Antikörper-abhängige Zytotoxizität gegen unterschiedliche Tumorzelllinien korreliert positiv mit der EGFR Expressionsdichte.** EGFR Antikörper-abhängige Zytotoxizität gegen diese Zelllinien, vermittelt durch unterschiedliche Effektorquellen, wie MNC-Zellen ( $2\mu\text{g/ml}$  C225-IgG1-Ak; E:T-Ratio 40:1), Monozyten ( $2\mu\text{g/ml}$  C225-IgG1-Ak, E:T-Ratio 40:1), NK-Zellen ( $2\mu\text{g/ml}$  C225-IgG1-Ak, E:T-Ratio 10:1), PMN ( $10\mu\text{g/ml}$  C225-IgG2-Ak; E:T-Ratio 40:1) und humanes Plasma ( $10\mu\text{g/ml}$  H425-E3-IgG1-Ak), wurde in Zytotoxizitätstests untersucht. #1= HEK294T, #2=SW480, #3=PANC1, #4=A549, #5=PANC89, #6=A1207, #7=A431, #8=DiFi. Die Ergebnisse wurden aus Mittelwert +/- Standardfehler des Mittelwerts (SEM) anhand von mindestens drei unabhängigen Experimenten dargestellt. Korrelationen zwischen EGFR Antikörperbindungsstellen pro Zelle und der zytotoxischen Aktivität wurde mittels Pearson Korrelations-Test festgestellt. Als statistisch signifikant galten Ergebnisse mit einem \*p-Wert  $<0,05$ .

### 3.2.3 Korrelation

Um zu bestimmen, ob das Ausmaß der zytotoxischen Aktivität mit der Anzahl der EGFR Antikörperbindungsstellen pro Zelle in einem Zusammenhang steht, wurden Korrelationskoeffizienten (R) zwischen beiden Faktoren, sowohl für die

BHK-EGFR+ Zelllinien, als auch für die analysierten Tumorzelllinien berechnet. Die Korrelation wurde für jede Effektorquelle bei der höchsten Antikörperkonzentration berechnet. Die gemessene zytotoxische Aktivität gegen die BHK-EGFR+ Zelllinie #6 (Abb. 3-6, linke Seite) oder gegen die DiFi Zellen (Abb. 3-6, rechte Seite) wurde als maximale Lyse angesehen und gleich 100% gesetzt. Die gemessenen Werte der zytotoxischen Aktivität der anderen BHK-EGFR+ Zelllinien und der Tumorzelllinien beziehen sich darauf. Im Falle der BHK-EGFR+ Zelllinien wurde eine statistisch signifikante positive Korrelation zwischen der Anzahl der EGFR Antikörperbindungsstellen pro Zelle und der zytotoxischen Aktivität in Gegenwart von allen untersuchten Abwehrquellen, wie den NK-Zellen ( $R=0,9$ ), den Monozyten ( $R=0,9$ ), den PMN ( $R=0,9$ ) und dem Plasma ( $R=1$ ), beobachtet (Abb. 3-6). Auch zeigten die untersuchten Tumorzelllinien eine statistisch signifikante positive Korrelation zwischen EGFR Antikörperbindungsstellen pro Zelle und der Antikörper-abhängigen zytotoxischen Aktivität für Monozyten ( $R=0,9$ ), PMNs ( $R=0,8$ ) und Plasma ( $R=1$ ). Interessanterweise wurde jedoch keine signifikante Korrelation zwischen der Antikörper-abhängigen zellulären Zytotoxizität für NK-Zellen ( $R=0,4$ ) und der Anzahl der EGFR Antikörperbindungsstellen pro Zelle beobachtet (Abb. 3-6).



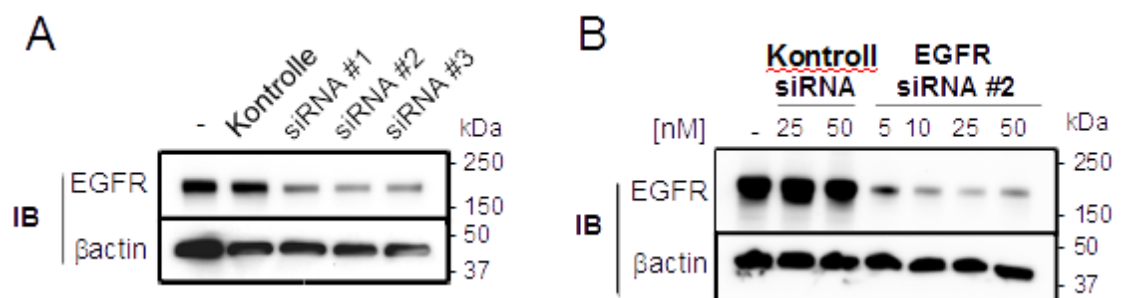


**Abb. 3-6: Antikörper-abhängige zelluläre Zytotoxizität korreliert positiv mit der Menge der EGFR Zelloberflächenexpression.** Korrelation zwischen der Anzahl der EGFR Zelloberflächenexpression und der EGFR Antikörper-abhängigen zytotoxischen Aktivität wurde für jede Abwehrquelle durch Gleichsetzen der zytotoxischen Aktivität gegen BHK-EGFR + #6 (linke Seite) und DiFi Zellen (rechte Seite) mit der höchsten Antikörperkonzentration auf 100 % (maximale Lyse) berechnet. Die Maximallyse wurde im Zusammenhang mit der zytotoxischen Aktivität für alle BHK-EGFR+ Zelllinien oder Tumorzelllinien (angegeben durch verschiedene Symbole) bei der höchsten Antikörperkonzentration gemessen. Die Ergebnisse wurden aus Mittelwert +/- Standardfehler des Mittelwerts (SEM) anhand von mindestens drei unabhängigen Experimenten dargestellt.

### 3.3 EGFR-spezifische siRNA-induzierte EGFR Herunterregulierung

#### 3.3.1 Effizienzanalyse EGFR-spezifischer siRNA

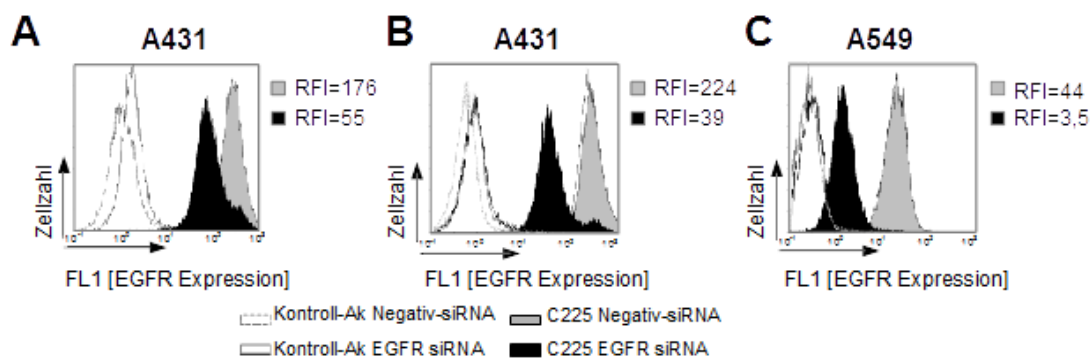
Die folgende Versuchsreihe untersuchte, ob eine EGFR-spezifische siRNA-induzierte Herunterregulierung der EGFR Zelloberflächenexpression auch zu einer verminderten Antikörper-induzierten Tumorzelllyse durch körpereigene Effektorquellen führt. Für die Untersuchung diente die Antikörper-abhängige zelluläre Zytotoxizität, vermittelt sowohl durch mononukleäre Zellen (MNC), als auch durch polymorphnukleäre Zellen (PMN) und die Komplementsystem-abhängige Zytotoxizität, vermittelt durch Plasma. Für eine optimale Herunterregulierung der EGFR Expression wurden zunächst drei verschiedene EGFR-spezifische siRNAs für die Transfektion verwendet. Nach der Transfektion wurde die Herunterregulierung der EGFR-mRNA-Expression der A431 Zelllinien mittels SDS-PAGE und Immundetektion dargestellt (Abb. 3-7A). Für die weiteren Experimente wurde die EGFR-spezifische siRNA #2 ausgewählt, welche im Vergleich zu den anderen EGFR-spezifischen siRNAs die effektivste Transfektion erreichte. A431 Zellen wurden erneut mit Kontroll-siRNA und EGFR-spezifischer siRNA #2 transfiziert. Die anschließend durchgeführte SDS-Page und Immundetektion zeigte, dass bei jeder Konzentration der siRNA #2 eine Herunterregulierung der EGFR Expressionsgene stattfand. Die wirksamste Transfektion der A431 Zellen fand mit 25 nM der EGFR-spezifischen siRNA #2 für 72 h statt (Abb.3-7B).



**Abb.3-7 Transfektion von EGFR-spezifischer siRNA auf A431 Zelllinien führt zu einer Herunterregulierung der EGFR-mRNA-Expression.** **A** A431 Zellen wurden jeweils mit 25 nM Kontroll-siRNA, siRNA #1, siRNA#2 und siRNA#3 für 48 h transfiziert und anschließend durch SDS-PAGE mit Elektrotransfer und Immundetektion gegen EGFR und beta-Aktin dargestellt. Beta-Aktin diente als Kontrolle. **B** Anschließend wurden A431 Zellen mit ansteigenden

Konzentrationen (5-50nM) von Kontroll-siRNA und EGFR-spezifischer siRNA #2 für 72 h transfiziert. Effektivste Transfektion erfolgte durch 25 nM EGFR-spezifischer siRNA #2 für 72 h.

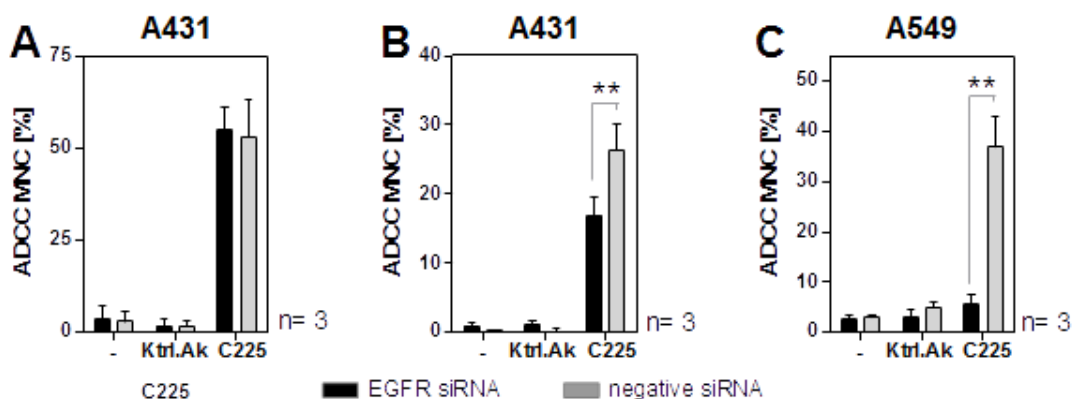
Zur Ermittlung der genauen EGFR Zelloberflächenexpression wurden erneut die A431 Zelllinien mit EGFR-spezifischer siRNA #2 für 48 h und für 72 h transfiziert. Zusätzlich wurden als Kontrollzelllinie A549 Zellen, welche eine bis zu 10fache niedrigere EGFR Expressionsdichte an der Zelloberfläche im Vergleich zu den A431 Zelllinien aufweisen, für 72 h mit EGFR-spezifischer siRNA #2 transfiziert. Nach der Transfektion erfolgte die Bestimmung der EGFR Expressionsdichte mittels indirekter Immunfluoreszenz. Dabei zeigte sich bei den mit EGFR-spezifischen siRNA #2 transfizierten A431 Zellen eine signifikante Reduzierung der EGFR Zelloberflächenexpressionsdichte von bis zu 70% (Transfektionszeit 48 h) mit einer RFI von 55 und bis zu 90% (Transfektionszeit 72 h) mit einer RFI von 39, im Vergleich zu den mit Kontroll-siRNA transfizierten A431 Zellen mit einer RFI von 176 bzw. von 224 (Abb. 3-9A, B). Eine Reduzierung der EGFR Expressionsdichte bis zu 90% zeigte sich auch bei den für 72 h mit EGFR-spezifischer siRNA #2 transfizierten A549 Zellen (RFI=3,5), im Vergleich zu den mit Kontroll-siRNA transfizierten A549 Zellen (RFI =44) (Abb. 3-9C).



**Abb.3-8 Transfektion von EGFR-spezifischer siRNA auf A431 und A549 Zellen führt zu einer Herunterregulierung der EGFR Zelloberflächenexpression.** A431 Zellen wurden mit 25 nM EGFR spezifischer siRNA#2 und Kontroll siRNA für 48 h und für 72 h transfiziert. Zur Kontrolle wurden A549 Zellen (geringere Expression der EGFR Gene im Vergleich zu A431 Zellen) mit 25 nM Kontroll-siRNA#2 für 72 H transfiziert. Mittels indirekter Immunfluoreszenz wurde die EGFR Expression der jeweiligen Zellen ermittelt (A, B, C). Jeweils ein exemplarisches von drei Experimenten ist abgebildet.

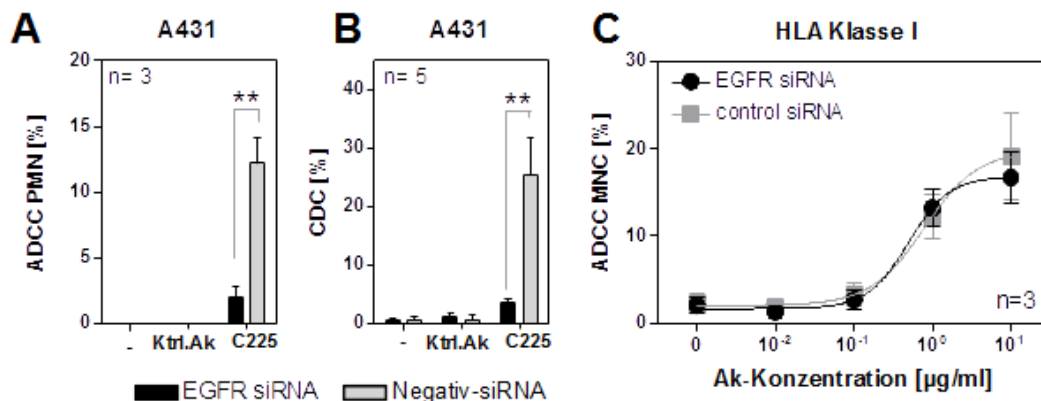
### 3.3.2 Einfluss der EGFR Herunterregulierung auf die Fc-vermittelten Wirkmechanismen

Um zu zeigen, dass eine Herunterregulierung der EGFR Expression durch Transfektion einer EGFR-spezifischen siRNA zu verminderten Fc-vermittelten Wirkmechanismen führt, erfolgten weitere [<sup>51</sup>Cr]-Zytotoxizitätstests mit den behandelten A431 als Zielzellen. Als Effektorquellen dienten MNC, PMNs und Plasma. Als Kontrolle erfolgte zusätzlich eine MNC-vermittelte ADCC mit Cetuximab und den mit EGFR-spezifischer siRNA #2 transfizierten A531 Zellen als Zielzellen. Obwohl die Transfektion der A431 Zellen für 48 h zu einer starken Herunterregulierung der EGFR Zelloberflächenexpression von 70% führte, konnte kein Unterschied zwischen der MNC-vermittelten Zytotoxizitätsaktivität und den mit Kontroll-siRNA transfizierten Zellen gemessen werden (Abb. 3-8A). Jedoch nach Transfektion von 72 h und einer Herunterregulierung der EGFR Zelloberflächenexpression von bis zu 90% verminderte sich, sowohl bei den A431 Zellen, als auch bei den A531 Zellen die MNC-vermittelte Zytotoxizitätsaktivität signifikant im Vergleich zu den mit Kontroll-siRNA transfizierten Zellen (Abb. 3-8B, C).



**Abb. 3-9 Starke EGFR-spezifische siRNA-induzierte Herunterregulierung der EGFR Zelloberflächenexpression vermindert die MNC-vermittelte Tumorzellyse.** A431 Zellen und A549 Zellen wurden mit EGFR-spezifischer siRNA #2 und Kontroll-siRNA für 48 h und für 72 h transfiziert. Anschließend erfolgten ADCC Experimente mit Cetuximab (C225) oder Kontroll-Antikörper in einer Konzentration von jeweils 10 µg/ml mit MNC (E:T-Verhältnis 80:1) als Effektorzellen (A-C).

Zusätzlich zeigte sich auch eine statistisch signifikante Reduzierung der PMN- und Komplement-vermittelten Zytotoxizitätsaktivität gegen mit EGFR-spezifischer siRNA #2 transfizierten A431 Zellen für 72 h im Vergleich zu den Kontroll-siRNA transfizierten Zellen (Abb. 3-10A,B). Um auszuschließen, dass eine Herunterregulierung von EGF-Rezeptoren nicht generell zu einer Beeinträchtigung der Tumorzellen führt, wurden zusätzlich A431 Zellen mit 25 nM EGFR-spezifischer siRNA #2 und Kontroll-siRNA für 72 h transfiziert. Anschließend wurden MNC vermittelte ADCCs mit einem HLA I-spezifischen Antikörper durchgeführt (Abb. 3-10C). Dabei wurde kein Unterschied zwischen der Zytotoxizitätsaktivität gegen die mit EGFR-spezifischer siRNA #2 transfizierten A431 Zellen und den mit Kontroll-siRNA transfizierten A431 Zellen beobachtet. Damit konnte gezeigt werden, dass die Reduzierung der EGFR Zelloberflächenexpression mittels Transfektion von EGFR-spezifischer siRNA nicht generell zu einer Beeinträchtigung der ADCC führt.



**Abb.3-10 Niedrige EGFR Zelloberflächenexpression beeinträchtigt die Aktivität der PMN-vermittelten ADCC und der CDC.** A431 Zellen wurden mit 25 nM EGFR spezifischer siRNA#2 und Kontroll-siRNA für 72 H transfiziert. **A** Anschließend wurden ADCC-Experimente mit Cetuximab (C225) oder Kontroll-Antikörper mit der Konzentration von 10 µg/ml und mit PMN-Zellen (E:T-Verhältnis 80:1) als Effektorzellen durchgeführt. **B** Dazu erfolgten auch CDC-Experimente mit Cetuximab (C225) und Kontroll-Antikörper (jeweils 10 µg/ml) und Blutplasma als Abwehrquelle. **Herunterregulierung der EGF-Rezeptoren durch EGFR-spezifische siRNA beeinträchtigt nicht generell die Eigenschaften der Tumorzellen.** Um eine generelle Beeinträchtigung der Tumorzellen durch siRNA-induziertem Herunterregulieren der EGFR Expression auszuschließen, erfolgten weitere ADCC-Experimente mit MNC-Zellen (E:T Verhältnis 80:1) als Effektorquellen und einem EGFR unabhängigen Antikörper gegen HLA I in ansteigender Konzentration (C).

## **4 Diskussion**

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde der Einfluss der EGFR Zelloberflächenexpressionslevel auf die unterschiedlichen Wirkmechanismen von humanisierten monoklonalen EGFR Antikörpern, wie die Hemmung der EGF induzierten Phosphorylierung und der Antikörper-abhängigen zellulären Zytotoxizität (ADCC) oder der Komplement-abhängigen Zytotoxizität (CDC), systematisch untersucht. Hierzu wurde ein stabiles Zellsystem mit variierender EGFR Antigendichte generiert, an dem die Wirkmechanismen EGFR gerichteter Antikörper untersucht wurde. Für die Etablierung des Systems wurde an genetisch unterschiedlichen in vitro kultivierten Tumorzelllinien studiert. Zusätzlich galt es zu klären, ob eine künstliche Herunterregulierung der EGFR Zelloberflächenexpression zu einer Reduzierung der EGFR Antikörper-vermittelten Wirkmechanismen führt und somit im Umkehrschluss eine mögliche Hochregulierung der EGFR Antigendichte deutlich verbesserte Wirkmechanismen versprechen könnte. Dafür wurden EGFR-spezifische siRNA mit in vitro Tumorzelllinien transfiziert und anschließend Fc-vermittelte Wirkmechanismen, ausgelöst durch EGFR Antikörper, in Zytotoxizitätstests gemessen und die Ergebnisse miteinander verglichen.

### **4.1 Einfluss der EGFR Expressionsdichte auf die Fab- und Fc-vermittelten Wirkmechanismen der EGFR Antikörper**

Einen Einfluss der Antigendichte auf die Antikörper-basierte Therapie konnte bereits im Falle der Trastuzumab-basierten Brustkrebstherapie gezeigt werden. In dieser Studie konnte eine positive Beziehung zwischen der HER2/neu Expressionsdichte und der Aktivität der MNC-vermittelten ADCC durch Trastuzumab festgestellt werden (66). Weitere Studien bestätigten, dass Patienten mit hoher HER2/neu Expression auf der Oberfläche der Tumorzellen von einer Trastuzumab-Therapie im Vergleich zu Patienten mit niedrig HER2/neu exprimierenden Tumorzellen deutlich profitierten (67). Die HER2/neu Expressionsdichte wurde schließlich als prognostischer Marker für die Trastuzumab-basierte Therapie benutzt (68). Eine große randomisierte Studie für die Behandlung des fortgeschrittenen NSCLC konnte bereits nachweisen, dass durch eine Kombinationstherapie von Chemotherapie und

dem EGFR Antikörper Cetuximab ein kleiner, signifikanter Überlebensvorteil für die Patienten gegenüber der alleinigen Chemotherapie bestand (56). Mit der Überarbeitung der Daten dieser FLEX Studie rückte die Anzahl der EGFR Expression in den Fokus. Die Patientengruppe wurde anhand der EGFR Zelloberflächenexpression der Tumorbiopsien in 2 Gruppen unterteilt. Dabei konnte ein deutlich signifikanter Überlebensvorteil für die Patienten mit hoher EGFR Expression auf der Oberfläche der Tumorzellen durch Chemotherapie plus Cetuximab festgestellt werden (58). Andererseits wurde in einer weiteren Studie beobachtet, dass Patienten mit CRC von einer EGFR Antikörperbasierten Therapie profitierten, obwohl nur wenig EGFR Zelloberflächenexpression auf den Tumorzellen mittels quantitativer IHC festgestellt werden konnte (64). Interessanterweise zeigte sich in unseren Ergebnissen eine positive Korrelation zwischen EGFR Zelloberflächenexpressionslevel und den Fc-abhängigen Wirkmechanismen, wie ADCC und CDC, der EGFR gerichteten Antikörper. Umgekehrt korrelierten jedoch die Fab-abhängigen Wirkmechanismen der EGFR gerichteten Antikörper, wie die Hemmung der Liganden-induzierten Phosphorylierung der EGF-Rezeptoren, negativ mit den EGFR Expressionslevel. Darauf basierend kann angenommen werden, dass die Fc-vermittelte Zytotoxizitätsaktivität der EGFR Antikörper gegen Tumorzellen mit hoch exprimierenden EGFR Level dominiert, während Fab-vermittelte Wirkmechanismen relevanter gegen Tumorzellen sind, welche geringe EGFR Expression besitzen. Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass EGF-Rezeptoren deutlich weniger auf Kolonzellen als auf Lungenzellen exprimiert werden (69). Die Mutation des Onkogen KRAS in Tumorzellen führt zu einer Abnahme der Fc-vermittelten Wirkmechanismen von EGFR Antikörpern durch Herunterregulierung der EGFR Zelloberflächenexpression (70). Durch diese Beobachtungen kann angenommen werden, dass KRAS Mutationen zu einer Resistenz der EGFR gerichteten Antikörper bei Patienten mit CRC (53) einhergeht, jedoch nicht bei Patienten mit NSCLC (71). Dabei werden die biologischen Unterschiede des zellulären Signalwegs zwischen NSCLC und CRC diskutiert, vor allem der RAF-MAPK- und der PI3K-AKT-Signalweg. Während nämlich die MAPK hauptsächlich über RAS aktiviert wird, kann die Aktivierung von der PI3-Kinase

sowohl über RAS als auch unabhängig von RAS erfolgen. Somit geht man davon aus, dass im CRC der Signalweg von MAPK und PI3K hauptsächlich über RAS erfolgt, während der PI3K-Signalweg beim NSCLC von RAS unabhängig ist (72). Weitere Studien bestätigten, dass die EGFR Antikörper-induzierte Zytotoxizität eine wichtige Rolle in der Hemmung des Tumorwachstums und der Metastasierung spielt, selbst für Tumorzellen, die gegenüber einer Hemmung der EGF-Rezeptoren unempfindlich sind (73).

#### **4.2 Bedeutung der Abwehrquellen für die Fc-vermittelte Zytotoxizität**

Bisher durchgeführte Studien, die sich mit dem Einfluss der EGFR Zelloberflächenexpression auf die Wirkmechanismen von EGFR Antikörpern beschäftigten, beschränkten sich allein auf NK-Zellen als Effektorquelle. Beispielsweise wurde in einer Studie gezeigt, dass die NK-Zellen-vermittelte ADCC Aktivität durch Cetuximab gegen unterschiedliche humane Tumorzellen positiv mit der EGFR Zelloberflächenexpression korrelierte (74). Dagegen wirkte in einer anderen Studie die ADCC Aktivität in Anwesenheit von NK-Zellen bereits suffizient gegen Lungenkrebszellen mit einer geringen Anzahl von EGFR Expression auf der Oberfläche (34). Diese unterschiedlichen Ergebnisse führten zu einem großen Konfliktpotenzial. Auch in unseren Daten, wie in Abb. 3-6 dargestellt, beobachteten wir zwar eine positive Korrelation zwischen der EGFR Zelloberflächenexpression und der NK-Zellen-vermittelten Zytotoxizität bei den BHK-EGFR+ Zelllinien, jedoch nicht bei den humanen Tumorzelllinien. Die Regulierung der Zytotoxizität von NK-Zellen ist komplex und beinhaltet Wechselwirkungen zwischen einer Vielzahl von NK-Zellen-Rezeptoren und anderen verwandten Liganden, die möglicherweise nicht über Artgrenzen hinweg funktionieren. Einige dieser Liganden können durch ihre Bindung an aktivierenden oder hemmenden NK-Zellen-Rezeptoren sowohl zu einer Aktivierung und Degranulierung von NK-Zellen und NK-Zellen-vermittelter ADCC führen, als auch diese verhindern (75). Daher ist zu erwarten, dass bei den isogenen BHK-EGFR+ Zelllinien die Rolle der EGFR Zelloberflächenexpression für die Aktivierung der NK-Zellen durch Cetuximab im Vordergrund steht. Allerdings muss berücksichtigt werden, dass die Experimente mit humanen NK-Zellen gegen xenogene (BHK21-) oder allogene (Tumor-) Zelllinien durchgeführt wurden. Dadurch kam es vermutlich zu einer



Abnahme der killer cell Ig-like-vermittelten Hemmung der NK-Zellen und damit zu einer erhöhten Zytotoxizitätsaktivität gegen die humanen Tumorzellen. Unabhängig davon interpretierte Marechal et al. in einer Studie, dass CD 56+ Zellen bzw. NK-Zellen die wichtigsten Effektorzellen der Cetuximab abhängigen ADCC Aktivität entlang der Leukozyten repräsentieren (76). Es wurde beobachtet, dass Fc-vermittelte Wirkmechanismen durch Cetuximab positiv mit der Anwesenheit von Fc $\gamma$ R1a-Rezeptoren korrelieren. Der Fc $\gamma$ R1a-Rezeptor wird auf myeloischen Zellen, wie Monozyten, Makrophagen und PMNs, exprimiert, jedoch nicht auf NK-Zellen (41). In unseren Versuchen wurden daher auch Zytotoxizitätstests mit diesen Effektorzellen durchgeführt. Dabei zeigte sich, dass auch Monozyten in Anwesenheit von Cetuximab eine Rolle als potente Abwehrzellen gegen Tumorzellen, welche sowohl niedrige oder hohe EGFR Zelloberflächenexpression besitzen, spielen (Abb. 3-3, 3-5). Dagegen konnte bei der PMN-vermittelten ADCC eine effektive Zytotoxizitätsaktivität nur gegen Tumorzellen, die hohe EGFR Zelloberflächenexpression besitzen, beobachtet werden (Abb. 3-3, 3-5). Durch in vivo Maus-Xenograft-Studien konnte gezeigt werden, dass Monozyten und PMNs sowohl eine Tumorfördernde als auch eine Tumor-hemmende Rolle spielen. Während beispielsweise Tumor-infiltrierende NK-Zellen bei Patienten mit CRC nach Cetuximab-basierter Chemotherapie für einen progressionsfreien Überlebensvorteil stehen (76), kann eine hohe Makrophagenbeteiligung in Tumoren in Zusammenhang mit einer schlechten Prognose stehen (77, 78). EGFR Antikörper sind in der Lage mit ihren Fc-Regionen ADCC und CDC zu vermitteln. Während der Beitrag der ADCC zur klinischen Wirksamkeit in vielen Studien untersucht wurde, bleibt der Beitrag zur klinischen Wirksamkeit der CDC weiterhin umstritten. So zeigten Studien, dass Fc-vermittelte Wirkmechanismen von EGFR Antikörpern die Aktivierung des Komplementsystems beinhalten (21, 36). Interessanterweise konnte eine CDC Aktivität durch Kombination von zwei nicht kompetitiven Fc-optimierten EGFR- und EGFR Variante III (EGFRvIII)-gerichteten Antikörper bereits in vitro beobachtet werden (36, 79). Auch wurde gezeigt, dass Komplement-optimierte EGFR Antikörper zu einer verstärkten Tumorzelllyse durch Verbesserung der Wechselwirkungen zwischen humoralen und zellulären Effektorquellen in der

Antikörper-basierten Tumorthherapie führen (65). Durch in vivo Maus-Xenograft-Experimente konnte festgestellt werden, dass die Komplement-Aktivierung durch Cetuximab eine entscheidende Rolle in der Hemmung des Tumorwachstums von NSCLC-Zellen spielt (80). Allerdings hängt der Einfluss des Komplement-Systems auf die Wirksamkeit der therapeutischen Antikörper in Mäusen in vivo stark von den experimentellen Einstellungen, wie Typ des Antikörpers, dem Mausstamm und der Zeltumorzellen ab, was eine generelle Schlussfolgerung erschwert (81). In der vorliegenden Arbeit beschreiben unsere Daten die Fc-vermittelte Aktivierung des Komplement-Systems durch EGFR Antikörper als potentielle wichtige Effektorquelle gegen Tumorzellen mit hoher EGFR Zelloberflächenexpression (Abb. 3-3, 3-5). Allerdings wurden die Untersuchungen der PMN- und Komplement-abhängigen ADCC bzw. CDC mit IgA2- oder Fc-optimierten EGFR Antikörperkombinationen durchgeführt, da unmodifizierte IgG1 Antikörper keine Zytotoxizität gegen Tumorzellen vermittelten. Insgesamt stellt die CDC in vitro einen starken Wirkmechanismus zur Tumorzellzerstörung durch monoklonale Antikörper dar. Jedoch bleibt der Beitrag der Wirkung der therapeutischen Antikörper in vivo umstritten. Obwohl einige vielversprechende Strategien entwickelt wurden, schreiten die klinische Ansätze zur Verbesserung der CDC durch therapeutische Antikörper aktuell nur langsam voran. Auch weil eine unkontrollierte Aktivierung des Komplement-Systems in Zusammenhang mit starken Nebenwirkungen der Antikörper-basierten Tumorthherapie steht, müssen weitere Ansätze sorgfältig überwacht und von weiteren Studien in vivo begleitet werden (82). Die gezeigten Daten stellen die kritische Frage, wie die Fc-vermittelten Wirkmechanismen gegen niedrig EGFR-exprimierende Tumorzellen verstärkt werden können. So verspricht die Fc-Optimierung von Antikörpern eine Verbesserung der Fc-vermittelten Wirkmechanismen, wie ADCC und CDC, gegen Tumorzellen mit niedriger EGFR Zelloberflächenexpression (83, 84). Beispielsweise konnte gezeigt werden, dass es zu einer Verbesserung der Bindungsaffinität der Fc-Region von IgG1 Antikörper zu den Fc $\gamma$ R1IIa-Rezeptoren durch eine Glykolisierung oder Protein-Optimierung kam und dadurch die NK-Zellen vermittelte ADCC verbessert werden konnte, unabhängig vom KRAS Mutationsstatus (37, 85). Ein Glyko-optimierter EGFR-gerichteter Antikörper

konnte bereits seine therapeutische Wirkung in einer klinischen Phase I Studie demonstrieren (86). Jedoch führt eine Verstärkung der Affinität von EGFR Antikörpern zum Fc $\gamma$ RIII (CD16)-Rezeptor zu einer Abnahme der Rekrutierung von PMNs. Myeloische Zellen sind die dominierenden rekrutierten Effektorzellen des humanen IgG2 Antikörpers Panitumumab. Diese Rekrutierung der myeloischen Zellen kann durch EGFR-gerichtete IgA Antikörper verstärkt werden (37). Für die Rekrutierung von T-Zellen als Effektorzellen wurden EGFR- und CD3-gerichtete Moleküle generiert, sogenannte BiTE-Antikörper (engl. Bispecific T-cell-engagers), welche signifikante anti-tumorale Wirkungen gegen KRAS-mutierte Tumorzellen in Maus-Xenograft-Modellen vermittelten (87). Neben der Optimierung der EGFR Antikörper wurden auch Kombinationsstrategien von EGFR Antikörpern, welche unterschiedliche EGFR Epitope binden, entwickelt. So konnte die Kombination von zwei EGFR Antikörpern sowohl CDC vermitteln (37), als auch eine Verstärkung der EGFR Internalisierung herbeiführen (88). Dieses Konzept demonstrierte bereits in einer klinischen Phase II Studie eine verstärkte Hemmung des Tumorwachstums durch EGFR-gerichtete Antikörperkombinationen in vitro und in vivo (88). Um Nebenwirkungen der EGFR Antikörper, wie beispielsweise Hautausschläge, zu minimieren, wurden weitere Antikörper entwickelt, die speziell an Tumor-spezifische EGFR Epitope, wie die EGFRvIII, binden. Interessanterweise vermittelte die Kombination von Fc-optimierten EGFR- und EGFRvIII-gerichteten Antikörpern eine Tumor-spezifische Zytotoxizitätssteigerung (79). Alternativ kann durch Maskierung der Antigenbindungsstellen mittels Peptiden, welche durch tumorspezifische Proteasen aktiviert werden, die Selektivität von Antikörpern für Tumorzellen verstärkt werden (89).

### **4.3 Schlußfolgerung**

Zusammenfassend zeigt die vorliegende Arbeit neue Einblicke in Bezug auf den Einfluss der EGFR Zelloberflächenexpression auf die Wirksamkeit von monoklonalen EGFR Antikörpern. Die Beobachtung, dass hohe EGFR Expression mit einer besseren klinischen Wirkung und erhöhten Fc-vermittelten Wirkmechanismen zusammenhängt, unterstützt die Aussage, dass Fc-vermittelte Wirkmechanismen die klinische Wirksamkeit von Cetuximab beim

NSCLC erklären können. Wenn durch weitere Studien bestätigt werden kann, dass beispielsweise Fc $\gamma$ R-Polymorphismen in der Bevölkerung mit einer höheren EGFR Expression einhergehen, so können neue Ansätze für eine verbesserte Fc-vermittelte Tumorzelllyse bestimmt werden. Die Anzahl der EGFR Expressionsdichte auf der Zelloberfläche von Krebszellen beeinflussen unterschiedliche Wirkmechanismen von EGFR-gerichteten Antikörpern und dadurch signifikante Unterschiede ihrer therapeutischen Wirkung. Die bisherigen Einschränkungen der EGFR gerichteten Antikörpertherapie können vielleicht durch neuartige Ansätze, die zu einer weiteren Spezifität der Antikörper für Tumorzellen mit gleichzeitiger Zunahme der Rekrutierung von Effektorzellen und des Komplement-System führen, überwunden werden. Aktuell ist ein umfassendes Verständnis des Einflusses der EGFR Zelloberflächenexpressionslevel auf die klinische Wirksamkeit von EGFR-gerichteten Antikörpern jedoch noch nicht erreicht.

## 5 Zusammenfassung

Der epidermale Wachstumsfaktor-Rezeptor (EGFR) ist eine wichtige Zielstruktur für EGFR-gerichtete Antikörper, wie Cetuximab oder Panitumumab, welche bereits erfolgreich für Antikörper-basierte Tumorthérapien verwendet werden. In einer großen randomisierten klinischen Studie konnte eine positive Korrelation zwischen der EGFR Expression auf nicht-kleinzelligen Bronchialkarzinomzellen und der therapeutischen Wirkung des EGFR Antikörpers Cetuximab beobachtet werden. Bisher wurde der Einfluss der EGFR Zelloberflächenexpression auf die unterschiedlichen EGFR Antikörper ausgelösten Wirkmechanismen noch nicht genau definiert. In der vorliegenden Arbeit wurde eine Reihe von BHK-EGFR+ Zelllinien mit unterschiedlicher EGFR Zelloberflächenexpression generiert. Die Menge der EGF-Rezeptoren auf der Zelloberfläche wurde mittels durchflusszytometrischen Untersuchungen genau bestimmt. Anschließend wurden diese Zellen benutzt, um den Einfluss des Ziel-Antigens systematisch mit unterschiedlicher EGFR Expressionsdichte auf die EGFR Antikörper ausgelösten Fab- und Fc-vermittelten Wirkmechanismen zu ermitteln. Dabei wurde eine negative Korrelation zwischen der EGFR Zelloberflächenexpression und den Fab-vermittelten Wirkmechanismen beobachtet. Umgekehrt korrelierte sowohl die Antikörper-abhängige zelluläre Zytotoxizität (ADCC), vermittelt durch NK-Zellen, Monozyten und PMNs, als auch die Komplement-abhängige Zytotoxizität (CDC) mit der EGFR Zelloberflächenexpression positiv. Lediglich benötigten die PMN-vermittelte ADCC und die CDC für eine signifikante Zytotoxizitätsaktivität hohe EGFR Zelloberflächenexpressionslevel auf den Zielzellen und hohe Antikörperkonzentrationen, während die MNC-vermittelte ADCC bereits zu einer suffizienten Lyse gegen Zielzellen mit niedrigen EGFR Expressionslevel führte. Diese Korrelation zwischen EGFR Zelloberflächenexpression und Fc-vermittelter ADCC und CDC wurde mittels humanen Tumorzelllinien als Zielzellen in weiteren Zytotoxizitätstests bestätigt. Darüber hinaus führte eine siRNA-induzierte Herunterregulierung der EGFR Zelloberflächenexpression auf Tumorzellen zu einer verminderten Antikörper-abhängigen Zytotoxizitätsaktivität, wodurch der Einfluss der EGFR Zelloberflächenexpression auf die EGFR Antikörper ausgelösten Fc-vermittelten

Wirkmechanismen bestätigt werden konnte. Basierend auf diesen Ergebnissen kann angenommen werden, dass die EGFR Antikörper ausgelöste Fc-vermittelte Zytotoxizitätsaktivität gegen Tumorzellen mit hoher EGFR Expressionsdichte überwiegt, sofern diese für Effektorzellen bzw. für das Komplement-System erreichbar sind, während die Fab-vermittelten Wirkmechanismen relevanter gegen Tumorzellen mit niedriger EGFR Expressionsdichte sind.

## Literatur-und Quellenverzeichnis

1. Cohen S, Carpenter G, King L, Jr. Epidermal growth factor-receptor-protein kinase interactions. Co-purification of receptor and epidermal growth factor-enhanced phosphorylation activity. *The Journal of biological chemistry*. 1980;255(10):4834-42. Epub 1980/05/25.
2. Mendelsohn J. Targeting the epidermal growth factor receptor for cancer therapy. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2002;20(18 Suppl):1S-13S. Epub 2002/09/18.
3. Citri A, Yarden Y. EGF-ERBB signalling: towards the systems level. *Nature reviews Molecular cell biology*. 2006;7(7):505-16. Epub 2006/07/11.
4. Ciardiello F, Tortora G. EGFR antagonists in cancer treatment. *The New England journal of medicine*. 2008;358(11):1160-74. Epub 2008/03/14.
5. Schneider MR, Wolf E. The epidermal growth factor receptor ligands at a glance. *Journal of cellular physiology*. 2009;218(3):460-6. Epub 2008/11/14.
6. Capdevila J, Elez E, Macarulla T, Ramos FJ, Ruiz-Echarri M, Tabernero J. Anti-epidermal growth factor receptor monoclonal antibodies in cancer treatment. *Cancer treatment reviews*. 2009;35(4):354-63. Epub 2009/03/10.
7. Lammerts van Bueren JJ, Bleeker WK, Brannstrom A, von Euler A, Jansson M, Peipp M, et al. The antibody zalutumumab inhibits epidermal growth factor receptor signaling by limiting intra- and intermolecular flexibility. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2008;105(16):6109-14. Epub 2008/04/23.
8. Samaga R, Saez-Rodriguez J, Alexopoulos LG, Sorger PK, Klamt S. The logic of EGFR/ErbB signaling: theoretical properties and analysis of high-throughput data. *PLoS computational biology*. 2009;5(8):e1000438. Epub 2009/08/08.
9. Shaw RJ, Cantley LC. Ras, PI(3)K and mTOR signalling controls tumour cell growth. *Nature*. 2006;441(7092):424-30. Epub 2006/05/26.
10. Scaltriti M, Baselga J. The epidermal growth factor receptor pathway: a model for targeted therapy. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*. 2006;12(18):5268-72. Epub 2006/09/27.
11. Mendelsohn J, Baselga J. Status of epidermal growth factor receptor antagonists in the biology and treatment of cancer. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2003;21(14):2787-99. Epub 2003/07/16.
12. Tsui IF, Poh CF, Garnis C, Rosin MP, Zhang L, Lam WL. Multiple pathways in the FGF signaling network are frequently deregulated by gene amplification in oral dysplasias. *International journal of cancer Journal international du cancer*. 2009;125(9):2219-28. Epub 2009/07/23.
13. Wu Y, Feinstein SI, Manevich Y, Chowdhury I, Pak JH, Kazi A, et al. Mitogen-activated protein kinase-mediated phosphorylation of peroxiredoxin 6 regulates its phospholipase A(2) activity. *The Biochemical journal*. 2009;419(3):669-79. Epub 2009/01/15.

14. Squarize CH, Castilho RM, Sriuranpong V, Pinto DS, Jr., Gutkind JS. Molecular cross-talk between the NFkappaB and STAT3 signaling pathways in head and neck squamous cell carcinoma. *Neoplasia*. 2006;8(9):733-46. Epub 2006/09/21.
15. Miettinen PJ, Berger JE, Meneses J, Phung Y, Pedersen RA, Werb Z, et al. Epithelial immaturity and multiorgan failure in mice lacking epidermal growth factor receptor. *Nature*. 1995;376(6538):337-41. Epub 1995/07/27.
16. Karunakaran D, Tzahar E, Beerli RR, Chen X, Graus-Porta D, Ratzkin BJ, et al. ErbB-2 is a common auxiliary subunit of NDF and EGF receptors: implications for breast cancer. *The EMBO journal*. 1996;15(2):254-64. Epub 1996/01/15.
17. Kloth MT, Laughlin KK, Biscardi JS, Boerner JL, Parsons SJ, Silva CM. STAT5b, a Mediator of Synergism between c-Src and the Epidermal Growth Factor Receptor. *The Journal of biological chemistry*. 2003;278(3):1671-9. Epub 2002/11/14.
18. Andl CD, Mizushima T, Oyama K, Bowser M, Nakagawa H, Rustgi AK. EGFR-induced cell migration is mediated predominantly by the JAK-STAT pathway in primary esophageal keratinocytes. *American journal of physiology Gastrointestinal and liver physiology*. 2004;287(6):G1227-37. Epub 2004/07/31.
19. Ferrara N. VEGF-A: a critical regulator of blood vessel growth. *European cytokine network*. 2009;20(4):158-63. Epub 2010/02/20.
20. Wells A. EGF receptor. *The international journal of biochemistry & cell biology*. 1999;31(6):637-43. Epub 1999/07/15.
21. Peipp M, Dechant M, Valerius T. Effector mechanisms of therapeutic antibodies against ErbB receptors. *Current opinion in immunology*. 2008;20(4):436-43. Epub 2008/07/01.
22. Imai K, Takaoka A. Comparing antibody and small-molecule therapies for cancer. *Nature reviews Cancer*. 2006;6(9):714-27. Epub 2006/08/25.
23. Male D, Brostoff, J., Roth, D.B., Roitt, I. . *Immunology*. Philadelphia, PA: Mosby Elsevier 2006.
24. Kohler G, Milstein C. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature*. 1975;256(5517):495-7. Epub 1975/08/07.
25. Stern M, Herrmann R. Overview of monoclonal antibodies in cancer therapy: present and promise. *Critical reviews in oncology/hematology*. 2005;54(1):11-29. Epub 2005/03/23.
26. Desjarlais JR, Lazar GA, Zhukovsky EA, Chu SY. Optimizing engagement of the immune system by anti-tumor antibodies: an engineer's perspective. *Drug discovery today*. 2007;12(21-22):898-910. Epub 2007/11/13.
27. Weiner LM, Beldegrun AS, Crawford J, Tolcher AW, Lockbaum P, Arends RH, et al. Dose and schedule study of panitumumab monotherapy in patients with advanced solid malignancies. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*. 2008;14(2):502-8. Epub 2008/01/29.
28. Rivera F, Vega-Villegas ME, Lopez-Brea MF, Marquez R. Current situation of Panitumumab, Matuzumab, Nimotuzumab and Zalutumumab. *Acta Oncol*. 2008;47(1):9-19. Epub 2007/12/22.



29. Cragg MS, Zhang L, French RR, Glennie MJ. Analysis of the interaction of monoclonal antibodies with surface IgM on neoplastic B-cells. *British journal of cancer*. 1999;79(5-6):850-7. Epub 1999/03/10.
30. Liu B, Fang M, Schmidt M, Lu Y, Mendelsohn J, Fan Z. Induction of apoptosis and activation of the caspase cascade by anti-EGF receptor monoclonal antibodies in DiFi human colon cancer cells do not involve the c-jun N-terminal kinase activity. *British journal of cancer*. 2000;82(12):1991-9. Epub 2000/06/23.
31. Dechant M, Beyer T, Schneider-Merck T, Weisner W, Peipp M, van de Winkel JG, et al. Effector mechanisms of recombinant IgA antibodies against epidermal growth factor receptor. *J Immunol*. 2007;179(5):2936-43. Epub 2007/08/22.
32. Peng D, Fan Z, Lu Y, DeBlasio T, Scher H, Mendelsohn J. Anti-epidermal growth factor receptor monoclonal antibody 225 up-regulates p27KIP1 and induces G1 arrest in prostatic cancer cell line DU145. *Cancer research*. 1996;56(16):3666-9. Epub 1996/08/15.
33. Kiyota A, Shintani S, Mihara M, Nakahara Y, Ueyama Y, Matsumura T, et al. Expression of a truncated epidermal growth factor receptor in oral squamous cell carcinomas. *Cancer letters*. 2000;161(1):9-15. Epub 2000/11/18.
34. Kurai J, Chikumi H, Hashimoto K, Yamaguchi K, Yamasaki A, Sako T, et al. Antibody-dependent cellular cytotoxicity mediated by cetuximab against lung cancer cell lines. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*. 2007;13(5):1552-61. Epub 2007/03/03.
35. Serrano C, Markman B, Taberero J. Integration of anti-epidermal growth factor receptor therapies with cytotoxic chemotherapy. *Cancer J*. 2010;16(3):226-34. Epub 2010/06/09.
36. Dechant M, Weisner W, Berger S, Peipp M, Beyer T, Schneider-Merck T, et al. Complement-dependent tumor cell lysis triggered by combinations of epidermal growth factor receptor antibodies. *Cancer research*. 2008;68(13):4998-5003. Epub 2008/07/03.
37. Peipp M, Dechant M, Valerius T. Sensitivity and resistance to EGF-R inhibitors: approaches to enhance the efficacy of EGF-R antibodies. *mAbs*. 2009;1(6):590-9. Epub 2010/01/14.
38. Schroeder HW, Jr., Cavacini L. Structure and function of immunoglobulins. *The Journal of allergy and clinical immunology*. 2010;125(2 Suppl 2):S41-52. Epub 2010/03/05.
39. Murphy K, Travers, P., Walport, M. *Janeway Immunologie*. Heidelberg: Spektrum Akademischer Verlag; 2009.
40. Bibeau F, Lopez-Crapez E, Di Fiore F, Thezenas S, Ychou M, Blanchard F, et al. Impact of Fc{gamma}RIIIa-Fc{gamma}RIIIa polymorphisms and KRAS mutations on the clinical outcome of patients with metastatic colorectal cancer treated with cetuximab plus irinotecan. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2009;27(7):1122-9. Epub 2009/01/24.
41. Woof JM, Burton DR. Human antibody-Fc receptor interactions illuminated by crystal structures. *Nature reviews Immunology*. 2004;4(2):89-99. Epub 2004/03/26.

42. Borregaard N, Cowland JB. Granules of the human neutrophilic polymorphonuclear leukocyte. *Blood*. 1997;89(10):3503-21. Epub 1997/05/15.
43. Cullen SP, Martin SJ. Mechanisms of granule-dependent killing. Cell death and differentiation. 2008;15(2):251-62. Epub 2007/11/03.
44. Jarvis GA, Griffiss JM. Human IgA1 initiates complement-mediated killing of *Neisseria meningitidis*. *J Immunol*. 1989;143(5):1703-9. Epub 1989/09/01.
45. Burritt MF, Calvanico NJ, Mehta S, Tomasi TB, Jr. Activation of the classical complement pathway by Fc fragment of human IgA. *J Immunol*. 1977;118(2):723-5. Epub 1977/02/01.
46. Bruggemann M, Williams GT, Bindon CI, Clark MR, Walker MR, Jefferis R, et al. Comparison of the effector functions of human immunoglobulins using a matched set of chimeric antibodies. *The Journal of experimental medicine*. 1987;166(5):1351-61. Epub 1987/11/01.
47. Maloney DG, Smith B, Rose A. Rituximab: mechanism of action and resistance. *Seminars in oncology*. 2002;29(1 Suppl 2):2-9. Epub 2002/02/14.
48. Taylor RP. Of mice and mechanisms: identifying the role of complement in monoclonal antibody-based immunotherapy. *Haematologica*. 2006;91(2):146a. Epub 2006/02/08.
49. Introna M, Golay J. Complement in antibody therapy: friend or foe? *Blood*. 2009;114(26):5247-8. Epub 2009/12/19.
50. Lohse S, Peipp M, Beyer T, Valerius T, Dechant M. Impact of human IgA antibodies on complement-dependent cytotoxicity mediated by combinations of EGF-R-directed antibodies. *Archivum immunologiae et therapeuticae experimentalis*. 2010;58(4):303-12. Epub 2010/05/29.
51. Wolpin BM, Mayer RJ. Systemic treatment of colorectal cancer. *Gastroenterology*. 2008;134(5):1296-310. Epub 2008/05/13.
52. Schmiegel W, Reinacher-Schick A, Arnold D, Graeven U, Heinemann V, Porschen R, et al. [Update S3-guideline "colorectal cancer" 2008]. *Zeitschrift für Gastroenterologie*. 2008;46(8):799-840. Epub 2008/09/02. S3-Leitlinie "Kolorektales Karzinom" - Aktualisierung 2008.
53. Allegra CJ, Jessup JM, Somerfield MR, Hamilton SR, Hammond EH, Hayes DF, et al. American Society of Clinical Oncology provisional clinical opinion: testing for KRAS gene mutations in patients with metastatic colorectal carcinoma to predict response to anti-epidermal growth factor receptor monoclonal antibody therapy. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2009;27(12):2091-6. Epub 2009/02/04.
54. Bonner JA, Harari PM, Giralt J, Azarnia N, Shin DM, Cohen RB, et al. Radiotherapy plus cetuximab for squamous-cell carcinoma of the head and neck. *The New England journal of medicine*. 2006;354(6):567-78. Epub 2006/02/10.
55. Vermorcken JB, Mesia R, Rivera F, Remenar E, Kawecki A, Rottey S, et al. Platinum-based chemotherapy plus cetuximab in head and neck cancer. *The New England journal of medicine*. 2008;359(11):1116-27. Epub 2008/09/12.

56. Pirker R, Pereira JR, Szczesna A, von Pawel J, Krzakowski M, Ramlau R, et al. Cetuximab plus chemotherapy in patients with advanced non-small-cell lung cancer (FLEX): an open-label randomised phase III trial. *Lancet*. 2009;373(9674):1525-31. Epub 2009/05/05.
57. Lynch TJ, Patel T, Dreisbach L, McCleod M, Heim WJ, Hermann RC, et al. Cetuximab and first-line taxane/carboplatin chemotherapy in advanced non-small-cell lung cancer: results of the randomized multicenter phase III trial BMS099. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2010;28(6):911-7. Epub 2010/01/27.
58. Pirker R, Pereira JR, von Pawel J, Krzakowski M, Ramlau R, Park K, et al. EGFR expression as a predictor of survival for first-line chemotherapy plus cetuximab in patients with advanced non-small-cell lung cancer: analysis of data from the phase 3 FLEX study. *The Lancet Oncology*. 2012;13(1):33-42. Epub 2011/11/08.
59. Moroni M, Veronese S, Benvenuti S, Marrapese G, Sartore-Bianchi A, Di Nicolantonio F, et al. Gene copy number for epidermal growth factor receptor (EGFR) and clinical response to antiEGFR treatment in colorectal cancer: a cohort study. *The Lancet Oncology*. 2005;6(5):279-86. Epub 2005/05/03.
60. Hirsch FR, Varella-Garcia M, Cappuzzo F, McCoy J, Bemis L, Xavier AC, et al. Combination of EGFR gene copy number and protein expression predicts outcome for advanced non-small-cell lung cancer patients treated with gefitinib. *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology / ESMO*. 2007;18(4):752-60. Epub 2007/02/24.
61. Sartore-Bianchi A, Moroni M, Veronese S, Carnaghi C, Bajetta E, Luppi G, et al. Epidermal growth factor receptor gene copy number and clinical outcome of metastatic colorectal cancer treated with panitumumab. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2007;25(22):3238-45. Epub 2007/08/01.
62. Personeni N, Fieuws S, Piessevaux H, De Hertogh G, De Schutter J, Biesmans B, et al. Clinical usefulness of EGFR gene copy number as a predictive marker in colorectal cancer patients treated with cetuximab: a fluorescent in situ hybridization study. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*. 2008;14(18):5869-76. Epub 2008/09/17.
63. Hebbbar M, Wacrenier A, Desauw C, Romano O, Cattan S, Triboulet JP, et al. Lack of usefulness of epidermal growth factor receptor expression determination for cetuximab therapy in patients with colorectal cancer. *Anti-cancer drugs*. 2006;17(7):855-7. Epub 2006/08/24.
64. Chung KY, Shia J, Kemeny NE, Shah M, Schwartz GK, Tse A, et al. Cetuximab shows activity in colorectal cancer patients with tumors that do not express the epidermal growth factor receptor by immunohistochemistry. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2005;23(9):1803-10. Epub 2005/01/29.
65. Derer S, Cossham M, Rosner T, Kellner C, Beurskens FJ, Schwanbeck R, et al. A Complement-Optimized EGFR Antibody Improves Cytotoxic Functions of Polymorphonuclear Cells against Tumor Cells. *J Immunol*. 2015;195(10):5077-87. Epub 2015/10/18.

66. Lewis GD, Figari I, Fendly B, Wong WL, Carter P, Gorman C, et al. Differential responses of human tumor cell lines to anti-p185HER2 monoclonal antibodies. *Cancer immunology, immunotherapy* : CII. 1993;37(4):255-63. Epub 1993/09/01.
67. Sauter G, Lee J, Bartlett JM, Slamon DJ, Press MF. Guidelines for human epidermal growth factor receptor 2 testing: biologic and methodologic considerations. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2009;27(8):1323-33. Epub 2009/02/11.
68. Pegram MD, Pauletti G, Slamon DJ. HER-2/neu as a predictive marker of response to breast cancer therapy. *Breast cancer research and treatment*. 1998;52(1-3):65-77. Epub 1999/03/05.
69. Derer S, Lohse S, Valerius T. EGFR expression levels affect the mode of action of EGFR-targeting monoclonal antibodies. *Oncoimmunology*. 2013;2(5):e24052. Epub 2013/06/14.
70. Derer S, Berger S, Schlaeth M, Schneider-Merck T, Klausz K, Lohse S, et al. Oncogenic KRAS impairs EGFR antibodies' efficiency by C/EBPbeta-dependent suppression of EGFR expression. *Neoplasia*. 2012;14(3):190-205. Epub 2012/04/13.
71. O'Byrne KJ, Gatzemeier U, Bondarenko I, Barrios C, Eschbach C, Martens UM, et al. Molecular biomarkers in non-small-cell lung cancer: a retrospective analysis of data from the phase 3 FLEX study. *The Lancet Oncology*. 2011;12(8):795-805. Epub 2011/07/26.
72. Shepherd FA, Tsao MS. Epidermal growth factor receptor biomarkers in non-small-cell lung cancer: a riddle, wrapped in a mystery, inside an enigma. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2010;28(6):903-5. Epub 2010/01/27.
73. Overdijk MB, Verploegen S, van den Brakel JH, Lammerts van Bueren JJ, Vink T, van de Winkel JG, et al. Epidermal growth factor receptor (EGFR) antibody-induced antibody-dependent cellular cytotoxicity plays a prominent role in inhibiting tumorigenesis, even of tumor cells insensitive to EGFR signaling inhibition. *J Immunol*. 2011;187(6):3383-90. Epub 2011/08/13.
74. Patel D, Guo X, Ng S, Melchior M, Balderes P, Burtrum D, et al. IgG isotype, glycosylation, and EGFR expression determine the induction of antibody-dependent cellular cytotoxicity in vitro by cetuximab. *Human antibodies*. 2010;19(4):89-99. Epub 2010/12/24.
75. Lanier LL. Up on the tightrope: natural killer cell activation and inhibition. *Nature immunology*. 2008;9(5):495-502. Epub 2008/04/22.
76. Marechal R, De Schutter J, Nagy N, Demetter P, Lemmers A, Deviere J, et al. Putative contribution of CD56 positive cells in cetuximab treatment efficacy in first-line metastatic colorectal cancer patients. *BMC cancer*. 2010;10:340. Epub 2010/07/02.
77. Algars A, Irjala H, Vaittinen S, Huhtinen H, Sundstrom J, Salmi M, et al. Type and location of tumor-infiltrating macrophages and lymphatic vessels predict survival of colorectal cancer patients. *International journal of cancer Journal international du cancer*. 2012;131(4):864-73. Epub 2011/09/29.

78. Sica A, Schioppa T, Mantovani A, Allavena P. Tumour-associated macrophages are a distinct M2 polarised population promoting tumour progression: potential targets of anti-cancer therapy. *Eur J Cancer*. 2006;42(6):717-27. Epub 2006/03/08.
79. Klausz K, Berger S, Lammerts van Bueren JJ, Derer S, Lohse S, Dechant M, et al. Complement-mediated tumor-specific cell lysis by antibody combinations targeting epidermal growth factor receptor (EGFR) and its variant III (EGFRvIII). *Cancer science*. 2011;102(10):1761-8. Epub 2011/07/02.
80. Hsu YF, Ajona D, Corrales L, Lopez-Picazo JM, Gurrpide A, Montuenga LM, et al. Complement activation mediates cetuximab inhibition of non-small cell lung cancer tumor growth in vivo. *Molecular cancer*. 2010;9:139. Epub 2010/06/10.
81. Okroj M, Osterborg A, Blom AM. Effector mechanisms of anti-CD20 monoclonal antibodies in B cell malignancies. *Cancer treatment reviews*. 2013;39(6):632-9. Epub 2012/12/12.
82. Derer S, Beurskens FJ, Rosner T, Peipp M, Valerius T. Complement in antibody-based tumor therapy. *Critical reviews in immunology*. 2014;34(3):199-214. Epub 2014/06/19.
83. Idusogie EE, Wong PY, Presta LG, Gazzano-Santoro H, Totpal K, Ultsch M, et al. Engineered antibodies with increased activity to recruit complement. *J Immunol*. 2001;166(4):2571-5. Epub 2001/02/13.
84. Lazar GA, Dang W, Karki S, Vafa O, Peng JS, Hyun L, et al. Engineered antibody Fc variants with enhanced effector function. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2006;103(11):4005-10. Epub 2006/03/16.
85. Schlaeth M, Berger S, Derer S, Klausz K, Lohse S, Dechant M, et al. Fc-engineered EGF-R antibodies mediate improved antibody-dependent cellular cytotoxicity (ADCC) against KRAS-mutated tumor cells. *Cancer science*. 2010;101(5):1080-8. Epub 2010/03/25.
86. Paz-Ares LG, Gomez-Roca C, Delord JP, Cervantes A, Markman B, Corral J, et al. Phase I pharmacokinetic and pharmacodynamic dose-escalation study of RG7160 (GA201), the first glycoengineered monoclonal antibody against the epidermal growth factor receptor, in patients with advanced solid tumors. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2011;29(28):3783-90. Epub 2011/09/09.
87. Lutterbuese R, Raum T, Kischel R, Hoffmann P, Mangold S, Rattel B, et al. T cell-engaging BiTE antibodies specific for EGFR potently eliminate KRAS- and BRAF-mutated colorectal cancer cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2010;107(28):12605-10. Epub 2010/07/10.
88. Koefoed K, Steinaa L, Soderberg JN, Kjaer I, Jacobsen HJ, Meijer PJ, et al. Rational identification of an optimal antibody mixture for targeting the epidermal growth factor receptor. *mAbs*. 2011;3(6):584-95. Epub 2011/11/30.
89. Donaldson JM, Kari C, Fragoso RC, Rodeck U, Williams JC. Design and development of masked therapeutic antibodies to limit off-target effects: application to anti-EGFR antibodies. *Cancer biology & therapy*. 2009;8(22):2147-52. Epub 2009/09/29.

## Anhang

### A.I Verwendete Chemikalien und Reagenzien

Tabelle A-I. Übersicht über die verwendeten Chemikalien und Reagenzien

Bezeichnung	Hersteller
Accutase	Thermo Fisher Scientific, IL, USA
Anti-mouse IgG Micro Bead Cocktail	Miltenyi Biotec, Auburn, CA, USA
Agar	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Bovines Serum Albumin, Faktor V	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Bradford-protein-colorimetric-assay	BioRad, München
Cell Lysis Buffer (10x)	CST Europe, Leiden, Niederlande
CellTiter 96® Cell Proliferation Assay	Promega Corp., Madison, WI, USA
Chemilumineszenz/ ECL	Thermo Fisher Scientific, IL, USA
Chrom-51 [ <sup>51</sup> Cr], 5 mCi/ml	Hartmann Analytic, Braunschweig
Destilliertes Wasser, steril	Invitrogen, Carlsbad, CA, USA
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Dulbecco`s Modified Eagle Medium (DMEM) mit 4,5 g/l Glucose, L-Glutamin und Phenolrot	Invitrogen, Carlsbad, CA, USA
Enzyme-linked Immunabsorbent Assay	ELISA, R&D Systems, Minneapolis, MN, USA
Fötales Kälberserum (FCS)	Invitrogen, Carlsbad, CA, USA
Geneticin (Gen)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Glucose	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Glycerin	Merck, Darmstadt
Hanks	PAA Laboratories, Pasching, Österreich
Heparin-Natrium (25.000 I.E./5ml)	Ratiopharm GmbH, Ulm
Lipofectamine 2000 Reagenz	Invitrogen, Carlsbad, CA, USA
Lyse-Buffer	CST, Danvers, MA, USA

Milchpulver	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Monocyte Isolation Kit II	Miltenyi Biotec, Auburn, CA. USA
MycoAlert® Mycoplasma Detection Kit	Lonza, Rockland, ME, USA
NativePAGE Novex Bis-Tris Gel System	Invitrogen, Carlsbad, CA, USA
Natriumazid	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Natriumchlorid (NaCl)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
NK cell Isolation Kit	Miltenyi Biotec, Auburn, CA. USA
OptiPhase SuperMix	PerkinElmer, Waltham, MA, USA
Penicillin/ Streptomycin (Pep/ Strep)	PAA Laboratories, Pasching, Österreich
Percoll	Biochrom AG, Berlin
Plasmid pUSE-EGFR	Upstate Biotechnology
Protease Inhibitor Cocktail	CST Europe, Leiden, Niederlande
PBS (1x)	PAA Laboratories, Pasching, Österreich
PBS (10x)	Invitrogen, Carlsbad, CA, USA
Qifikit®	Dako Deutschland GmbH, Hamburg
RPMI-1640 mit L-Glutamin und Phenolrot	Invitrogen, Carlsbad, CA, USA
Salzsäure	Merck, Darmstadt
siRNA#1, #2, #3	Applied Biosystems/ Ambion, Foster City, CA, USA
siRNA Negative Control #1	Applied Biosystems/ Ambion, Foster City, CA, USA
Substrat Solution	Im Labor vorhanden
Tris	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
TritonX-100	Merck, Darmstadt
Trypanblau	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO,USA
Tween® 20	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO,USA

## A.II Verwendete Geräte, Säulen und Gebrauchsmaterialien

Tab. A-II. Übersicht über die verwendeten Geräten, Säulen und Gebrauchsmaterialien

Bezeichnung	Hersteller
1450 LSC MicroBeta TriLux	Perkin Elmer, Waltham, MA, USA
96-Well Sample Platte	Wallac, Turku, Finnland
Axiovert 40 CFL Lichtmikroskop	Carl Zeiss, Jena
Cellstar® Gewebekulturflaschen mit Filter (25 cm <sup>2</sup> , 75 cm <sup>2</sup> , 175 cm <sup>2</sup> )	Greiner Bio-One, Frickenhausen
Cellstar® PP-Röhrchen mit Deckel (15 ml, 50 ml, steril)	Greiner Bio-One, Frickenhausen
Coulter EPICS XL-MCL Durchflusszytometer	Beckmann Coulter, Fullerton, CA, USA
Cryo.s™ Einfrierröhrchen 2 ml	Greiner Bio-One, Frickenhausen
ELISA Reader Sunrise™	Tecan, Männedorf, Schweiz
Gamma Counter Wallac 1470 wizard	Perkin Elmer, Waltham, MA, USA
Heraeus® HERAcell® 240 Brutschrank	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Heraeus® Multifuge 3 L-R Zentrifuge	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Heraeus® Megafuge 1.0R Zentrifuge	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
MACS LS Separationssäulen	Miltenyi Biotec, Auburn, CA, USA
MACS Preseparationsfilter	Miltenyi Biotec, Auburn, CA, USA
Microtiterplatten mit 96 Vertiefungen, V Form	Sarstedt, Newton, NC, USA
Multiple Well Plate 96-Loch Platten, Rundboden, steril	Sarstedt, Newton, NC, USA
PP-Röhrchen 5 ml	Sarstedt, Newton, NC, USA
PVDF Membran Invitrolon™	Invitrogen, Carlsbad, CA, USA
TopSeal-A	Perkin Elmer, Waltham, MA, USA
Wasserbad	GFL, Burgwedel
X Cell Sure Lock System	Invitrogen, Carlsbad, CA, USA



### A.III Verwendete Antikörper

Tab. A-III. Übersicht über die verwendeten Antikörper

Antikörper	Hersteller
$\beta$ -Aktin spezifischer Antikörper	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Chimärer 225-IgA2-Antikörper	Im Labor vorhanden
Chimärer IgG1-Antikörper C225 (Cetuximab)	Merck, Darmstadt
Chimärer IgG1-Antikörper H425-E3	Patent Cooperation Treaty Application WO 92/15683 (65)
EGFR spezifischer Primärantikörper	Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA
FITC-konjugierter Anti-Maus IgG Antikörper	Dianova Deutschland GmbH, Hamburg
Humaner IgG Kontrollantikörper	Alpha Diagnostic International, San Antonio, TX, USA
Humaner IgG1 Kontrollantikörper	Alpha Diagnostic International, San Antonio, TX, USA
HRP-konjugierter IgG	Im Labor vorhanden
Muriner EGFR Antikörper m425 (Matuzumab)	Im Labor vorhanden

## Danksagung

An dieser Stelle möchte ich Menschen meinen Dank aussprechen, ohne deren Hilfe und Zutun diese Arbeit nicht möglich gewesen wäre.

Als erstem danke ich Herrn *Prof. Dr. Thomas Valerius* für die Möglichkeit, meine Promotion über dieses interessante Thema anfertigen zu können. Des Weiteren danke ich ihm für die hilfsbereite Betreuung und seinen wissenschaftlichen Rat. Bei Frau *Dr. Stefanie Derer* möchte ich mich herzlich für die Einführung in das Thema und in die Methoden, die stets gute und freundliche Betreuung meiner Doktorarbeit und für die Hilfe beim Verfassen der Publikationen bedanken. Ohne sie wäre diese Arbeit nicht möglich gewesen. Bei Herrn *Dr. Ralf Schwanbeck* bedanke ich mich die freundliche Bereitschaft zum Korrekturlesen und für die Anregungen zur Fertigstellung der Arbeit. Ich danke Frau *Sigrid Hund* für das gründliche Korrekturlesen.

Ich möchte darüber hinaus Herrn *Dr. Matthias Peipp* für die Bereitstellung der Tranfektanden für die BHK-EGFR+ Zelllinien und Herrn *Prof. Dr. Holger Kalthoff* für die Bereitstellung der PANC1 und PAN89 Zelllinien danken.

Des Weiteren möchte ich Frau *Dr. Stefanie Derer*, Frau *Dr. Pia Glorius*, Frau *Dr. Katja Klausz*, Herrn *Dr. Stefan Lohse*, Herrn *Dr. Matthias Peipp*, Herrn *Dr. Christian Kellner*, Herrn *Dr. Mathias Staudinger* und Herrn *Dr. Thies Rössner* für die Diskussionsbereitschaft und die Hilfe in sachlichen Fragen danken.

Den technischen Assistentinnen, insbesondere *Christine Wildgrube* und *Yasmin Brodtmann*, möchte ich danken für die stete Hilfsbereitschaft und das Aufrechterhalten des Laborbetriebes.

Allen zusammen möchte ich für das angenehme und freundliche Arbeitsklima danken.

Mein besonderer Dank gilt meiner Verlobten *Sarah*, meiner Mutter *Rita Bauer* und meiner Familie, die mich persönlich nach ihren Kräften und Möglichkeiten in allen Lagen, besonders den schwierigen, unterstützt hat.

## **Lebenslauf**

### **Persönliche Angaben**

Vor- und Zuname: Philip Jakob Bauer

Geburtstag: 16.11.1984

Geburtsort: Offenburg

### **Berufliche Tätigkeit**

seit Mai 2015 Assistenzarzt, Urologie und Kinderurologie, Ortenau-Klinikum Offenburg-Gengenbach

04/2014 – 04/2015 Assistenzarzt, Allgemein-, Viszeral- und Unfallchirurgie. Kreiskrankenhaus Emmendingen

### **Akademische Ausbildung und Promotion**

Aktuell seit 10/2009 Anfertigung der vorliegenden Dissertation in der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Dr. Thomas Valerius, aktuell Sektion für Stammzell- und Immuntherapie (Ärztlicher Leiter: Prof. Dr. Martin Gramatzki) der II. Medizinischen Klinik (Direktor: Prof. Dr. Dr. Michael Kneba) am Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Campus Kiel.

Juni 2013 Approbation als Arzt, Landesamt für soziale Dienste Schleswig-Holstein

29/05/2013 2. Abschnitt der ärztlichen Prüfung

2009 – 2013 Klinisches Studium der Humanmedizin an der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

02/03/2009 1. Abschnitt der ärztlichen Prüfung

2006 – 2009 Vorklinisches Studium der Humanmedizin an der Georg-Augustus-Universität zu Göttingen

### **Praktisches Jahr**

10/2012 – 01/2013 Prof. Dr. Richardt, Klinik für Innere Medizin, Bad Segeberg

06/2012 – 09/2012 Auslandstertial Chirurgie, Nouveau Hôpital de Straßbourg, Frankreich

02/2012 – 05/2012 Prof. Dr. Steinfath, Klinik für Anästhesiologie, UK-SH Kiel

### Publikationen

Derer, S., **Bauer, P.**, Lohse, S., Scheel, A.H., Berger, S., Kellner, C., Peipp, M., and Valerius, T. *Impact of epidermal growth factor receptor (EGFR) cell surface expression levels on effector mechanisms of EGFR antibodies. J Immunol.* 2012 Dec 1;189(11):5230-9.

**Bauer, P.**, Peipp, M., Lohse, S., Derer, S., and Valerius, T., *Efficient EGFR-directed antibody-mediated cytotoxicity highly depends on antigen density and effector source*, in *34th Symposium of the North-German Immunologists*. 2011: Research Center Borstel, Germany (Posterbeitrag und Abstract)

### Schulische Ausbildung

1995 – 2004 Schiller-Gymnasium, Offenburg

Abschluss: Allgemeine Hochschulreife

1990 – 1994 Grundschule Nesselried

### Zivildienst

10/2004 – 06/2005 Ortenau-Klinikum Offenburg, Station 5M, Urologie