

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

**Optimierung der Komplementaktivierung
eines EGFR-Antikörpers
führt zu verstärkter Aktivierung
von Granulozyten mittels Anaphylatoxin C5a**

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

vorgelegt von

Michael Leonard Kenyon Cossham

aus Eckernförde

Kiel 2016

Berichterstatter: Prof. Dr. med. Thomas Valerius

Prof. Dr. Dr. Janka Held-Feindt

Tag der mündlichen Prüfung: 07.04.2017

Zum Druck genehmigt: Kiel, den 31.01.2017

gez. Prof. Dr. med. Johann Roider
(Vorsitzender der Prüfungskommission)

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	III
Einleitung	1
1.1 Die Entstehung und Therapie von Krebserkrankungen	1
1.2 Der Epidermale Wachstums Faktor Rezeptor	2
1.3 Lungenkarzinom	3
1.4 Der EGF-Rezeptor in der zielgerichteten Tumorthherapie.....	4
1.5 Monoklonale Antikörper	5
1.6 Struktur von Antikörpern	6
1.7 Funktionen von Antikörpern.....	7
1.8 Fc-Rezeptoren.....	8
1.9 Das Komplementsystem.....	9
1.10 Komplement-Rezeptoren.....	11
1.11 Anaphylatoxine	12
1.12 Motivation und Fragestellung	13
Material und Methoden.....	15
2.1 Blutspender	15
2.2 Verwendete Materialien	15
2.3 Verwendete Zielzellen und ihre Kultivierung.....	15
2.4 Verwendete Antikörper	16
2.6 Automatisierte Gelelektrophorese	18
2.7 Durchflusszytometrische Analyse	18
2.7.1 Komplementanlagerung	19
2.7.2 Untersuchung von Anaphylatoxin Freisetzung	20
2.8 Gewinnung humanem Serums und Effektorzellen.....	20
2.8.1 Aufreinigung humanen Serums	20
2.8.2 Aufreinigung humaner Leukozyten.....	20
2.8.3 Isolation von Monozyten und Natürlichen Killerzellen.....	21
2.9 Zytotoxizitätstests	21
2.9.1 Komplement-abhängige Zytotoxizitätstests	22
2.9.2 Antikörper-abhängige zelluläre Zytotoxizitätstests.....	22
2.9.3 Komplement-abhängige Zellvermittelte Zytotoxizitätstests.....	23
2.10 Komplement induzierte Apoptose von Zielzellen	23
2.11 Chemotaxis Versuche.....	24

2.12	Statistische Auswertung	24
Ergebnisse	25
3.1	Generierung einer CDC-optimierte Variante des Antikörpers Matuzumab....	25
3.2	Biochemische Charakterisierung	25
3.3	Funktionelle Charakterisierung	27
3.4	Untersuchung der Aktivierung von Effektorzellen durch die Matuzumab Antikörpervarianten	30
3.5	Expressionsmuster der Komplementrezeptoren auf PMNs und NK- Zellen .	33
3.6	CDC-optimierter Matuzumab Antikörper induziert höhere Lyseraten von Zielzellen durch die Aktivierung des Komplementsystems und Effektorzellen.....	35
3.7	Die Spaltung von C5 steigert die PMN vermittelte Zytotoxizität.....	36
3.8	C5a verbessert PMN-vermittelte Zelllyse	40
Diskussion	46
4.1	Einleitung.....	46
4.2	Komplement optimierter Matuzumab Antikörper.....	46
4.3	Auswirkung der Komplementsystemaktivierung auf ADCC	48
4.4	Die Rolle von C5a in der Tumorprogression.....	49
4.5	Die Interaktion von Komplement- und Fc-Rezeptoren.....	50
4.6	Schlusswort	52
Literaturverzeichnis	53
Anhang	58
A.1	Verwendete Chemikalien und Reagenzien.....	58
A.2	Verbrauchsmaterialien.....	58
A.3	Technische Gerätschaften	59
Danksagung	60
Lebenslauf	61
Publikation	62

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
ADCC	antibody-dependent cellular cytotoxicity
Ak	Antikörper
AU	absorption units
Bq	Becquerel
BSA	bovine serum albumin
bzw.	beziehungsweise
°C	Grad Celsius
ca.	circa
CD	cluster of differentiation
CDC	complement-dependent cytotoxicity
CDCC	complement-dependent cell-mediated cytotoxicity
CHO	chinese hamster ovary
Ci	Curie (alte Einheit für radioaktiven Zerfall, $1 \text{ Ci} = 3.7 \times 10^{10} \text{ Bq}$)
cmp	Counts per minute
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
⁵¹ Cr	⁵¹ Chrom
Da	Dalton; Maßeinheit für das Molekulargewicht
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DNS	Desoxyribonukleinsäure
DSMZ	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen
EC ₅₀	half maximal effective concentration
Ecu	Eculizumab
EGF	epidermal growth factor
EGFR	epidermal growth factor receptor
engl.	englisch

Abkürzungsverzeichnis

E:T-Ratio	effector to target cell ratio
Fab-Fragment	antigenbindendes Fragment
FACS™	Fluorescence activated cell sorting
FBS	fetal bovine serum
Fc-Fragment	fragment crystallisable
FL1	Fluoreszenzintensität (Filter 1)
FcR	Fc-Rezeptor
FCS	fetal calf serum
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
g	Gramm
G-CSF	Granulozyten-Kolonien stimulierender Faktor
ggf.	Gegebenenfalls
GM-CSF	Granulozyten-Makrophagen-Kolonien stimulierender Faktor
h	Stunden
H.i.	Hitze inaktiviert
ITAM	Immunoreceptor tyrosine-based activation motif
k	Kilo
95% KI	95% Konfidenzintervall
Kontr.	Kontrolle
Konz.	Konzentration
l	Liter
LK	leichte Kette
MFI	Mean fluorescence intensity
µL	Mikroliter
m	Milli
min	Minuten
MNC	mononuclear cell

Abkürzungsverzeichnis

MSX	Methionine Sulfoximine
mt	Mutante
n.	nicht
ng	Nanogramm
NK-Zellen	natürliche Killerzellen
NSCL	non-small cell lung cancer
o.	ohne
pH	pondus Hydrogenii
PMN	polymorphnuclear cell
RFI	relative Fluoreszenzintensität
red.	reduziert
SK	schwere Kette
Syk	spleen tyrosine kinase
TKI	Tyrosinkinaseinhibitor
V _L	variable leichte Kette
V _H	variable schwere Kette
v/v	Volumenprocent
w/o	without
wt	Wildtyp

Einleitung

1.1 Die Entstehung und Therapie von Krebserkrankungen

Die Instabilität unseres Genoms ist die Grundlage der Vielfalt, aber erklärt nicht direkt weshalb eine Person erkrankt und die andere nicht. Es kommt permanent zu Mutationen in den Zellen unseres Körpers, welche oft durch Reparaturmechanismen der Zelle behoben werden können oder so gravierend sind, dass die Zelle stirbt. Viele Mutationen treten in irrelevanten Bereichen des Genoms auf. Kommt es jedoch zum Beispiel in einem Protoonkogen zu einer aktivierenden Mutation, kann aus dem Protoonkogen ein Onkogen werden. Dieses kann nun zum Selektionsvorteil für die Zellen, gegenüber den anderen Zellen des Gewebes, sein. Es müssen aber noch mehrere Mutationen in einer der beiden oder ihren Töchterzellen auftreten, bevor von einer maligne entarteten Zelle gesprochen werden kann [1]. Hanahan und Weinberg stellten im Januar 2000 die Hypothese auf, dass auf dem Boden der Genominstabilität und der Entzündungsreaktion alle oder fast alle malignen Tumore die folgenden sechs Eigenschaften erlangen:

Die Krebszellen werden autark von Wachstumssignalen.

Sie werden resistent gegen wachstumshemmende Signale.

Sie weichen dem programmierten Zelltod, der Apoptose aus.

Sie haben das Potential sich unendlich zu replizieren.

Sie können die Blutgefäßneubildung initiieren.

Sie können Gewebe infiltrieren und Metastasen bilden.

Gute zehn Jahre später wurde dieser konzeptionelle Ansatz von den Autoren in einer weiteren Publikation mit neuen Erkenntnissen abgeglichen, diskutiert und durch zwei Punkte erweitert. Dies sind:

Krebszellen programmieren ihren Energiemetabolismus neu.

Sie umgehen die Zerstörung durch das Immunsystem.

Des Weiteren sollte ein Tumor nicht als solide Masse an Krebszellen verstanden werden, sondern als komplexe Einheit aus entarteten Zellen und rekrutierten Zellen welche zum „Tumor Mikromilieu“ beitragen. Zu den rekrutierten Zellen gehören unter anderem Endothelzellen, Fibroblasten und Zellen des Immunsystems, welche untereinander und mit den Krebszellen in komplexer Weise kommunizieren [1, 2].

Die konventionelle Therapie maligner Erkrankungen setzt sich zusammen aus operativen Eingriffen, Chemotherapie und Bestrahlung. In den letzten Jahrzehnten ist die zielgerichtete Tumorthherapie zur konventionellen Therapie hinzugekommen. In

dieser Therapieform wird versucht, maligne Zellen gezielt anzugreifen oder in tumorspezifische Prozesse einzugreifen.

Rekombinante monoklonale Antikörper (mAk) sind eine der eingesetzten Arzneimittelklassen. Sie werden unter anderem eingesetzt um Rezeptoren, welche auf malignen Zellen überexprimiert sind, zu inhibieren und Wachstumssignale zu hemmen. Als Beispiel sei hier Trastuzumab genannt. Rituximab hingegen ist ein mAk, welcher gegen das Antigen CD20 gerichtet ist und mittels immunologischer Effektormechanismen die Eliminierung von CD20 exprimierenden Zellen verursacht. Der mAk Bevacizumab ist gegen das sezernierte Protein VEGF (engl. vascular endothelial growth factor) gerichtet, welches eine Schlüsselrolle in der Angiogenese hat, und hemmt so die Neubildung von Blutgefäßen im Tumor und dadurch das Tumorwachstum selbst [3].

1.2 Der Epidermale Wachstums Faktor Rezeptor

Der Epidermale Wachstums Faktor Rezeptor (engl.: epidermal growth factor receptor, EGFR) ist eine membranständige Typ-1-Rezeptor Tyrosinkinase, welche von Stanley Cohen et al. 1980 zum ersten Mal beschrieben wurde [4]. Im Zuge intensiver Forschung zeigte sich, dass der EGF-Rezeptor Teil einer Rezeptorfamilie mit vier Mitgliedern ist: EGFR (ErbB1), ErbB2, ErbB3 und ErbB4. Der EGFR (ErbB1) hat eine Größe von 170 k Da und kann in drei Bereiche gegliedert werden. Er ist aufgebaut aus einer glykosylierten extrazellulären Domäne, einem lipophilen Bereich welcher transmembranös liegt und einer intrazellulären Tyrosinkinase [5]. Die extrazellulären Domänen des Rezeptors bilden die Ligandenbindungsstelle, welche im Falle des ErbB1 sechs verschiedene Botenstoffe binden kann. Dies sind der epidermale Wachstumsfaktor (engl. epidermal growth factor, EGF), der transformierende Wachstumsfaktor alpha (engl. transforming growth factor alpha, TGF α), Heparinbindender-EGF (engl. Heparin-binding EGF (HB-EGF), β -Cellulin, Epiregulin sowie Amphiregulin [6]. Ein Ligand bindet meistens an zwei Rezeptoren, so dass die Rezeptoren dimerisieren. Die Bindung eines Liganden kann zwei gleiche EGF-Rezeptoren koppeln oder heterodimere der EGFR-Familie bilden. Die Rezeptordimerisierung bewirkt, dass die intrazellulär liegenden Tyrosinkinasen sich gegenseitig phosphorylieren können. Also eine Phosphatgruppe von einem ATP-Molekül (Adenosintriphosphat) an die Aminosäure Tyrosin der anderen Tyrosinkinase überträgt und so eine Reihe von intrazellulären Signalwegen aktiviert.

Dies sind der Ras/Raf/Mitogen aktivierte Protein Kinase (MAPK)-Pfad, die Aktivierung einer Serin- Threonin-Kinase sowie der Phospholipase C γ (PLC γ). Die Signalkaskaden bewirken eine Verstärkung des ursprünglichen Stimulus und führen unter anderem zu veränderter Genexpression [7].

Maligne Veränderungen können einerseits die intrazellulären Signalkaskaden betreffen, andererseits eine Überexprimierung der Rezeptoren und/oder eine autokrine Schleife hervorrufen. Analysen von soliden Tumoren ergaben, dass circa ein Drittel derer, welche epithelialen Ursprungs sind, eine Überexprimierung der EGF-Rezeptoren aufweisen. Diese führt zu einem verstärkten Wachstumsstimulus durch eine Hypersensibilität der Tumorzellen, bei normalen Mengen an Wachstumsfaktoren. Weitere Mutationen können zu einer Entkoppelung des Tumors von exogenen Wachstumsstimuli führen. So führt zum Beispiel die zusätzliche Expression des EGFR Liganden TGF α durch maligne Zellen zu einer autokrinen Schleife. Eine häufige Mutation des EGF-Rezeptors führt zum partiellen Verlust der extrazellulären Domäne und zu ligandenunabhängiger Autophosphorylation der intrazellulären Domäne. Diese maligne Variante des Rezeptors wird als EGFRvIII bezeichnet [8].

1.3 Lungenkarzinom

Nach dem Statistischen Bundesamt sind im Jahr 2013 in Deutschland 44.813 Menschen an Lungenkrebs gestorben, mehr als an Brust- und Dickdarmkrebs zusammen. Der größte Risikofaktor für die Entstehung von Lungenkrebs ist das Rauchen, denn über 80% der Erkrankungen sind auf Tabakkonsum zurückzuführen [9-11]. Die IARC (International Agency for Research on Cancer) hat circa 50 Karzinogene im Tabakrauch identifiziert [12]. Das Erkrankungsrisiko hängt von Dauer und Ausmaß des Zigarettenkonsums ab und kann durch Abstinenz wieder gesenkt werden [13]. Somit ist einer der wichtigsten Schritte im Kampf gegen Lungenkrebs die Prävention, durch Verzicht auf Zigaretten. Denn das relative 5-Jahres Überleben von Lungenkrebspatienten in Deutschland liegt bei 15% für Männern und 19% für Frauen [14].

Das Lungenkarzinom kann in histologische Subtypen unterteilt werden, jedoch sind bei einem Drittel der Tumore verschiedene histologische Anteile nachweisbar. In 15% der Fälle liegt ein kleinzelliges Lungenkarzinom vor, welches eine schlechte Prognose aufweist. Bei 80% der Erkrankten liegen Metastasen zum Zeitpunkt der Diagnose vor und die Tumorverdoppelungszeit liegt bei 10-50 Tagen. Das nicht-kleinzellige

Lungenkarzinom liegt in 85% der Fälle vor, von welchen circa 40% zu den Plattenepithel-, 35% zu den Adeno- und 10% zu den großzelligen Lungenkarzinomen gezählt werden. Plattenepithelkarzinome haben eine Tumorverdopplungszeit von ungefähr 300 Tagen, die der Adenokarzinome liegt bei 180 Tagen. Des Weiteren liegt bei weniger Patienten zum Diagnosezeitpunkt eine Metastasierung vor [15].

Die Therapie des Bronchialkarzinoms setzt sich vor allem aus der chirurgischen Behandlung, der Chemotherapie und der Strahlentherapie zusammen. Für jeden Einzelfall wird das optimale Vorgehen beraten und festgelegt. Das kleinzellige Bronchialkarzinom wird primär mit Radio- und Chemotherapie behandelt. Die nicht-kleinzelligen Bronchialkarzinome werden primär chirurgisch behandelt. Ist dies aus funktionellen Gründen nicht möglich, wird eine definitive Radiatio durchgeführt. Die Chemotherapie wird mit einer Cisplatin-basierten Kombination über vier bis sechs Zyklen durchgeführt. Im fortgeschrittenen Stadium wird die zusätzliche Gabe von Bevacizumab empfohlen, außer es liegt ein Plattenepithelkarzinom vor. Bei Tumoren die eine Mutation des EGF-Rezeptors aufweisen sind die Tyrosinkinaseinhibitoren Afatinib und Gefitinib wirksam und verlängern die Überlebenszeit der Patienten [6, 15]. Der EGFR-Antikörper Matuzumab wurde in klinischen Studien getestet, jedoch aufgrund zu geringer Wirksamkeit terminiert.

1.4 Der EGF-Rezeptor in der zielgerichteten Tumorthherapie

In der Therapie von soliden Tumoren epithelialen Ursprungs, welche in einem Erkrankungsstadium sind, in welchem eine zielgerichtete Therapie indiziert ist, sind vor der Gabe eines Medikaments Biomarker zu erheben, um ein passendes Therapeutikum zu wählen. Bei EGFR-positiven Tumoren sind zwei Medikamentenklassen zugelassen; Tyrosinkinase-Inhibitoren (TKIs) und monoklonale Antikörper.

Für die Behandlung des nicht-kleinzelligen Bronchialkarzinoms zum Beispiel mit dem TKI Gefitinib, ist der Nachweis einer aktivierenden Mutation des EGF-Rezeptors erforderlich, um von einer Wirksamkeit des TKI ausgehen zu können. Tyrosinkinase-Inhibitoren konkurrieren mit Adenosintriphosphat, um die ATP-Bindungsstelle der Tyrosinkinase, und inhibieren die Signaltransduktion durch reversible Bindung, wie Gefitinib oder durch irreversible Bindung an die intrazelluläre Domäne des EGF-Rezeptors, hier sei Afatinib genannt [6].

Neben den TKIs werden heutzutage zahlreiche Antikörper in der zielgerichteten

Therapie eingesetzt. Cetuximab ist ein rekombinanter chimärer Antikörper vom IgG1-Isotyp und der erste Antikörper, welcher 2006 zur Behandlung des metastasierten kolorektalen Karzinoms zugelassen wurde. Die Bindung des Antikörpers an die extrazelluläre Domäne des EGFR inhibiert die Signaltransduktion und induziert Antikörper-abhängige zelluläre Zytotoxizität (engl. antibody dependent cellular cytotoxicity, ADCC). Es konnte gezeigt werden, dass die Kombination von konventioneller Therapie mit Cetuximab zu einer signifikanten Verbesserung des progressionsfreien Überlebens führt [16]. Weitere Untersuchungen ergaben jedoch, dass bei Tumoren, welche eine aktivierende Mutation der intrazellulären Signalkaskade aufweisen, wie zum Beispiel im K-Ras (engl. Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog, K-Ras), Cetuximab nicht anspricht [17]. Aus diesem Grund wird Cetuximab nur für die Behandlung von kolorektalen Karzinomen empfohlen, welche ein K-Ras Wildtyp aufweisen [18].

In den Versuchen dieser Arbeit wurde der mAk Matuzumab verwendet. Matuzumab wurde gegen ein Polypeptid-Epitop der extrazellulären Domäne des EGF-Rezeptors erzeugt [19]. Es ist ein humanisierter Antikörper. Dies bedeutet, dass von dem Antikörper nur die hypervariablen Regionen murinen Ursprungs sind, der Rest menschlichen Ursprungs. Dadurch wird die Immunogenität verringert und die Wahrscheinlichkeit einer allergischen Reaktion auf das Medikament minimalisiert [20].

Die Bindung des Antikörpers an Domain 3 des EGFR hemmt partiell und nicht kompetitiv, durch eine sterische Konformationsänderung, die Bindung von EGF und damit die Dimerisierung der Rezeptoren, sowie die Signalübertragung [21, 22]. Neben der Inhibierung der Signalübertragung kann Matuzumab ADCC vermitteln. ADCC wird als wichtiger Bestandteil der Wirksamkeit von Antikörpern gesehen [23].

In Phase 2 klinischer Studien wurde das Medikament für Indikationen wie metastasiertes Kolorektaleskarzinom, Magenkarzinom und Nicht-kleinzelliges Lungenkarzinom getestet. Jedoch wurden in den Studien nicht die vordefinierten Ziele erreicht, was zur Beendigung der Weiterentwicklung von Matuzumab führte [24].

1.5 Monoklonale Antikörper

Die Vision Paul Ehrlich's einer „Magic Bullet“ führte nicht nur zu dem Syphilismedikament Salvarsan, sondern trieb die gezielte Entwicklung neuer Medikamente seit Anfang des 20. Jahrhunderts stark voran. Jedoch dauerte es

mehrere Jahrzehnte, bis Ehrlich's Seitenkettentheorie durch die Klon-Selektionstheorie von Talmage und Burnet 1957 vollendet wurde und die Idee einer „Magic Bullet“ in der ersten vollständigen Beschreibung eines Antikörpers durch Edelman et al. 1969 gipfelte [25-27]. Mit der Entwicklung der Hybridom-Technik durch Köhler und Milstein 1975 wurde es möglich größere Mengen an monoklonalen Antikörpern herzustellen. Hierfür fusionierten sie Myelomzellen mit Plasmazellen einer Maus und erhielten unsterbliche Hybridomazellen, welche einen spezifischen monoklonalen Antikörper produzierten [28]. Mit der Entwicklung der Methoden der Gentechnik kam es zu einer weiteren Beschleunigung im Bereich der Antikörperforschung. Heutzutage sind unzählige Antikörper entwickelt worden und viele sind ein wichtiger Bestandteil moderner Therapieverfahren [29].

1.6 Struktur von Antikörpern

Antikörper sind Glykoproteine, welche von aktivierten B-Zellen sezerniert werden. Sie sind die sezernierten Formen der transmembranösen Antigenrezeptoren und gehören zur Oberklasse der Immunglobuline (Ig). Es werden fünf Klassen der Antikörper anhand ihrer konstanten Region (engl. *C-region*) unterschieden. Dies sind: IgM, IgD, IgE, IgA und IgG. Die Antikörper der IgG Klasse können in vier Subklassen und die der IgA in zwei Subklassen untergliedert werden. Der strukturelle Aufbau der Antikörper wird an der Klasse der Immunglobuline G im Folgenden beschrieben [30].

IgG Antikörper sind die am häufigsten im Plasma vorkommenden Antikörper und haben eine Masse von ca. 150 kDa. Sie bestehen aus zwei verschiedenen Polypeptidketten, die schwere Kette (engl. *heavy (H) chain*) ist mit ca. 50 kDa doppelt so schwer wie die leichte Kette (engl. *light (L) chain*). Ein IgG Antikörper setzt sich zusammen aus zwei identischen schweren und zwei identischen leichten Ketten. Die schweren Ketten sind über zwei Disulfidbrücken miteinander verbunden und die leichten Ketten sind mit jeweils einer Disulfidbrücke mit einer schweren Kette gekoppelt. Die leichten und schweren Ketten sind so arrangiert, dass der Antikörper ungefähr die Form eines Y darstellt und die leichten Ketten mit den schweren die beiden kurzen Arme des Y bilden. An deren N-terminalen Ende sind die Antigen bindenden Regionen, welche auch variable Regionen genannt werden. Der lange Arm des Y wird durch die C-terminalen Enden der langen Ketten gebildet und interagiert mit den Effektoren. Dieser Teil des Antikörpers wird auch als konstante Region bezeichnet [30].

Es existieren zwei Typen der leichten Ketten, welche mit Lambda (λ) oder Kappa (κ) bezeichnet werden. Jeder Antikörper besitzt entweder zwei leichte Ketten des Typs λ oder κ . Es sind keine funktionellen Unterschiede bekannt, jedoch kann eine Abweichung des normalen Verhältnisses von 2:1 in der B-Zellpopulation Hinweis auf einen B-Zelltumor sein [30].

Die Aminosäuresequenz der Immunglobuline wurde wiederholt bestimmt und zeigte, dass jede Kette aus einer Serie sich wiederholender Sequenzen aufgebaut ist, welche sich ähneln aber nicht gleich sind. Diese Sequenzen sind ca. 110 Aminosäuren lang und falten sich zu kompakten tertiären Proteinstrukturen, welche durch das Ausbilden einer Disulfidbrücke eine Schleife pro Domäne bilden. Die leichten Ketten (L) bestehen aus einer variablen und einer konstanten Domäne, welche mit V_L und C_L bezeichnet werden. Die schweren Ketten (engl. heavy: H) der IgG-Klasse bestehen aus einer variablen und drei konstanten Domänen (V_H , C_{H1} , C_{H2} und C_{H3}) [30].

In einem kompletten IgG Antikörper arrangieren sich die Domänen, so dass sich drei gleich große quartäre Proteinstrukturen bilden, welche in der Gelenkregion miteinander verbunden sind. Durch das Enzym Papain können die quartären Proteinstrukturen voneinander getrennt werden, in zwei Fab-Fragmente und ein Fc-Fragment. Die Bezeichnung Fab leitet sich ab vom englischen: "*Fragment antigen binding*" also "Fragment Antigen bindend". Die Bezeichnung Fc vom englischen: "*Fragment crystallisable*" also "Fragment kristallisierbar". Die Fab-Fragmente bestehen aus V_L und V_H , welche die Antigen-bindende-Region bilden, und C_L welches über eine kovalente Bindung an C_{H1} gebunden ist. Das Fc-Fragment besteht aus C_{H2} und C_{H3} der schweren Ketten. Die Funktion und Isotyp des Antikörpers wird durch das Fc-Fragment bestimmt. Die V-Domänen sind im Vergleich zu den C-Domänen größer und besitzen eine extra Schleife. Die flexiblen Schleifen der V-Domänen bilden die Antigen-bindende-Region und diese kommt im menschlichen Körper mit einer Sequenzvariabilität von ungefähr 10^{16} vor [30].

1.7 Funktionen von Antikörpern

Die Wirkmechanismen von Antikörpern können unterteilt werden in Fab- und Fc-vermittelte Funktionen. Die Fab-vermittelten Effekte ergeben sich direkt aus der Bindung des Antikörpers an die Zielstruktur. Die Fc-vermittelten Funktionen ergeben sich aus der Interaktion des Fc-Teils, mit einem Rezeptor der Fc-Rezeptorfamilie.

Bindet das Fab-Fragment, von EGFR-Antikörpern wie Cetuximab oder Matuzumab, an

seine Zielstruktur, wird die Ligandenbindung blockiert. Im Falle von Matuzumab geschieht dies durch sterische Konfirmationsänderung des Rezeptors und bei Cetuximab durch Überlappung der Epitope vom EGF und Antikörper. Die Bindung durch den Antikörper führt zusätzlich zur direkten Signalinhibierung zur Internalisierung des Rezeptors, wodurch die Signaltransduktion auch reduziert wird [31].

Das Fc-Fragment eines Antikörpers weist klassenabhängige Isotypen auf, welche zu verschiedenen Funktionen der Antikörper beitragen. So besteht zum Beispiel für IgG-Antikörper nicht die Plazentaschranke, da diese durch die Interaktion ihres Fc-Fragments mit dem FcRn (neonataler Fc-Rezeptor) diese überwinden können.

Die Interaktion des Fc-Teils mit Fc-Rezeptoren auf Effektorzellen (d.h., NK-Zellen, $\gamma\delta$ T-Zellen und Makrophagen) induziert unter anderem ADCC und/oder Phagozytose [23]. Die Aktivierung des Komplementsystems durch IgG-Antikörper ist unter anderem abhängig von der Antigendichte und der IgG-Subklassen. Jedoch kann durch Veränderung der Glykosylierung der Aminosäure Asparagin 297, oder durch zwei Punktmutationen in der CH2 Domäne des Fc-Teils, die Bindungsaffinität zu C1q erhöht werden. Die Punktmutationen an den Positionen K326A und E333A der CH2 Domäne, wo die Aminosäuren gegen Alanin ausgetauscht werden, erhöht nicht nur die Bindungsaffinität zu C1q, sondern auch die Rekrutierung des Komplementsystems [32, 33].

1.8 Fc-Rezeptoren

Die meisten Fc-Rezeptoren sind genetisch Teil der Superfamilie der Immunglobuline. Sie binden den Fc-Teil eines Antikörpers, wobei die Bindungsdomäne des Rezeptors nur eine oder ähnliche Subklassen von Immunglobulinen bindet. Die meisten Fc-Rezeptoren setzen sich zusammen aus mehreren Untereinheiten. Die Rezeptoren Fc γ RI (CD64) und Fc γ RIII (CD16) bestehen aus einer α -Kette, die den Antikörper bindet, und einer γ -Kette, welche die Signaltransduktion bewirkt. Der Fc γ RII (CD32) besteht aus nur einer α -Kette, welche jedoch intrazellulär eine γ -Domäne aufweist. Diese Fc γ R binden IgG Antikörper, sie weisen jedoch unterschiedliche Affinität zu den IgG Subklassen auf. Zusätzlich können die Fc-Rezeptoren in hoch-affine (Fc γ RI) und niedrig-affine (Fc γ RIII, Fc γ RII) Rezeptoren eingeteilt werden [30, 34].

Der Fc γ RI wird von dendritischen Zellen, Makrophagen sowie von neutrophilen und eosinophilen Zellen exprimiert. Die Bindung eines IgG Antikörpers an den Rezeptor

stimuliert die Zelle, führt zur Phagozytose und induziert den respiratorischen Burst sowie ADCC [30].

Der Fc γ R1IA wird zusätzlich zu den Makrophagen, neutrophilen und eosinophilen Zellen von Langerhans Zellen und Thrombozyten exprimiert. Auch dieser Rezeptor bindet alle IgG Subklassen, wodurch Phagozytose oder Degranulation ausgelöst wird. Die weiteren Fc γ R1I haben inhibitorische Effekte und tragen zur Regulation der Immunreaktion bei [30].

Der Fc γ R1III wird von NK-Zellen, eosinophilen, neutrophilen Zellen und Mastzellen sowie von Makrophagen exprimiert. Der Rezeptor bindet IgG1 und IgG3 Antikörper mit gleicher Affinität. Die Aktivierung des Rezeptors bewirkt unter anderem Degranulation. Im Falle der NK-Zellen wird über den Fc γ R1III ADCC vermittelt [30].

1.9 Das Komplementsystem

Im Jahre 1895 begann Jules Bordet ein Phänomen genauer zu untersuchen, welches Richard Pfeiffer ein Jahr zuvor entdeckt hatte. Er erforschte die Bakteriolyse von Choleraerregern, welche in die Bauchhöhle von immunisierten Meerschweinchen gespritzt wurden. Bordet fand heraus, dass Hitze instabile Komponenten des Blutplasmas, die Opsonisierung und Tötung von Bakterien durch Antikörper vermehrt. Paul Ehrlich griff die Erkenntnisse Bordets auf und prägte den Begriff des „Complements“ unter anderem in Abhandlungen „Ueber Hämolyse“ [35-38].

Heutzutage ist bekannt, dass das Komplementsystem sich als Teil des angeborenen Immunsystems entwickelt hat und aus über dreißig verschiedenen Proteinen besteht, welche hauptsächlich in der Leber produziert werden. Das Komplement ist ein Bindeglied zwischen dem angeborenen und erworbenen Immunsystem. Es spielt eine zentrale Rolle in der Erregerabwehr durch Opsonierung von Pathogenen sowie durch Bildung von Anaphylatoxinen, welche Chemotaxis bewirken und Leukozyten aktivieren [30].

Bis heute sind drei Wege der Aktivierung des Komplementsystems entdeckt worden. Sie alle münden in einer gemeinsamen Endstrecke, welche zur Bildung des „*membrane-attacking-complex*“ (MAC) führt. Zuerst wurde der klassische Weg (engl. classical pathway, CP) der Aktivierung entdeckt, dieser wird durch Antikörper getriggert. Dann der alternative Weg (engl. alternative pathway, AP), welcher durch spontane Hydrolyse von C3 beginnt. Und zuletzt der Lektin Weg (engl. lectin pathway, LP), dieser wird durch charakteristische Zuckerketten auf Bakterien in Gang gesetzt [30].

Die Proteine des Klassischen Weges bis zum MAC werden mit C und einer Zahl bezeichnet. Der Großbuchstabe C kommt vom englischen Wort **components** und die Zahl zeigt die Reihenfolge der Entdeckung an. Die Reihenfolge der Kaskade ist: C1, C4, C2, C3, C5, C6, C7, C8 und C9. Die Komponenten liegen im Plasma als Proenzyme (Zymogen) vor. Nach aktivierender Spaltung wird das große Spaltprodukt, meist eine Serinprotease, mit dem Suffix Buchstaben b (engl. **big**) und das kleine mit dem Buchstaben a (engl. **small**) gekennzeichnet. Eine Ausnahme von diesem System bildet C2. Außerdem wurde eine Erweiterung der Nomenklatur für C1 eingeführt. Die drei verschiedenen Untereinheiten, welche zusammengesetzt C1 ergeben, werden mit C1q, C1r und C1s bezeichnet. C1 besteht aus C1q und jeweils zwei Einheiten C1r und C1s [30].

Die Aktivierungskaskade des Klassischen Weges beginnt mit der Bindung von C1q. Es kann direkt an Strukturen auf Bakterienoberflächen binden oder über das C-reaktive Protein. Hauptsächlich bindet C1q jedoch an den Fc-Teil von Antikörpern, welche an ein Pathogen gebunden sind. Die Bindung von C1q bewirkt, dass C1r C1s spaltet und so die C1s Protease aktiviert wird. C1s spaltet C4 und C2. Aus deren Spaltprodukten bildet sich die klassische C3-Konvertase, welche aus C4bC2a besteht und C3 spaltet. C2b und C4b binden außerdem kovalent an Pathogene und wirkt als Oponin, des Weiteren bindet C4b C2, sodass es von C1s gespalten wird und die C3-Konvertase entsteht. Die klassische C5-Konvertase wiederum wird durch C4bC2aC3b gebildet. C2a spaltet C3 und C5. C3b bindet an die Oberfläche von Pathogenen und markiert diese als fremd und bindet C5, sodass C5 von C2a gespalten wird. C5b ist das erste Protein des MAC, welches aus C5b, C6, C7, C8 und 10-16 C9 Molekülen aufgebaut ist. C5b bindet C6, der C5b6 Komplex bindet C7. Dies führt zu einer Konformationsänderung des Komponenten C7 wodurch eine hydrophobe Stelle freigelegt wird, welche sich in die Zellmembran des Pathogen einfügt. Die Bindung von C8 an den C5b67 Komplex legt einerseits eine hydrophobe Stelle des Komponenten frei, welche sich in die Zellmembran einfügt, andererseits führt C8 zur Anlagerung, Konformationsänderung und Polymerisation von C9. Der MAC bildet so eine ca. 10 nm, im Durchmesser messende Pore in der Zellmembran [30].

Die Proteine des alternativen Weges werden Faktoren genannt und mit den Großbuchstaben B, D und P bezeichnet. Der Alternative Weg der Komplementaktivierung setzt einen „tickover“, das heißt die spontane Hydrolyse von C3 in C3(H₂O). Hierbei wird die Thioesterbindung des C3 Komponenten hydrolysiert, sodass C3(H₂O) Faktor B binden kann. Faktor B kann daraufhin von Faktor D in Bb

und Ba gespalten werden. Diese im Plasma spontan vorliegende aktivierte Konvertase aus C3(H₂O)Bb spaltet C3 in C3a und C3b.

Viele der Spaltprodukte werden direkt wieder inaktiviert durch Hydrolyse, jedoch werden auch C3b Komponenten über ihre Thioesterbindung kovalent an ein Pathogen gebunden. Es kommt zu einer Akkumulation von C3b und C3a, womit der Alternative Weg auch eine Aktivierungsschleife darstellt. Die Bindung von zwei Molekülen C3b mit dem Faktor Bb ergibt eine weitere C5-Konvertase, welche mit C3b₂Bb bezeichnet wird [39].

Der Lektin Weg kann durch vier Rezeptoren, welche im Blut zirkulieren und vom Aufbau C1q ähneln, aktiviert werden. Zuerst wurde das Mannose-bindende-Lektin Molekül (MBL) entdeckt, nach welchem dieser Weg der Komplementaktivierung benannt ist. Später wurde festgestellt, dass auch drei Ficoline die Aufgabe des „Pattern-Recognition-Rezeptor“ (PRR) übernehmen und die MBL-assoziierte-Serin-Protease 1 und 2 (MASP-1, MASP-2) binden sowie aktivieren kann. Diese PRR erkennen unterschiedliche Moleküle auf pathogenen Keimen. MBL hat eine hohe Avidität für Mannose und Fukose, die Ficoline für Oligosaccharide, welche acetylierte Zucker beinhalten.

Die Bindung dieser PRR an die Oberfläche von Bakterien oder Pilzen führt zu einer Konformationsänderung in einer gebundenen MASP-2, welche dann eine zweite MASP-2 des gleichen Komplexes spalten und so aktivieren kann. Diese aktivierte MASP-2 spaltet C4 und C2 um die C3-Konvertase C4b2a zu produzieren. Die MASP-1 kann direkt C3 spalten, wenn auch weniger effizient als C4b2a [40].

Um körpereigene Zellen vor einer Zerstörung durch das Komplementsystem zu schützen, gibt es mehrere membrangebundene komplementregulierende Proteine (engl. membrane bound complement regulatory proteins, mCRP). Dies sind CR1, CD46, CD55 und CD59. CR1 und CD46 führen zum schnellen Abbau der Faktoren, von C3b und C4b zu iC3b und iC4b, wodurch die Bildung weiterer C3- und C5-Konvertasen verhindert wird. CD55 hingegen beschleunigt den Abbau von C3- und C5-Konvertasen. CD59 verhindert die Bildung des MAC durch Bindung an C8 und C9, während der Formation des MAC. Die löslichen Faktoren H und I werden zum Schutz vor Komplementaktivierung von Zellen sezerniert und inhibieren C1 [30, 41].

1.10 Komplement-Rezeptoren

Neben der Zellyse durch den MAC und der Entzündungsregulierung durch

Anaphylatoxine bewirkt das Komplementsystem eine verstärkte Phagozytose, durch Interaktion mit den Komplement-Rezeptoren (CR): CR1, CR2, CR3, CR4 und CR1g. Die Opsonine vor allem C3b und seinen proteolytischen Abkömmlinge interagieren mit Komplement Rezeptoren (CR) und stimulieren Phagozytose.

Der Komplement-Rezeptor 1 (CR1) ist unter anderem auf Erythrozyten, Makrophagen, MNCs, PMNs und Leukozyten vorhanden. Der auch als CD35 bezeichnete Rezeptor bewirkt einerseits eine Inhibierung der Komplementkaskade durch Verstärkung des Abbaus von C3b und C4b. Andererseits bewirkt der CR1 eine Stimulation der Phagozytose, bei Bindung von C3b und C4bi, wenn die Effektorzelle zusätzlich mit C5a stimuliert wird [30].

Der CR2 Rezeptor sitzt hauptsächlich auf B-Zellen und follikulär-dendritische Zellen. Der CR2, auch als CD21 bezeichnet, ist ein Ko-Rezeptor des B-Zellrezeptors und beteiligt an der B-Zellaktivierung. Von den Spaltprodukten der Komplementkaskade bindet er C3d und iC3b [30, 42].

Der CR3 wird von Makrophagen, MNCs, PMNs, Leukozyten und dendritischen Zellen exprimiert. CR3 setzt sich zusammen aus CD11b und CD18 und gehört zur Familie der Integrine. Der Rezeptor vermittelt nicht nur Phagozytose sondern ist auch für die Adhäsion und Migration von Immunzellen mit verantwortlich. Durch Stimulierung der Zelle kann die Spezifität des Rezeptors sowie das Vermögen Phagozytose zu induzieren reguliert werden. CR3 bindet nicht nur fixiertes iC3b sondern auch Fibrinogen, intrazelluläres Adhäsionsmolekül-1 (engl. Intercellular Adhesion Molecule 1, ICAM1) und Zellstrukturen von Pathogenen Keimen, wie zum Beispiel Lipopolysaccharide [30, 43].

Der CR4 (CD11c/CD18) gehört auch zur Familie der Integrine und wird auf dendritischen Zellen, Makrophagen MNCs und PMNs exprimiert. Der CR4 vermittelt hauptsächlich Phagozytose durch Bindung des Liganden iC3b [30].

1.11 Anaphylatoxine

Die Spaltprodukte C3a, C4a und C5a der Komplementkaskade werden allgemein als Anaphylatoxine bezeichnet. Anaphylatoxine rufen unter anderem allgemeine Entzündungsreaktionen hervor. Sie führen zur Kontraktion glatter Muskulatur, erhöhen die Permeabilität kleiner Gefäße und regulieren mit die Migration von Effektorzellen. C4a hat verglichen mit C3a und C5a geringe inflammatorische Aktivität, jedoch führt C4a zur Inhibierung der chemotaktischen Migration von Monozyten [30, 44, 45]. C3a

und C5a haben eine Vielzahl an regulatorischen Eigenschaften welche im Folgenden skizziert werden.

Die Anaphylatoxine C3a und C5a vermitteln ihre Effekte durch Bindung an G-Proteingekoppelte Rezeptoren. Dies sind der C3a Rezeptor (C3aR), der C5a Rezeptor und der C5a Rezeptor like-2 (C5L2). Die Stimulation von Makrophagen, neutrophilen und eosinophilen Granulozyten über diese Rezeptoren führt unter anderem zum oxidativen Burst, welcher den Zellen hilft phagozytierte Mikroorganismen abzutöten und zu zerlegen. Beim Oxidativem Burst wird die NADPH Oxidase aktiviert, welche Sauerstoffradikale in den Phagosomen produziert. Die Stimulierung von basophilen Granulozyten und Mastzellen der Haut durch C3a oder C5a führt zur Freisetzung von Histamin [46, 47]. Die Stimulierung dieser Rezeptoren auf aktivierten B-Zellen und Monozyten führt zur Produktion und Sekretion von IL-6 und TNF α [48]. Neben diesen entzündungsregulierenden Effekten sind C3a und C5a mitverantwortlich für die Ausbildung von Adhäsionsmolekülen der Endothelzellen und C5a ist verantwortlich für Chemotaxis von Makrophagen, neutrophilen und basophilen Granulozyten sowie aktivierten B- und T-Zellen. Mastzellen hingegen migrieren hin zu höherer Konzentration von C3a [30, 47].

1.12 Motivation und Fragestellung

Die Entwicklung neuer Medikamente im Bereich der zielgerichteten Krebstherapie birgt viel Hoffnung für Patienten, jedoch ist die Wirksamkeit vieler Medikamente limitiert. Ein besseres Verständnis des komplexen Zusammenspiels zwischen Effektorzellen des Immunsystems und dem Komplementsystem, ermöglicht die Wirksamkeit von therapeutischen Antikörpern zu optimieren und Therapieverfahren besser zu steuern.

In dieser Arbeit wird ein EGFR-Antikörper vorgestellt, welcher das Komplementsystem rekrutieren kann. Es werden die immunologischen Effektormechanismen des EGFR-gerichteten Antikörpers Matuzumab und einer Komplementsystem optimierten Variante des Antikörpers genauer analysiert und verglichen. Matuzumab ist ein humanisierter IgG1 Antikörper, welcher gegen den EGF-Rezeptor gerichtet ist und ADCC vermittelt. Durch den Austausch zweier Aminosäuren im Fc-Teil des Antikörpers wird die Aktivierung des Komplementsystems durch den Antikörper ermöglicht, die Vermittlung von ADCC bleibt jedoch bestehen. Da sich die Bindungsstellen für C1q und für leukozytäre Fc γ - Rezeptoren am Fc- Teil des Antikörpers räumlich überlappen,

Einleitung

ist eine mögliche gegenseitige Beeinträchtigung von ADCC und CDC von Interesse. Des Weiteren werden durch Ablauf der Komplementkaskade Anaphylatoxine und Opsonine freigesetzt. Die Art und Weise sowie das Ausmaß der regulatorischen Effekte dieser Spaltprodukte auf Effektorzellen-vermittelten ADCC soll durch in vitro Versuche genauer analysiert werden.

Material und Methoden

2.1 Blutspender

Die durchgeführten Versuche im Rahmen dieser Arbeit sind der Ethik Kommission der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel gemeldet und im Einklang mit der Deklaration von Helsinki genehmigt worden. Die verwendeten Blutprodukte stammen von gesunden Freiwilligen. Die Probanden wurden randomisiert ausgewählt, aus einer Datenbank des Forschungslabors. Es liegen Einverständniserklärungen der Probanden zur wissenschaftlichen Verwendung und Analyse ihres Blutes vor.

2.2 Verwendete Materialien

Alle Materialien, von Reagenzien bis zu verwendeten Geräten, die in den Versuchen dieser Arbeit verwendet wurden, sind mit genauer Bezeichnung im Anhang in den Tabellen A1-A3 aufgeführt.

2.3 Verwendete Zielzellen und ihre Kultivierung

Für die beschriebenen Versuche wurden hauptsächlich A431 Zellen als Zielzellen verwendet. Die Zelllinie A431 (DSMZ, Braunschweig, Deutschland) geht aus einem Plattenepithelzellkarzinom hervor und zeichnet sich durch eine Überexpression von EGF-Rezeptoren aus. Die Zellen wurden im Brutschrank bei 37°C und 5% CO² in Kulturflaschen mit RPMI 1640 (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) Nährmedium kultiviert. Des Weiteren verwendete Zelllinien sind A1207 (National Cancer Institute, NIH, Bethesda, MD) und DiFi Zellen (ECACC, Salisbury, UK). Die A1207 Zellen sind Glioblastomzellen und die DiFi Zelllinie entstammt einem kolorektalen Karzinom. Sie wurden bei gleicher Temperatur und Kohlendioxid Gehalt wie die A431 Zellen kultiviert, jedoch in DMEM Medium (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA). Den Nährmedien wurde 10% (v/v) Hitze-inaktiviertes fetales Kalbsserum sowie 100 U/ml Penicillin und 100 µg/ml Streptomycin beigesetzt.

Die Kultivierung der humanen Krebszelllinien wurde unter sterilen Bedingungen unter Benutzung von Kunststoffeinmalprodukten durchgeführt. Zur Überprüfung der Zellkulturen auf mögliche Verunreinigungen durch Mykoplasmen wurden sie in regelmäßigen Abständen mittels MycoAlert®, Mycoplasma Detection Kit untersucht. Im Falle einer Verunreinigung wurden die Zellen entweder entsorgt oder für 14 Tage

mit Ciprofloxacin (Ciprobay®, Bayer Vital GmbH, Leverkusen) behandelt.

Die adherent wachsenden Zellen wurden zur Entnahme für Versuche oder zum Splitten wie folgt, unter sterilen Bedingungen, behandelt. Das Nährmedium wurde entnommen und die Zellen einmal mit 10ml Phosphat gepufferter Saline (PBS) gewaschen. Zum Lösen der Zellen erfolgt die Zugabe von 1-2ml Trypsin (0,05%). Nach 30 Sekunden Einwirkzeit wurden die Zellen durch Klopfen vollständig gelöst und in Nährmedium aufgenommen.

Zum Zählen der Zellen wurden 10µl der homogenen Zellsuspension in 90µl Trypanblau gegeben und gut durchmischt. Von dieser Suspension wurden 10µl in eine Neubauer-Zählkammer gegeben, die vier Quadranten der Zählkammer ausgezählt, und die Gesamtzahl durch vier geteilt, um den Mittelwert der Zellanzahl pro Quadrant zu ermitteln. Dieser wird dann mit dem Verdünnungsfaktor des Trypanblau und mit dem Faktor 10 000 multipliziert, um die Zellzahl pro Milliliter zu ermitteln. Als Formel geschrieben:

$$\frac{\text{Zellzahl}}{\text{ml}} = \frac{\text{Zellzahl aus 4 Quadranten} \times \text{Verdünnungsfaktor} \times 10.000}{4}$$

Um die gewünschte Zellzahl für einen Versuch der Suspension zu entnehmen, teilt man die gewünschte Anzahl durch die Anzahl der Zellen der Suspension pro Milliliter und erhält die Volumenmenge, welche zu entnehmen ist. Um die gewünschte Konzentration pro Milliliter zu erlangen, können die Zellen ab zentrifugiert und im gewünschten Volumen resuspendiert werden.

Eine Million Zellen werden in der Kulturflasche wieder ausgesät und mit 20ml neuem Nährmedium versorgt. Ist das Nährmedium verbraucht, zeigt sich dies im Farbumschlag von rot nach gelb, da das Nährmedium Phenolrot enthält. Bei einer Konfluenz von ca. 95% wurden die Zellen im Verhältnis 1:10 gesplittet.

2.4 Verwendete Antikörper

Es wurde zum einen der Matuzumab (H425, Patent WO 92/15683) Antikörper der Firma Merck (= H425 wt) verwendet. Es ist ein humanisierter monoklonaler Antikörper der Klasse G1, welcher gegen den EGF-Rezeptor gerichtet ist.

Zum anderen wurde eine mutierte Variante des H425 Antikörpers verwendet (H425mt). Die mutierte Variante beinhaltet zwei Punktmutationen, welche an Position K326A und

E333A des Fc-Teils in der CH2 Domäne zum Austausch der Aminosäuren mit Alanin führen.

Folgende weitere Antikörper sind in den Versuchen verwendet worden: Panitumumab (Vectibix®; Amgen, Thousand Oaks, USA), ein humanisierter IgG2 Antikörper, welcher gegen den EGF-Rezeptor gerichtet ist

Außerdem wurde der 225-IgA2 verwendet. Dieser Antikörper ist aufgebaut aus den variablen Regionen der schweren und leichten Ketten (engl. VH und VL regions) des Cetuximab (C225) Antikörpers und den konstanten Regionen (engl. CH regions) eines IgA2 Antikörpers. Der Antikörper 225-IgA2 ist somit auch gegen den EGF-Rezeptor gerichtet.

Als irrelevanter Kontrollantikörper wurde der IgG1 Antikörper Rituximab verwendet. Des Weiteren wurden irrelevante Antikörper der Klasse G1, G2 und A2 von Alpha Diagnostic Intl. Inc, San Antonio, TX, USA als Kontrollantikörper verwendet.

2.5 Produktion und Aufreinigung von H425-wt und H425-mt

Zu Beginn der beschriebenen Arbeit lagen sowohl H425-wt als auch H425-mt-stabil produzierende CHO-K1 Zellen vor. Die Zellen wurden wie im Folgenden kurz beschreiben generiert: Die CHO-K1-zellen wurden zuerst mit Vektoren, kodierend für leichte und schwere Kette der Antikörper, mittels Lipofektion transfiziert. Anschließend erfolgte eine Selektion mit MSX (engl. Methionine Sulfoximine) zur Generierung stabiler Ak-produzierender Einzelzellklone. Die verschiedenen Einzelzellklone wurden daraufhin auf ihre Produktivität hin untersucht, wobei die effektivsten zur Produktion der im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Antikörper, H425wt und H425mt, dienten. Zur Produktion der Antikörper wurde Zellkulturüberstand der jeweiligen Ak-stabil produzierenden Einzelzellklone über einen Zeitraum von vier bis sechs Wochen gesammelt, zentrifugiert, steril-filtriert und der pH-Wert auf 8 eingestellt. Im Anschluss wurden die Antikörper zunächst unter Verwendung einer anti-humanen-Kappa Leicht-Ketten-Affinitätschromatographie aufgereinigt.

Zur weiteren Aufreinigung wurde eine Größenausschlusschromatographie, Gelfiltration, der Firma Bio-Rad genutzt, um monomere Antikörper zu präparieren und Multimere / Aggregate zu entfernen. Während einer Gelfiltration wandern Proteine je nach Größe und Ladung mit unterschiedlicher Geschwindigkeit[49] und können so aufgetrennt werden. Die Gelfiltration Chromatographie wurde auf einem ÄKTA Purifier (GE Healthcare) durchgeführt mit einem Superdex 200 10/300GL Kolumn (GE Healthcare). Zudem wurde ein Phosphat gepufferte Salzlösung (PBS) als Puffer

genutzt, bei einer konstanten Laufgeschwindigkeit von 0,25 ml/min. Hundertmikrogramm des Antikörpers oder der folgenden Eichproteine wurden in einem Volumen von 1.0 ml PBS gelöst. Ferritin (440kDa), humaner IgG1 (150 kDa), Conalbumin (75 kDa) und Ribonuclease A (13.7 kDa) wurden zum Kalibrieren genutzt. Die Daten wurden mit der Software Unicorn 5.1 analysiert (GE Healthcare).

2.6 Automatisierte Gelelektrophorese

Zur quantitativen Analyse und Überprüfung der Reinheit wurden die Antikörper regelmäßig mittels Automatisierter Kapillarer Elektrophorese auf einem Experion System (Bio-Rad) nach Hersteller Angaben untersucht. Zudem ermöglichte das Experion-system eine Kalkulation der jeweiligen Antikörperpräparation nach Produktion.

2.7 Durchflusszytometrische Analyse

Zur Überprüfung der Bindungs- und Anlagerungsfähigkeit der verwendeten Antikörper sowie zum Untersuchen der Expressionsmuster wurden der durchflusszytometrischen Analysen verwendet.

Zur indirekten durchflusszytometrischen Analyse wurden 1×10^5 Zellen für 30 Minuten bei 4°C mit den Primärantikörpern, H425 wt (0-50 µg/ml), H425 mt (0-50 µg/ml), anti-cC1qR (20 µg/ml; Abcam, Cambridge, UK) oder einem irrelevanten Kontrollantikörper inkubiert. Bevor der Sekundärantikörper hinzugefügt wurde, wurden die Zellen dreimal mit PBS gewaschen und bei 1800 rpm für 3 Minuten bei 4°C zentrifugiert. Der Sekundärantikörper ist ein FITC-konjugiertes Ziege-Anti-Maus Fc γ Fragment-spezifisches F(ab)₂ (Jackson Immunoresearch Laboratories, West Grove, PA).

Zur direkten durchflusszytometrischen Analyse wurden 1×10^5 Zellen für 30 Minuten bei 4°C in der Gegenwart von humanem IVIg (Intratect®, Biotest AG, Dreieich, Germany) mit CD93-PE (Biolegend, San Diego, CA, USA), FITC-konjugiertem Maus-Anti-Human gC1qR (Abcam), CD35-FITC (Beckman Coulter, Krefeld, Germany), CD11b-FITC (Beckman Coulter), CD11c-PC7 (Beckman Coulter), CD21-PB (Beckman Coulter), PE- konjugiertem Maus- Anti-Human C5L2 (Biolegend), CD88-FITC (Biolegend), PE- konjugiertem Maus- Anti-Human C3aR (Biolegend), CD16-PE (Beckman Coulter), CD32-PE (Beckman Coulter), CD64-PE (Beckman Coulter) oder irrelevanten Kontrollantikörpern inkubiert.

Die Veränderung der Expressionsmuster der Komplementrezeptoren (CRs) oder Fc γ -Rezeptoren durch Stimulierung der PMNs mit C5a, GM-CSF oder GM-CSF und C5a wurde zeitabhängig (0-180 Minuten) nach Stimulus untersucht. Die PMNs wurden mit 100ng/ml humanem C5a (Complement Technology, Tyler, TX, USA), GM-CSF (50 U/ml) oder einer Kombination von C5a und GM-CSF stimuliert. Die relative Fluoreszenz Intensität (RFI) wurde durch folgende Formel berechnet:

Mittlere Fluoreszenz Intensität (MFI) EGFR-Ak. / MFI Kontrollantikörper

Bevor die Zellen im Durchflusszytometer (Navios; Beckman Coulter, Fullerton, CA) analysiert wurden, wurden sie dreimal mit kaltem PBS gewaschen und bei 1800 rpm für 3 Minuten bei 4°C zentrifugiert. Danach in 500 μ l kaltem FACS-Puffer (+1% PFA) resuspendiert. Die Proben wurden im Anschluss im EPICS-Durchflusszytometer der Firma Beckman Coulter analysiert.

2.7.1 Komplementanlagerung

Die antikörpervermittelte Anlagerung von C1q an A431 Zellen wurde mittels indirekter Immunfluoreszenz untersucht. Hierfür wurden 1.5×10^5 Zellen mit H425wt, H425mt oder einem Kontrollantikörper für 15 Minuten bei 4°C mit einer Antikörperkonzentration von 10 μ g/ml inkubiert.

Anschließend wurde 25% v/v humanes Serum, welches mit Eculizumab (50 μ g/ml; Alexion Pharmaceuticals, Cheshire, CT, USA) vermischt ist, hinzugegeben und die Vergleichskontrolle blieb unbehandelt. Nach Hinzugabe des Serums wurden die Zellen für 10 Minuten bei 37°C inkubiert und anschließend dreimal mit kaltem PBS gewaschen. Nach dem Waschen wurden in einer Konzentration von 10 μ g/ml polyklonaler FITC-konjugierter anti-human C1q oder C4b(c) (beides DAKO, Eching, Germany) oder Maus anti-Human (i)C3b mAk (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA USA), oder mit Maus anti-Human Faktor Bb oder C5b-9 mAk beides Quidel, San Diego, CA) gefolgt von der Färbung mit FITC-konjugiertem Ziege anti-Maus Fc γ Fragment-spezifisch F(ab) $_2$ (Jackson Immunoresearch Laboratories, West Grove, PA) hinzugegeben. Es folgt die Inkubation bei 4°C für eine Stunde mit anschließendem dreimaligen Waschen mit kaltem PBS. Zur durchflusszytometrischen Analyse wurden die Zellen in 500 μ l FACS-Puffer suspendiert. Die Proben wurden im Anschluss im EPICS-Durchflusszytometer der Firma Beckman Coulter analysiert.

2.7.2 Untersuchung von Anaphylatoxin Freisetzung

Die Freisetzung von Anaphylatoxinen durch Ablauf der Komplementkaskade wurde quantitativ untersucht. Hierfür wurde auf eine 96-Well-Platte frisches humanes Plasma (25% v/v) mit 25µg/ml Lepirudin (Refludan; Pharmion, Hamburg, Deutschland) versetzt und 10 µg/ml H425 mt oder ein irrelevanter Kontrolantikörper und RPMI 1640 (10% FCS) hinzugegeben. Für die Negativkontrollen wurden die Zielzellen nur mit RPMI 1640 (10% FCS) inkubiert. Das Experiment wurde gestartet durch Zugabe von 5×10^4 A431 Zellen in 50 µl Nährmedium, so dass das Endvolumen 200µl/Well beträgt. Nach dreistündiger Inkubation bei 37°C wurden die Platten abzentrifugiert und die Überstände mittels Human Anaphylatoxin Kit (BD Biosciences, San Diego, CA) nach Herstellerangaben durchflusszytometrisch analysiert.

2.8 Gewinnung humanem Serums und Effektorzellen

Das verwendete Blut stammt von Spendern, welche aus einer Datenbank des Forschungslabors des Mildred-Scheel-Hauses rekrutiert wurden. Des Weiteren wurden gesunde Spender rekrutiert, welche zuvor aus medizinischen Gründen mit G-CSF behandelt wurden. Alle Spender spendeten freiwillig und haben der Verwendung und Untersuchung des Blutes für Forschungszwecke schriftlich zugestimmt.

2.8.1 Aufreinigung humanen Serums

Das venöse Blut wurde in Serumröhrchen (weiße Saarestedt Monovette) aufgenommen und 20min auf Eis gelagert. Nach 20min wurden die Monovetten bei 4°C für 20min bei 2500U/min zentrifugiert. Nach dem Abzentrifugieren wurde das Serum von den koagulierten Bestandteilen getrennt und auf Eis gelagert oder in Aliquots von 2,5ml bei -80°C eingefroren und zum benötigten Zeitpunkt auf Eis aufgetaut.

2.8.2 Aufreinigung humaner Leukozyten

Mittels Dichtegradientenzentrifugation wurden folgende Fraktionen der Leukozyten isoliert: Monomorphnukleären Zellen (MNC), bestehend aus NK-Zellen und Lymphozyten sowie deren Vorläuferzellen und polymorphnukleäre Zellen (PMN), bestehend aus neutro-, eosino- und basophilen Granulozyten.[50]

Hierfür wurde Citrat-Blut auf einen diskontinuierlichen Percoll-dichtegradienten (63%

und 70% Percoll) geschichtet. Nach Zentrifugation über 20min bei 2500U/min ohne Bremse wurden die MNC und die PMN vorsichtig abpipettiert. Die MNC bilden eine Grenzschicht zwischen Plasma und 63% Percoll die PMN-Fraktion zwischen dem 63% Percoll und dem 70% Percoll.

Die MNC und PMN wurden in 50ml Flacons überführt und mit 1xPBS aufgefüllt und dann bei 1800U/min für 5min ohne Bremse zentrifugiert. Die MNC's bilden ein Pellet, der Überstand wurde verworfen und die Zellen in RPMI 1640 Nährmedium aufgenommen. Zur weiteren Aufbereitung der PMN's wurde der Überstand vorsichtig abgekippt und dann dreimal eine hypotone Erythrozytenlyse mit kaltem destillierten Wasser und PBS (x10) durchgeführt. Nach der Erythrozytenlyse wurden die PMN's in RPMI 1640 Nährmedium aufgenommen. Anschließend wurde mittels Trypanblaufärbung auf eine Vitalität von mindestens 95% der Zellen geprüft und die gewünschte Konzentration der Zellen pro Milliliter eingestellt.

2.8.3 Isolation von Monozyten und Natürlichen Killerzellen

Aus der Fraktion der MNCs wurden Monozyten und NK-Zellen mittels indirekt magnetisch aktivierter Zellsortierung (MACS) isoliert. Die Isolierung der Zellen wurde nach Protokoll des Herstellers durchgeführt. (NK cell isolation Kit, Order no. 130-092-657; Monocyte Isolation Kit II, Order No. 130-091-153; Miltenyi Biotec Inc., Auburn, CA, USA).

2.9 Zytotoxizitätstests

Die Fähigkeit der zu untersuchenden Antikörper zur Induktion von Komplement-vermittelter Zytotoxizität (CDC), Antikörper-abhängiger zellulärer Zytotoxizität und Komplement-abhängiger zellvermittelter Zytotoxizitätstests (CDCC) wurde mittels ⁵¹Chrom-Freisetzungstest untersucht. Die Durchführung entspricht weitestgehend dem von Peipp et al [51] beschriebenen Versuchsaufbau.

Hierfür wurden die Zielzellen abzentrifugiert und mit 200 µCi ⁵¹Chrom für zwei Stunden im Brutschrank inkubiert. Das Chrom akkumuliert in den Zellen und wird erst durch Lyse der Zelle wieder freigesetzt. Nach zwei Stunden wurde mittels eines dreifachen Waschschrilles extrazelluläres Chrom entfernt und die Zellen auf 10⁵ Zellen/ml eingestellt. Von den aufbereiteten Zellen wurden dann 6 x 10³ Zellen in jede Vertiefung (engl. *well*) der 96-Well-Rundbodenplatten überführt, so dass zusammen mit

Effektoren und Antikörpern ein Gesamtvolumen von 200µl pro Vertiefung vorlag. Daraufhin wurde der Ansatz für drei Stunden wieder bei 37°C inkubiert. Auf den Platten wurden Titrationsreihen von Antikörpern oder Effektoren in Triplets vorgelegt. Nach drei Stunden wurden die Platten bei 2000U/min für 5min abzentrifugiert und 25µl des Überstandes aus jeder Vertiefung mittels einer Multipipette in eine optisch aktive 96-Well-Platte gegeben. 175µl eines Szintillationsmixes (PerkinElmer) wurden in die optisch aktive 96-Well-Platte vorgelegt. Die Platte wurde mit einer optisch aktiven Folie abgeklebt und für 15min unter ständigen Schütteln bei Raumtemperatur inkubiert. Im Anschluss wurde die Szintillation (Szi), induziert durch die radioaktive Strahlung, in einem Szintillationsmessgerät (MicroTriLux, Perkin Elmer) gemessen.

Durch chemische Lyse mit 100µl von 2% TritonX wurde der maximal Release ermittelt, des Weiteren wurde der basal Release als Zielzellen ohne Zusatz von Antikörpern und Effektoren gemessen. Ein weiterer Basalrelease, bestehend aus Zielzellen und Effektoren, zeigte keine unspezifische Lyseaktivität.

Die Effektor abhängige Lyse wurde in Prozent berechnet.

$$\% \text{ Spezifische Lyse} = \frac{(\text{experimentelle cpm} - \text{basale cpm})}{(\text{maximale cpm} - \text{basale cpm})} \times 100$$

2.9.1 Komplement-abhängige Zytotoxizitätstests

Die Komplement-abhängigen Zytotoxizitätstests wurden wie oben beschrieben durchgeführt, wobei Serum als Effektorquelle verwendet wurde. Der Versuchsaufbau entspricht dem von Dechant et al. Beschriebenem.[52] Kurz ausgeführt: Die Zielzellen wurden mit 200 µCi des ⁵¹Chrom Isotops markiert und zu den Antikörpertitrationsreihen auf den 96-Well-Platten hinzugefügt. Den ca. 5 x 10³ Zielzellen pro Vertiefung wurde 25% v/v frisches humanes Serum hinzugegeben und für drei Stunden bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert, bevor der Überstand im Szintillationsmessgerät analysiert wurde.

2.9.2 Antikörper-abhängige zelluläre Zytotoxizitätstests

Die ADCC Versuche wurden wie oben beschrieben durchgeführt. Für MNC- und PMN-Vermittelte ADCC Versuche wurde eine Effektor- Zielzellen Verhältnis von 40:1 gewählt, außer es ist ein anderes Verhältnis angegeben. Alle PMN- Vermittelten ADCC Experimente wurden mit 50 U/ml Granulozyten und Makrophagen Kolonie Stimulierendem Faktor (GM-CSF) durchgeführt, welcher 30 Minuten vor

Versuchsbeginn den Effektorzellen zugefügt wurde. In weiteren Experimenten wurde die Stimulation mit humanem C5a, GM-CSF oder C5a und GM-CSF verglichen und untersucht, hier wurden die PMNs mit 100 ng/ml humanem C5a (Complement Technology, Tyler, TX, USA) sowie mit GM-CSF in angegebener Konzentration (0.05 – 50 U/ml) vorinkubiert.

Die Blockade von CD11b, FcγIII (CD16) oder FcγRII (CD32) auf den PMNs während bestimmter ADCCs wurde erreicht durch Vorinkubation mit sättigenden Konzentrationen des CD11b-Antikörpers (Klon 2LPM19c; 2 µg/ml), einem Maus/Mensch chimär CD16 Antikörper (1 µg/ml), wessen Fc-Region so modifiziert wurde, dass eine Fc-Rezeptorbindung nicht möglich ist (CD16-IgG1-Ko)[53], oder ein CD32-(Fab')₂ Fragment (1 µg/ml; AT10), für 15 Minuten bei 37°C.

2.9.3 Komplement-abhängige Zellvermittelte Zytotoxizitätstests

Die Komplement-abhängigen Zellvermittelten Zytotoxizitätstests (CDCC) wurden wie oben beschrieben durchgeführt nur, dass diesmal als Effektoren sowohl als Effektorzellen (MNCs oder PMNs) als auch Serum zur Anwendung kamen. Die Versuche wurden je nach Fragestellung mit oder ohne 50µg/ml Eculizumab durchgeführt. Eculizumab ist ein Komplementfaktor C5 neutralisierender Antikörper. Des Weiteren wurden CDCC Versuche durchgeführt, in denen statt humanem Serum und Eculizumab, 25% v/v C6-freies Serum (Complement Technology) verwendet wurde, welchem 65µg/ml Komplementfaktor C6 (Complement Technology) zugefügt werden konnte.

Die Durchführung von Zytotoxizitätstests mit 25% v/v humanem Vollblut wurde mit Blut von gesunden Spendern, welche mit G-CSF vorbehandelt waren, durchgeführt oder das Blut wurde mit 50 U/ml GM-CSF 30 Minuten vor Versuchsbeginn inkubiert. Die Antikoagulation wurde mit 25µg/ml Lepirudin (Pharimon) vollzogen. Je nach Fragestellung wurde die durch das Komplement System vermittelte Lyse mit 50µg/ml Eculizumab unterbunden oder nicht.

2.10 Komplement induzierte Apoptose von Zielzellen

Die Lyse von A431 Zielzellen, hervorgerufen durch antikörpervermittelte Komplementaktivierung, wurde durch Anfärben der Zellen mit Annexin V und Propidiumiodid (PI) untersucht. Es wurden 1×10^5 A431 Zellen inkubiert mit 10µg/ml

H425 mit oder einem Kontrollantikörper und mit 25% v/v humanem Serum, 25% v/v Hitze inaktiviertem Serum (30 Minuten bei 60°C) oder ohne Serum, für drei Stunden bei 37°C und 5% CO₂. Anschließend wurden die Proben mit FITC Annexin V Apoptosis Detection Kit I (BD Pharmingen, Heidelberg, Deutschland) und Propidiumiodid nach Anleitung des Herstellers gefärbt und durchflusszytometrisch analysiert.

2.11 Chemotaxis Versuche

Die Migration neutrophiler Granulozyten in Richtung höherer Konzentration des Anaphylatoxins C5a wurde untersucht in 96-Well Mikrokammer Platten (HTS Transwell®-96 Permeable Support mit 3.0µm Poren Polycarbonat Membran; Corning Costar, Tewksbury MA, USA). Der untere Teil dieser sogenannten Boyden Kammer wurde gefüllt mit: Humanem C5a (0 – 1µg/ml) gelöst in Hank's balancierter Salz Lösung (engl. HBSS; Invitrogen) und Ergänzt mit 2% Albumin aus Rinderserum (engl. BSA). Der obere Teil, welcher separiert ist durch die Membran mit 3µm Porengröße, wurde gefüllt mit neutrophilen Granulozyten (8×10^6 Zellen/ml), welche in HBSS mit 2% BSA und 50 U/ml GM-CSF suspendiert wurden. Nach dreistündiger Inkubation bei 37°C und 5% CO₂ wurde der obere Teil der Boyden Kammer entfernt. Die durch die Membran migrierten PMNs wurden quantifiziert durch ein MTS Assay, welches nach Herstellerangaben durchgeführt wurde (Promega, Madison, CA, USA).

2.12 Statistische Auswertung

Alle Daten der Ergebnisse sind Mittelwertangaben von jeweils mindestens drei unabhängigen Versuchen mit unterschiedlichen, gesunden Blutspendern. Die erhobenen Daten wurden statistisch analysiert und graphisch dargestellt mit Prism® 5.0 (GraphPad, CA, USA).

Die Kurven wurden nach einem nichtlinearen Regressionsmodell mit einer sigmoidalen Dosis-Wirkungs-Kurve berechnet. Die statistische Signifikanz der wiederholten Messungen wurde mit einer einfaktoriellen oder zweifaktoriellen Varianzanalyse ermittelt, und das Signifikanzniveau mit der Bonferroni Methode errechnet. Die jeweiligen Ergebnisse wurden als Durchschnitt \pm des Standardfehlers vom Durchschnitt von mindestens drei unabhängigen Versuchen abgebildet. Für das Konfidenzintervall (KI) wurde ein Wert von 95% gewählt. Die P-Werte wurden wenn indiziert, kalkuliert und die Nullhypothese wurde verworfen, wenn $p \leq 0.05$.

Ergebnisse

3.1 Generierung einer CDC-optimierte Variante des Antikörpers Matuzumab

Da etablierte, rekombinante Antikörper wie Cetuximab, Panitumumab und Matuzumab nicht das Komplementsystem zur Tumorlyse rekrutieren können, sondern nur in Kombination zweier nicht kreuzblockierender Antikörper [52], wurde durch Einfügen zweier Mutationen im Fc-Teil ein Antikörper erschaffen, welcher die Rekrutierung durch einen einzigen rekombinanten Antikörper ermöglicht. Durch Änderung der Primärstruktur des Fc-Teils des Antikörpers wurde die Aktivierung des Komplementsystems möglich. Hierfür wurden an Position K326 und E333 in der CH2 Domäne des IgG1 Antikörpers die Aminosäuren durch Alanin ersetzt. Diese Strukturveränderung führt dazu, dass das Komplementsystem vom CDC-optimierten Antikörper (H425 mt) rekrutiert werden kann [54].

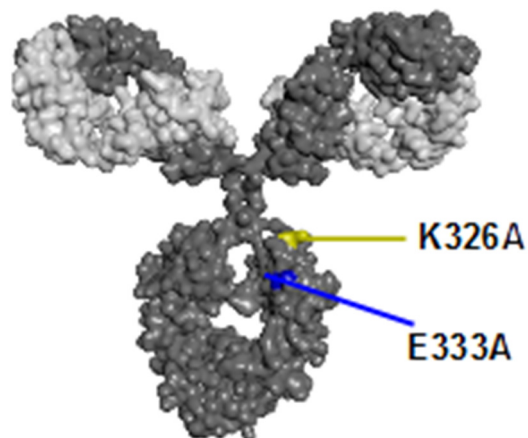


Abbildung 3.1: Strukturmodell von humanem IgG1 (pdb Datei von [55]) mit Indikation der substituierten Aminosäuren K326A und E333A in der CH2 Domäne. Das Bild wurde generiert mittels Discovery Studio 3.5 Client Software (Accelrys)

3.2 Biochemische Charakterisierung

Zur Überprüfung der Reinheit sowie der Konzentrationsbestimmung der verwendeten Antikörper-Suspensionen wurde sowohl eine Gelfiltrations-Chromatographie als auch eine vollautomatisierte Kapillarelektrophorese durchgeführt. Die Größenausschlusschromatographie zeigte, weder Aggregate noch das weitere Antikörper oder Unreinheiten vorlagen. Die Versuche zeigten wiederholt einen singulären Peak bei 158kDa (Abb. 2 A+B). Des Weiteren wurde die vollautomatisierte

Ergebnisse

Kapillarelektrophorese mit reduzierten und nicht reduzierten Antikörperlösungen durchgeführt. Die Reduktion der Antikörperlösungen erfolgte mit 2-Mercaptoethanol. In der Untersuchung zeigten sich wiederholt eine hohe Reinheit und die korrekte Konfiguration der leichten und schweren Antikörperketten. Im reduzierten Zustand zeigten die schweren Ketten eine Masse von 54 kDa, die leichten Ketten 25 kDa. Die nicht reduzierten Antikörper zeigten eine spezifische Masse von 158 kDa (Abb. 3.2 C).

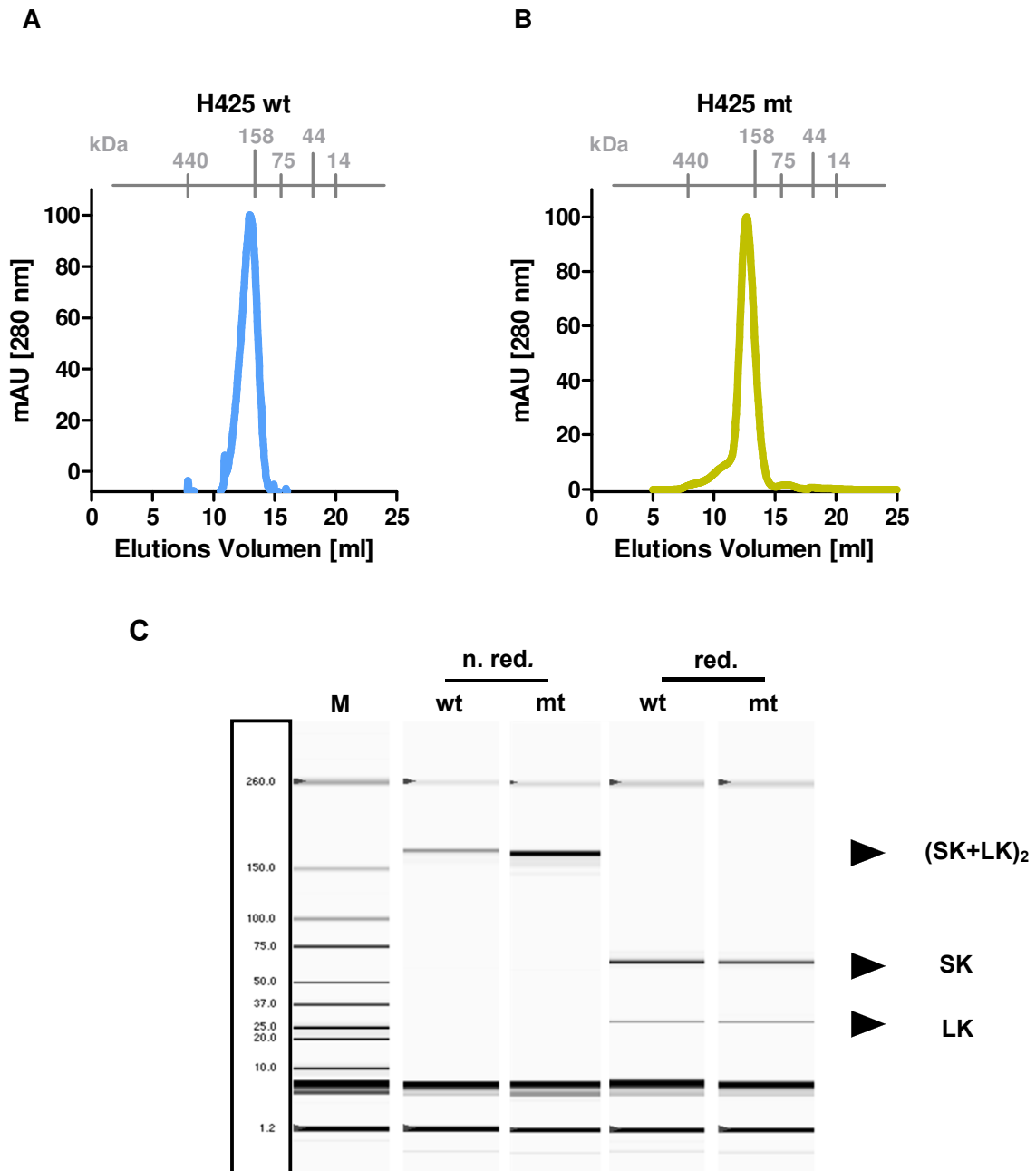


Abbildung 3.2 (A+B) Gelfiltrations-Chromatographie: Die durch Anti-human Kappa aufgereinigten Antikörperlösungen wurden mittels Gelfiltrations-Chromatographie von minimalen Verunreinigungen getrennt. Die der Antikörper entsprechenden Fraktionen wurden isoliert, analysiert und grafisch dargestellt. **(C)** Kapillarelektrophorese: Aufgereinigte Antikörper (H425 wt und H425 mt). Nach Protokoll aufgetrennt, mittels vollautomatisierte Kapillarelektrophorese in reduzierten und nicht reduzierten Antikörperlösungen. Die Abbildungen zeigen die Ergebnisse eines repräsentativen Versuches aus mindestens drei Versuchswiederholungen.

3.3 Funktionelle Charakterisierung

Die Funktionalität der Antikörper wurde mittels durchflusszytometrischer Untersuchungen sowie durch Zytotoxizitäts-Tests ermittelt. Die konzentrationsabhängige Bindung der Antikörpervarianten an den EGF-Rezeptor wurde mittels Durchflusszytometrie analysiert. Hierbei wurden kongruente Sättigungskurven detektiert (Abb. 3.3 A+B).

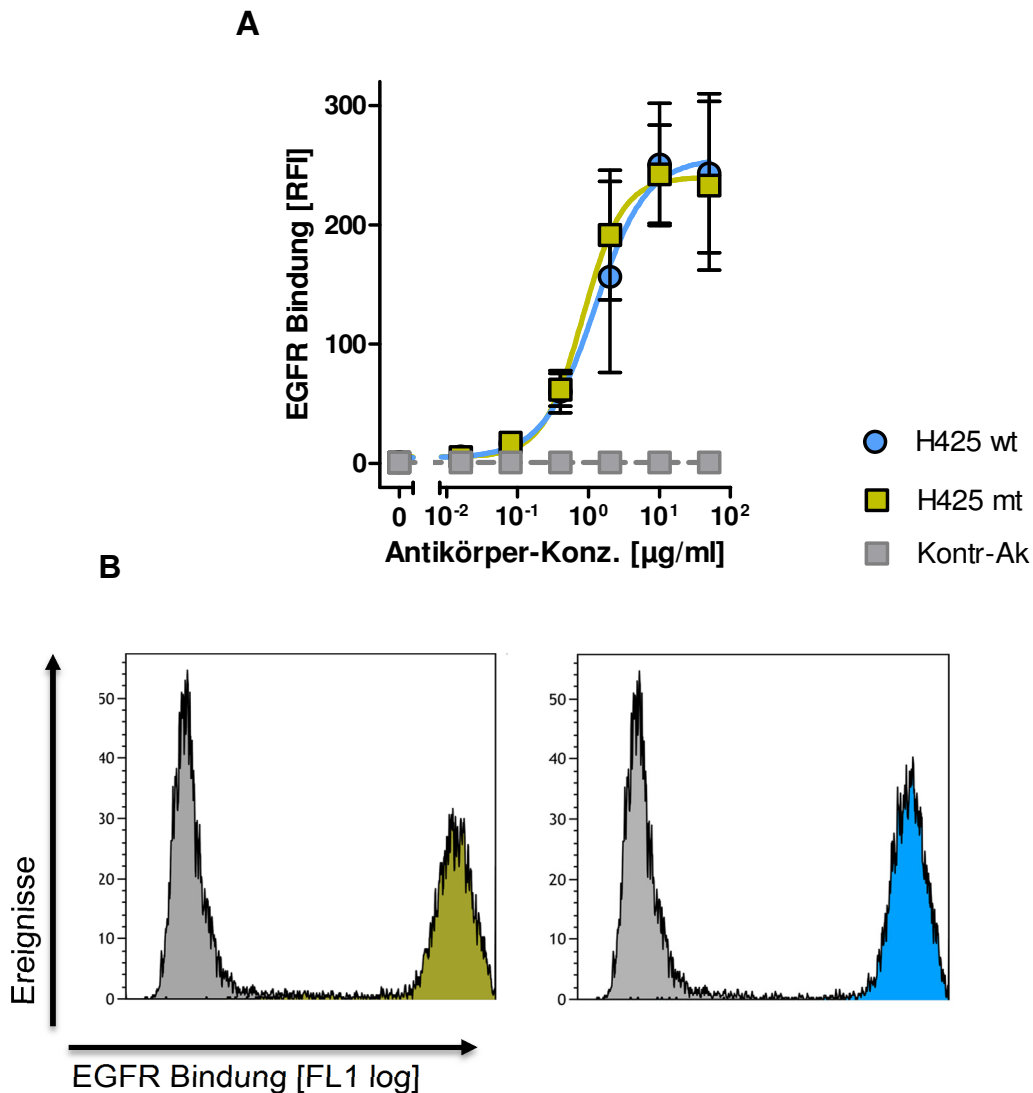


Abbildung 3.3 (A) Immunfluoreszenz: Darstellung der Bindung von H425 wt und H425 mt zu EGFR exprimierenden A431 Zellen von mindestens drei Versuchen. **(B)** Darstellung eines repräsentativen Ergebnisses der Immunfluoreszenz-messungen. Die H425 Antikörpervarianten und der Kontrollantikörper wurden in absteigender Konzentration mit A431 Zellen in Kulturmedium bei 37°C inkubiert. Danach für 30 Minuten auf Eis gekühlt, bevor die Fab-Fragmenten der Antikörper mit FITC-konjugierten rabbit anti-human IgG's gefärbt wurden. Anschließend wurden die Zellen durchfluss-zytometrisch erfasst und bei mittlerer Intensität gemessen.

Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass H425 mit signifikant C1q an A431 Zelloberflächen anlagert. Der Kontrollantikörper wie auch die Wildtyp Variante des Matuzumab Antikörpers führten nicht zu einer C1q Anlagerung (Abb. 3.4).

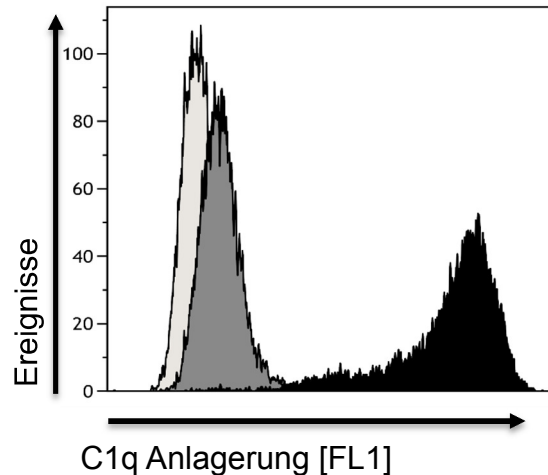


Abbildung 3.4 Die Anlagerung von C1q an A431 Zellen wurde mittels direkter Immunfluoreszenz dargestellt. Humanes Serum lag in einer Konzentration von 25% v/v vor, die Antikörper mit 10µg/ml.

Zur genaueren Analyse der Funktionalität der Matuzumab Antikörpervarianten wurde untersucht, ob die Anlagerung von C1q zur Aktivierung des Komplementsystems und zur konsekutiven Lyse der Zielzellen führt. Hierfür wurden A431 Zellen mit humanem Serum und den zu testenden Antikörpern für drei Stunden inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit Propidiumiodid (PI) und FITC- markiertem Annexin V gefärbt und durchflusszytometrisch gemessen. Annexin V bindet an Phosphatidylserin und Phosphatidylethanolamin, diese liegen intrazellulär vor und werden im Rahmen der Apoptose in die äußere Zellmembran integriert. Annexin V ist nicht membrangängig, es sei denn, es kommt zu einer Steigerung der Permeabilität im Rahmen der Zellyse z.B. durch den „membrane attack complex“(MAC). Propidiumiodid färbt Doppelstrang-DNA und ist auch nur membrangängig bei pathologisch gesteigerter Permeabilität. Die Grafiken zeigen, dass die Antikörper vermittelte Anlagerung von C1q unter Hinzugabe von humanem Serum zur Anfärbbarkeit mit PI und Annexin V führt. Dies wird jedoch durch das Hinzufügen von, durch Hitze inaktiviertes, Serum nicht hervorgerufen (Abb. 3.5).

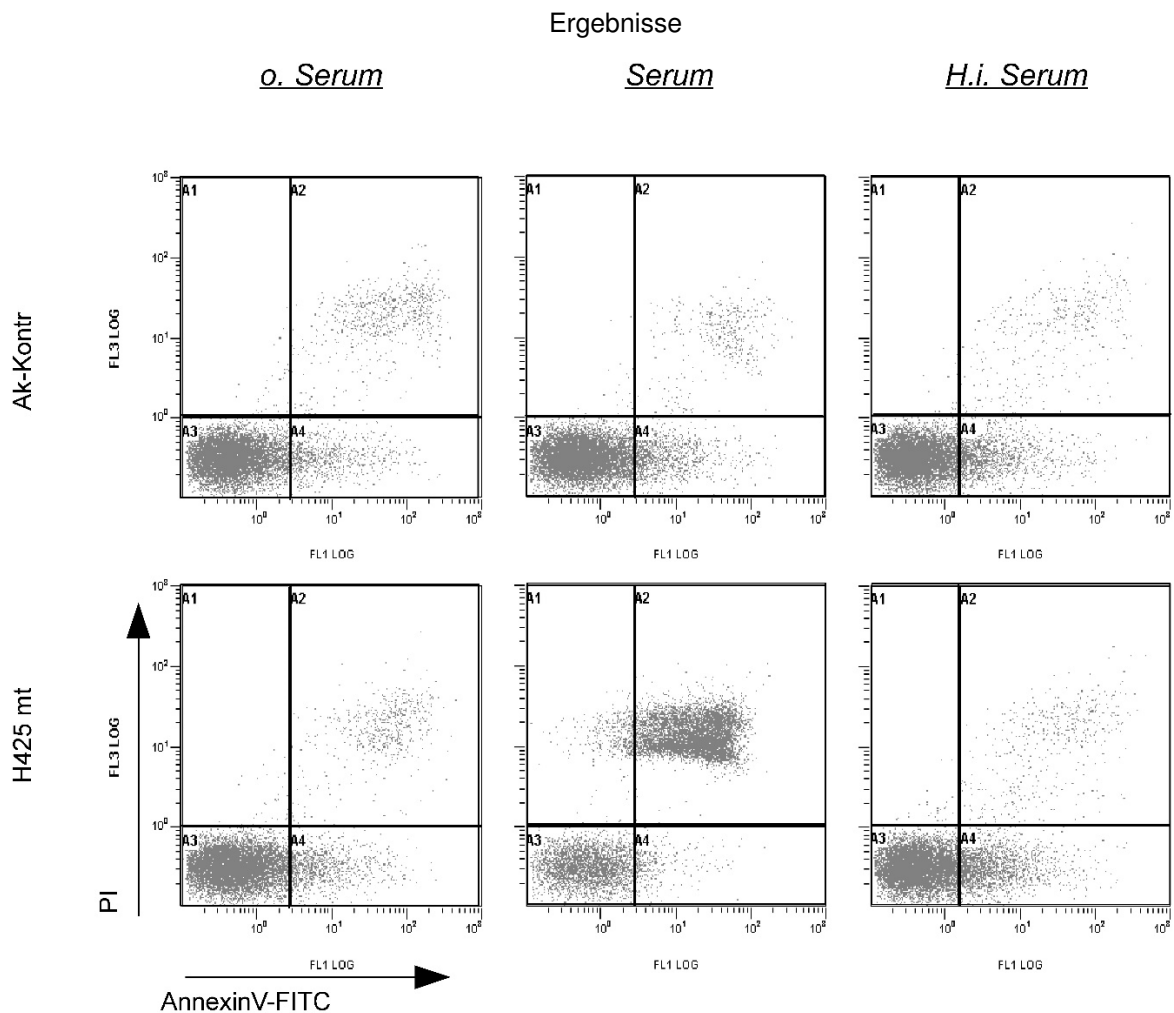


Abbildung 3.5: Nachweis von Zelluntergang mittels PI und FITC- markiertem Annexin V. Humanes Serum lag in einer Konzentration von 25% v/v vor, die Antikörper mit 10µg/ml. Darstellung der Ergebnisse eines Experiments, exemplarisch ausgewählt aus mindestens drei Wiederholungen.

In weiteren Versuchen zur Zytotoxizität der beiden Matuzumab Antikörpervarianten wurden Komplementsystem-abhängigen Zytotoxizität-Versuche (CDC) mit A431, A1207 und DiFi- Zellen durchgeführt. Die Zellen wurden für drei Stunden mit radioaktivem ⁵¹Chrom inkubiert, anschließend gewaschen und in Nährmedium aufgenommen. Zu den chromierten Zielzellen wurden nun die Antikörper (max. 10µg/ml) aus ihren Verdünnungsreihen (1:5) hinzugegeben, bevor Serum (25 % v/v) hinzugefügt wurde. Die Versuchsreihen wurden anschließend für drei Stunden bei 37°C inkubiert. Die Analyse der Überstände ergab, dass der CDC-optimierte Antikörper bei allen Zelllinien eine maximale Lyse von ca. 40% der Zellen erreicht. Der Matuzumab Antikörper sowie der Kontrollantikörper führten, bei den A431 und A1207 Zellen, nicht zu signifikanten Lyseraten. Interessanterweise induzierte der Matuzumab Antikörper, in Versuchen mit DiFi-Zielzellen, geringe jedoch signifikante Komplement-abhängige Zytotoxizität (7%), bei hohen Antikörperkonzentrationen (>10^{0,5}). Zur genaueren Untersuchung der Komplement-abhängigen Zytotoxizität wurden die Überstände von CDC-Versuchen mit A431 Zellen, mittels durchflusszytometrischer

Analyse auf Anaphylatoxine untersucht. Es zeigte sich, dass es im Rahmen der Zelllyse zu einem signifikanten Anstieg der Anaphylatoxine C3a, C4a und C5a kommt. Einen Anstieg der Anaphylatoxine konnte nicht für H425wt oder den Kontrollantikörper detektiert werden (Abb.3.6).

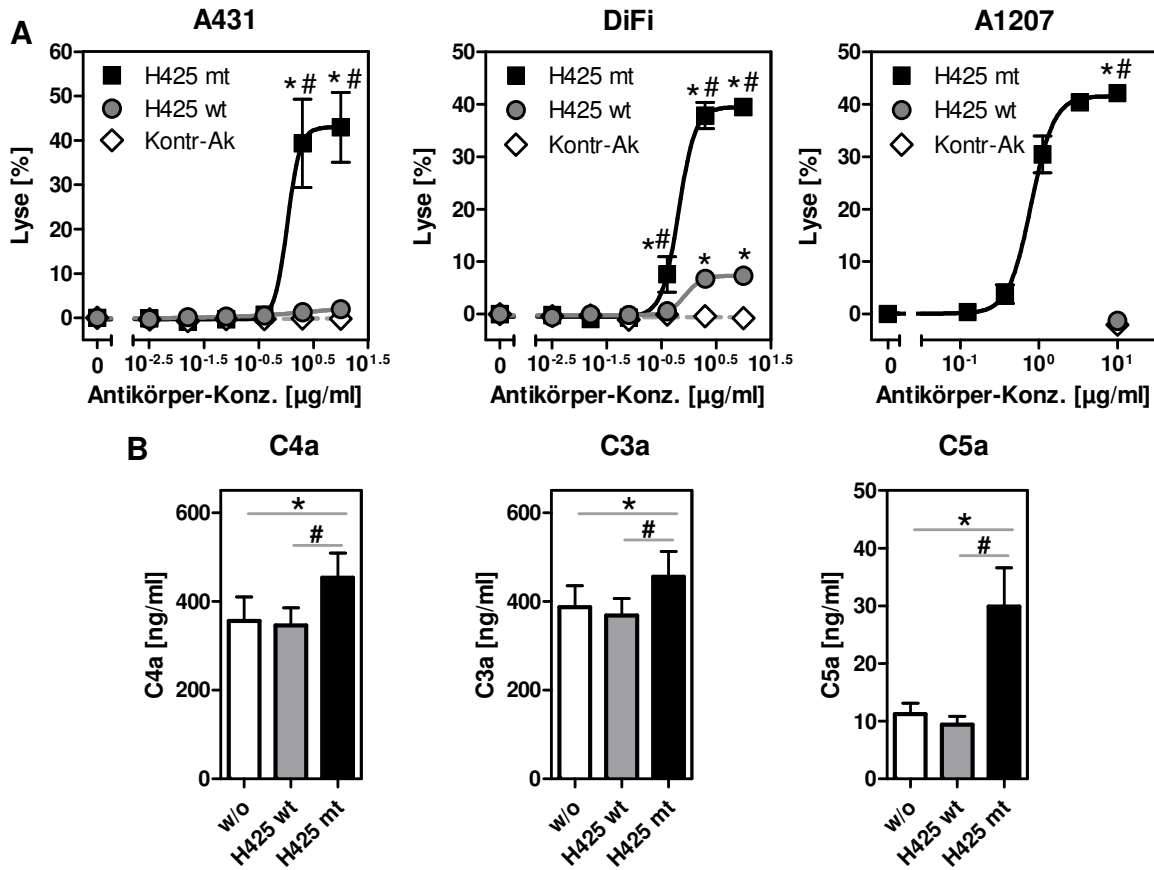


Abbildung 3.6: (A) Komplement abhängige Zytotoxizitätstests: Für die $^{51}\text{Chrom}$ Freisetzungsversuche wurden A1207, A431 und DiFi Zellen für drei Stunden bei 37°C inkubiert mit den aufgeführten Antikörpern in steigender Konzentration und 25% v/v Serum (B) Durchflusszytometrie: Freisetzung der Anaphylatoxine C4a, C3a und C5a im CDC Versuch. A431 Zellen wurden mit 25% v/v humanem Plasma und angegebenen Antikörpern ($10\mu\text{g/ml}$) für drei Stunden bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden die Überstände mittels Durchflusszytometrie analysiert.

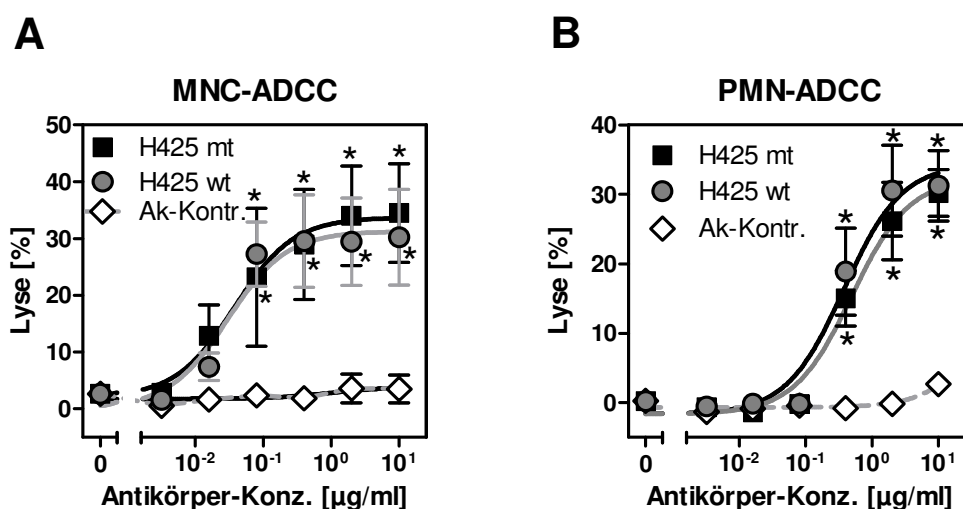
3.4 Untersuchung der Aktivierung von Effektorzellen durch die Matuzumab Antikörpervarianten

Die zelluläre Immunreaktion auf mit Antikörpern markierte Zellen wird über Fc-Rezeptoren vermittelt, welche an die CH2-Domäne der Antikörper binden. Um zu überprüfen, ob die Mutationen in der CH2-Domäne Einfluss auf die Aktivierung der Effektorzellen hat, wurden Antikörperabhängige Zell-vermittelte Zytotoxizitätstests

(ADCC) durchgeführt. Die ADCC Versuche wurden als $^{51}\text{Chrom}$ Freisetzungsversuche mit A431 Zellen und mononukleären Zellen (engl. mononuclear cells, MNC) (Abb. 3.7A) oder mit polymorphkernigen Granulozyten (engl. polymorphnuclear cell, PMN) (Abb. 3.7B) als Effektorzellen durchgeführt. Die Versuche zeigten keine signifikanten Unterschiede zwischen der Wildtyp Variante des Matuzumab Antikörpers oder der CDC-optimierten Variante, hinsichtlich der Zellyse oder der dosisabhängigen Induktion der Zellyse.

In ADCC Versuchen mit Vollblut als Effektorquelle zeigten sich nur signifikante Lyseraten durch den CDC-Optimierten Antikörper, jedoch nicht durch die Wildtyp Variante. Durch Gabe des C5 neutralisierenden Antikörpers Eculizumab im Versuchsaufbau wurde die Lyse durch H425 mt komplett geblockt. Wurde jedoch GM-CSF stimuliertes Vollblut oder Vollblut von gesunden, mit G-CSF vorbehandelten Probanden genommen, kam es zu signifikanten Lyseraten, welche ohne Zugabe von Eculizumab im Bereich von 45% und mit um die 20% Zellyse lag. Im Vergleich zeigt der CDC-Optimierte Antikörper höhere Lyseraten als die Wildtyp Variante, diese wurden in Gegenwart von Eculizumab auf gleiches Niveau reduziert (Abb. 3.7D).

In der Synopse der Ergebnisse wird deutlich, dass die CDC-optimierte Variante des Matuzumab Antikörpers die gleiche Effektivität in der Rekrutierung von Effektorzellen aufweist wie die Wildtyp Variante. Des Weiteren zeigt sich, dass H425 mt das Komplementsystem und Effektorzellen rekrutieren kann und so höhere Lyseraten in vitro Versuchen aufweist, in denen beide Effektorquellen anwesend sind.



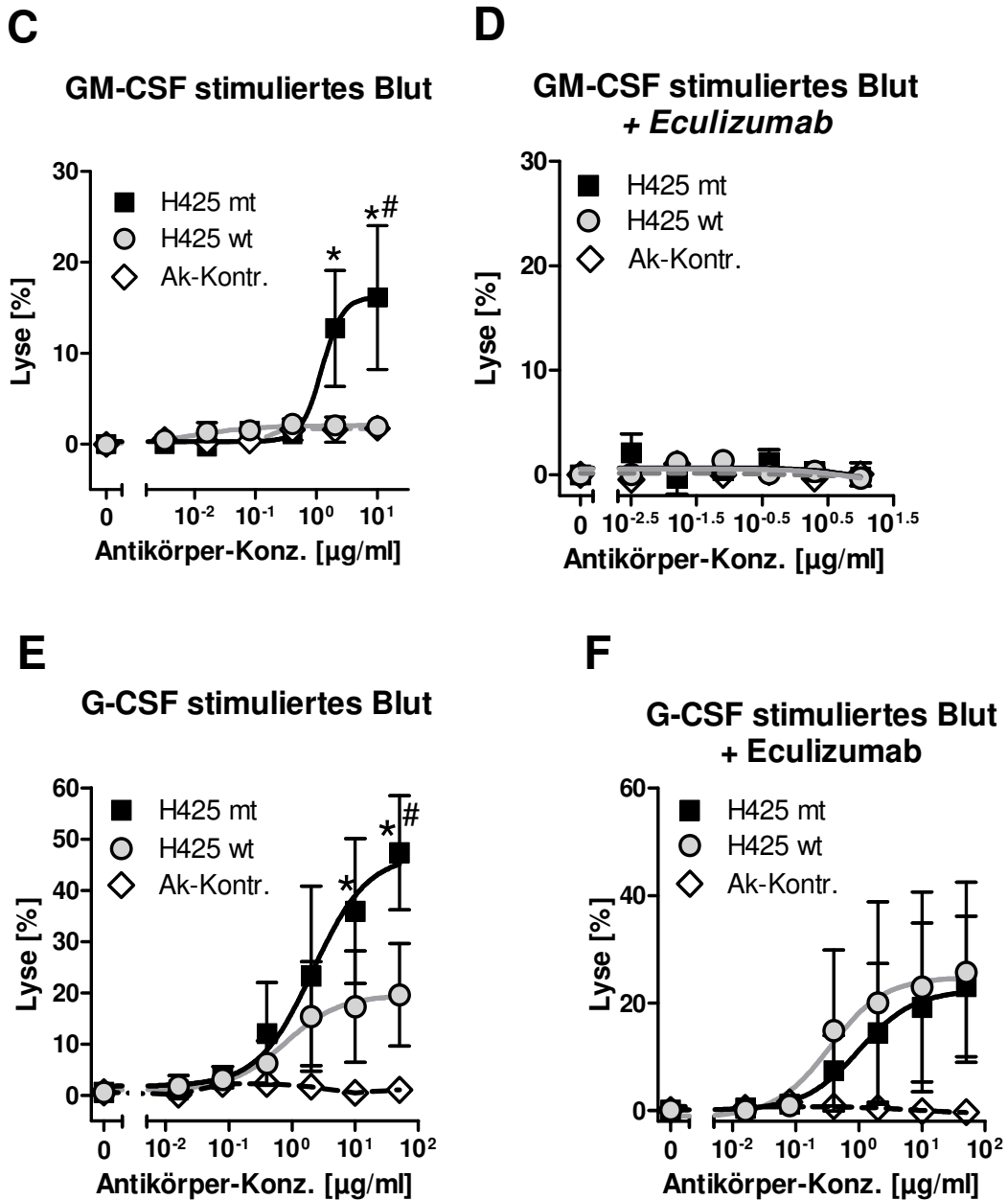


Abbildung 3.7 A-D: Antikörperabhängige zelluläre Zytotoxizitätstests: Die ADCC Versuche wurden mit chromierte A431 Zellen und Antikörper Verdünnungsreihen (1:5) erstellt. Die Effektor- Zielzellen Verhältnis beträgt 40:1 Die Versuchsreihen wurden für drei Stunden bei 37°C inkubiert. (A) MNCs (B) PMNs mit GM-CSF im Versuchsaufbau. (C) Vollblut mit GM-CSF im Versuchsaufbau. (D) Vollblut mit GM-CSF und Eculizumab im Versuchsaufbau. (E) Vollblut von mit G-CSF vorbehandelten Probanden. (F) Vollblut von mit G-CSF vorbehandelten Probanden und Eculizumab im Versuchsaufbau. Die Ergebnisse sind Mittelwertangaben aus jeweils mindestens drei Versuchen mit verschiedenen, gesunden Probanden. *p ≤ 0.05 H425 mt oder H425 wt vs. Kontrollantikörper; # p ≤ 0.05 Kombination von MNC + Serum vs. MNC oder Serum alleine.

3.5 Expressionsmuster der Komplementrezeptoren auf PMNs und NK- Zellen

Die Interaktionen zwischen Leukozyten und dem Komplementsystem sind Gegenstand zahlreicher Forschungen und werden kontrovers diskutiert [56, 57]. Im Rahmen dieser Arbeit wurde das Augenmerk daraufgelegt, den Einfluss des aktivierten Komplementsystems auf die Zytotoxizität von Effektorzellen zu analysieren.

Zunächst wurden die Expressionsmuster der Komplementrezeptoren auf der Zelloberfläche von mononukleären Zellen (MNC) und polymorphnukleären Zellen (PMN) untersucht. Mittels Durchflusszytometrie konnte die Zelloberflächenexpression folgender Komplementrezeptoren (engl. CR) auf den PMNs nachgewiesen werden: C1qRp, cC1qR, gC1qR, CR1 CR3 CR4 C3aR und C5L2. Unter den gegebenen experimentellen Bedingungen vermitteln hauptsächlich die Natürlichen Killerzellen (NK-Zellen) innerhalb der MNCs ADCC gegenüber Zielzellen. Im Gegensatz zu PMNs konnte auf NK-Zellen lediglich die Expression von CR3, CR4 und C3aR detektiert werden (Abb.3.8).

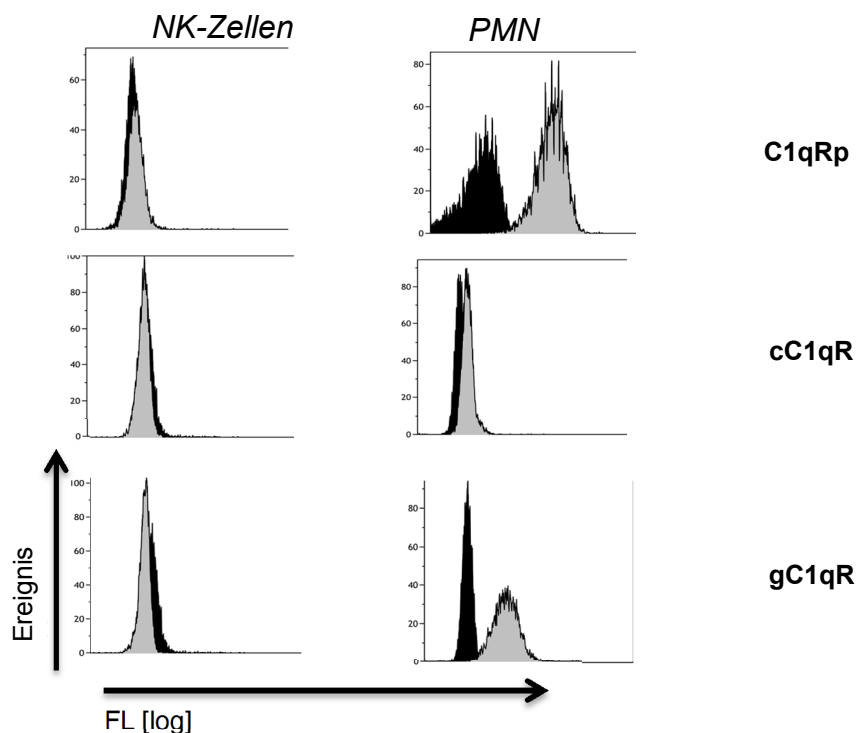


Abbildung 3.8: Erläuterungen siehe nächste Seite.

Ergebnisse

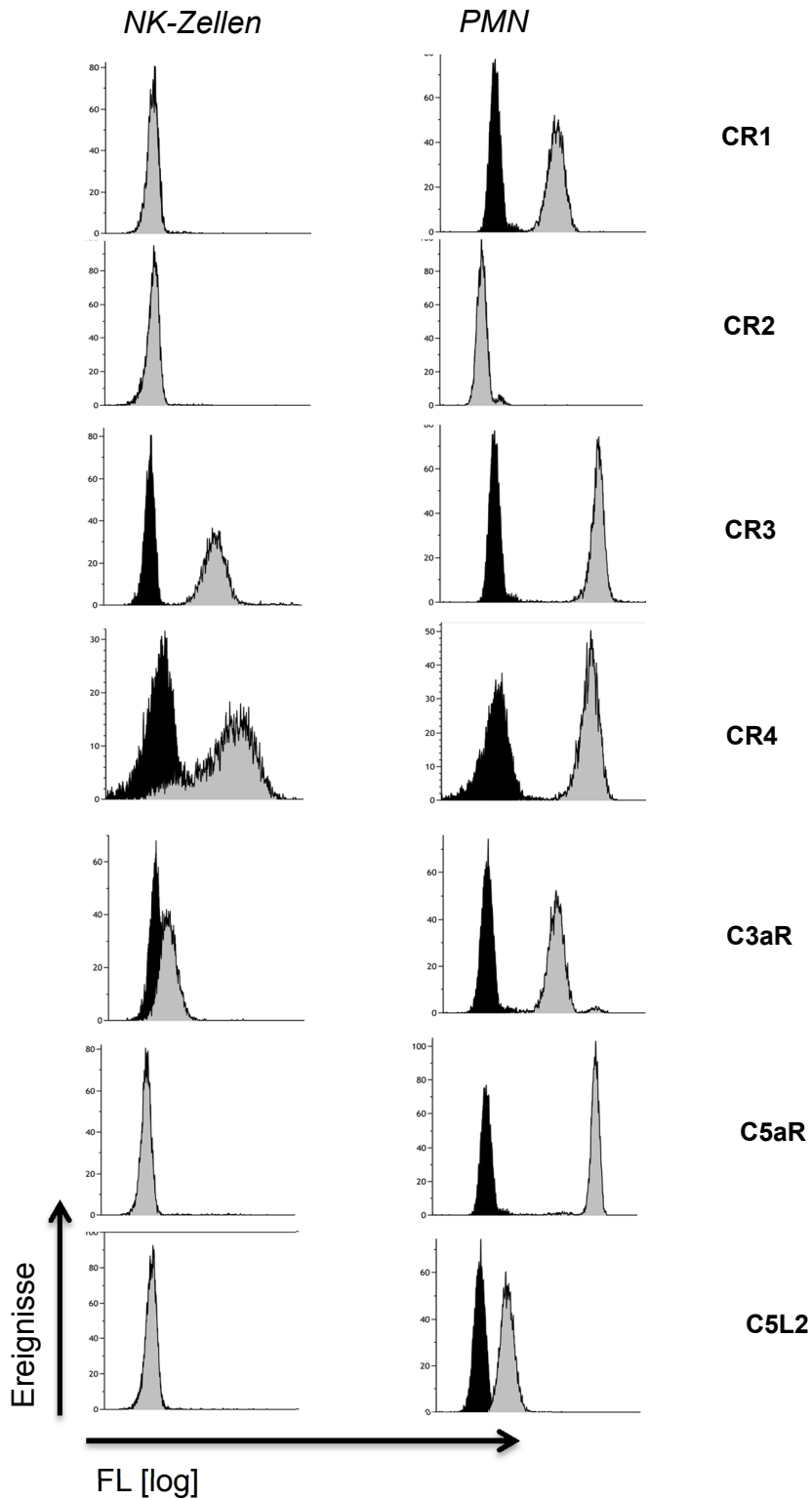


Abbildung 3.8: Durchflusszytometrische Analyse der Komplement Rezeptoren von PMNs und NK-Zellen. Die Rezeptorexpressionsmuster wurden mittels direkter Immunfluoreszenz dargestellt. Die Probanden waren gesund und nicht vorbehandelt. Die Grafiken bilden die Ergebnisse von drei separat gemessenen Probanden ab.

3.6 CDC-optimierter Matuzumab Antikörper induziert höhere Lyseraten von Zielzellen durch die Aktivierung des Komplementsystems und Effektorzellen

Um den Einfluss des Komplementsystems auf die Zytotoxizität von Effektorzellen zu untersuchen, wurden Zytotoxizitätsversuche in Anwesenheit beider Effektorquellen durchgeführt. Die A431 Zielzellen wurden hierfür entweder mit Effektorzellen, oder mit Serum und Effektorzellen inkubiert.

Für die Wildtyp Variante des Matuzumab Antikörpers zeigten sich keine signifikanten Unterschiede hinsichtlich der Lyserate, beim Vorliegen von MNCs alleine oder mit Serum zusammen (Abb. 3.7). Die Komplement-optimierte Variante hingegen zeigte einen signifikanten Anstieg der Lyserate, durch Vorhandensein von MNCs und Serum, verglichen mit MNCs alleine. Die Ergebnisse zeigen, dass bei Vorliegen beider Effektorquellen sich eine Kurve darstellt, welche bei niedriger Konzentration der Antikörper, der der MNCs entspricht und bei hohen Antikörper-Konzentration der durch Serum hervorgerufen Lyse entspricht. (Abb. 3.7). Insgesamt deutet das Ergebnis darauf hin, dass die Effektorquellen sich nicht gegenseitig stimulieren oder hemmen.

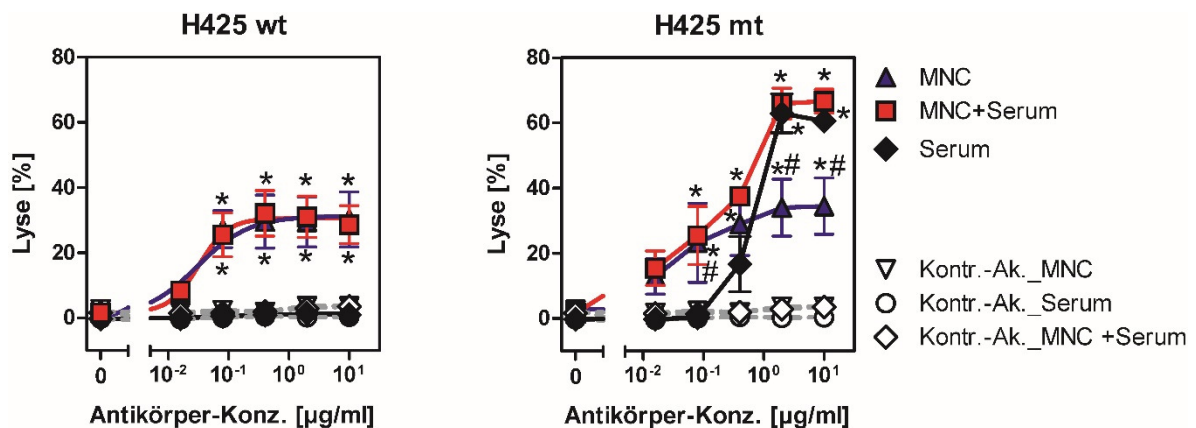


Abbildung 3.9: Chrom Freisetzungsversuche mit A431 Zielzellen und MNCs als Effektorzellen sowie 25%v/v Serum und Antikörper Verdünnungsreihen (1:5). Die Effektor- Zielzellen Verhältnis beträgt 40:1. Die Versuchsreihen wurden für drei Stunden bei 37°C inkubiert. *p ≤ 0.05 H425 mt oder H425 wt vs. Kontrollantikörper; # p ≤ 0.05 Kombination von MNC + Serum vs. MNC oder Serum alleine.

Wird dieser Versuch mit PMNs statt mit MNCs als Effektorzellen durchgeführt, kommt es zu einer signifikanten Reduktion der Lyserate durch die Zugabe von Serum, wenn die Reaktion von der Wildtyp Variante des Matuzumab Antikörpers vermittelt wurde. Wird der Versuch jedoch von der Komplement-optimierten Variante vermittelt, kommt es zu einer signifikanten Steigerung der Lyserate bei Vorliegen der PMNs und Serum. Liegen beide Effektorquellen vor, befindet sich die Lyserate signifikant über dem Niveau vom Serum alleine (Abb. 3.9).

Bei allen Experimenten zeigte sich keine signifikante Lyse, sofern kein Antikörper oder nur der Kontrollantikörper vorlag.

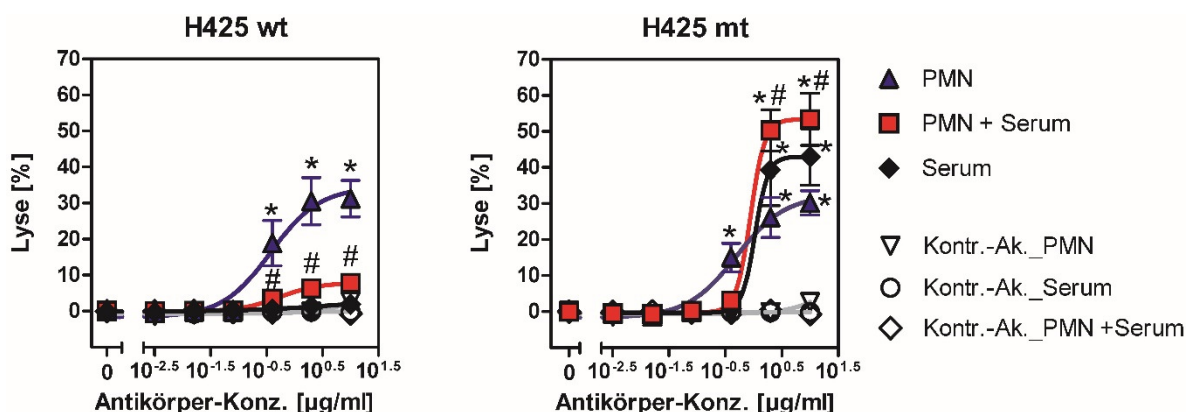


Abbildung 3.9: Chrom-Freisetzungsversuche mit A431 Zielzellen und PMNs als Effektorzellen sowie 25%v/v Serum und Antikörper Verdünnungsreihen (1:5). Die PMNs wurden in diesem Versuchsaufbau mit GM-CSF stimuliert. Die Effektor- Zielzellen Ratio (ET) beträgt 40:1 Die Versuchsreihen wurden für drei Stunden bei 37°C inkubiert. *p ≤ 0.05 H425 mt oder H425 wt vs. Kontrollantikörper; # p ≤ 0.05 Kombination von PMN + Serum vs. PMN oder Serum alleine

3.7 Die Spaltung von C5 steigert die PMN vermittelte Zytotoxizität

Um die Zytotoxizität gegen A431 Zellen, vermittelt von MNCs oder PMNs und Serum, genauer zu analysieren, wurde der Versuchsaufbau der ADCCs durch Hinzugabe von Eculizumab erweitert. Eculizumab verhindert die Bildung des „membrane attack complex“ (MAC) durch Hemmung der enzymalen Spaltung von C5. (Abb. 3.10) In vorangegangenen Versuchen zeigte sich eine verbesserte Zytotoxizität durch das gemeinsame Vorliegen von Serum und Effektorzellen. Um zu differenzieren ob die verbesserte Zytotoxizität des H425 mt durch einen additiven Effekt (parallele Lyse) oder durch Stimulation der Effektorzellen hervorgerufen wird, wurde Eculizumab hinzugefügt.

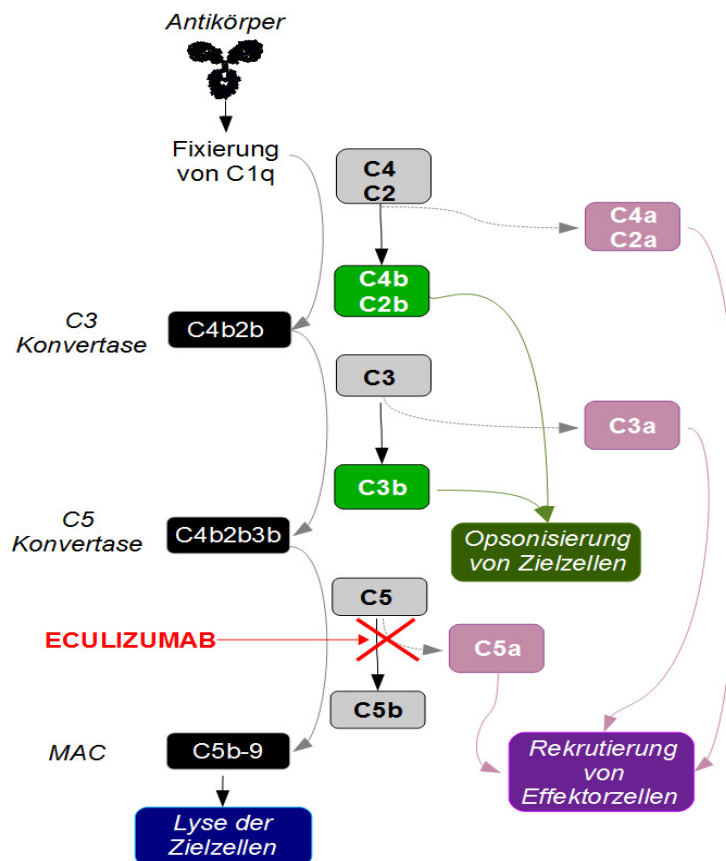


Abbildung 3.10: Schematische Darstellung des klassischen Weges des Komplementsystems. Die Aktivierung durch ein IgG Molekül und die Wirkung von Eculizumab wird dargestellt.

Liegen MNCs und Serum gemeinsam als Effektoren vor, induziert H425 mit signifikant höhere Lyseraten, verglichen mit MNCs als alleinige Effektoren. In Anwesenheit von Serum und Eculizumab liegt die Lyserate auf dem Niveau von MNCs allein. Dies deutet auf eine parallele Lyse der A431 Zellen durch das Komplementsystem und die MNCs hin.

Im Gegensatz dazu zeigt die Kombination von PMNs und Serum überlegene Zytotoxizität gegenüber A431 Zellen, welche nahezu gänzlich durch Zugabe von Eculizumab inhibiert wird (Abb. 3.11). Somit ist von einer Stimulation der PMNs durch Spaltprodukte der Proteine des Komplement Systems auszugehen.

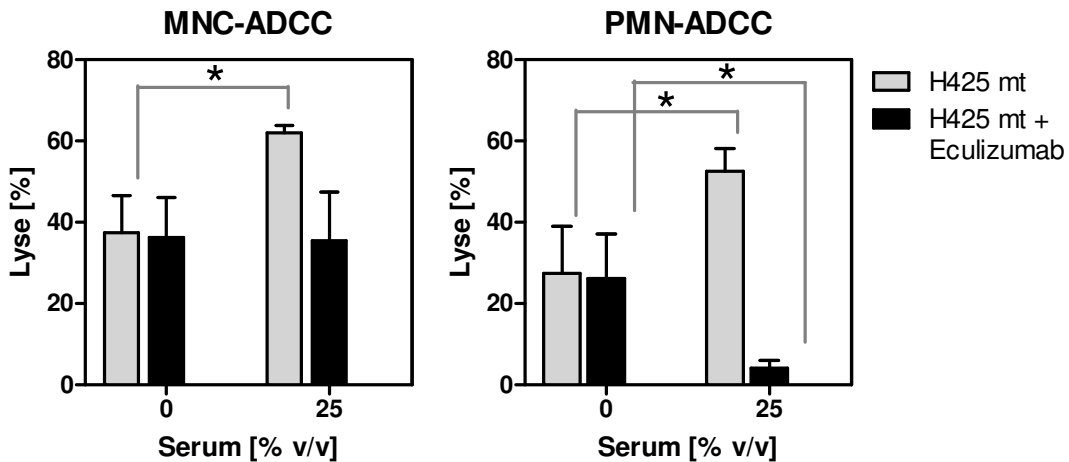


Abbildung 3.11: Chrom-Freisetzungsversuche mit A431 Zielzellen und MNCs oder PMNs. Die Effektor-Zielzellen Ratio (ET) beträgt 40:1. Die Versuche wurden ohne Serum oder in Gegenwart von 25% v/v Serum durchgeführt. H425 mt oder der Kontrollantikörper lagen mit 10µg/ml vor, Eculizumab mit 50µg/ml

Um den Einfluss der Spaltprodukte von C5 auf die Stimulierung von PMNs genauer zu untersuchen, wurden ADCC Versuche mit C6-defizientem Serum durchgeführt. Auch in diesen Versuchen zeigt sich eine Tumorzelllyse von bis zu 20% durch die PMNs ohne Serum. Wird C6-defizientes Serum hinzugegeben, verdoppelt sich die Lyserate auf bis zu 40%. Das Hinzufügen von humanem C6 zu C6-defizientem Serum steigert die Tumorzelllyse auf bis zu 70%. Die Steigerung der Zelllyse durch C6-defizientes Serum ist nur durch eine verstärkte Aktivität der PMNs zu erklären. Des Weiteren zeigt die Inhibierung der Tumorzelllyse durch das Hinzufügen des monoklonalen Antikörpers Eculizumab, welcher an C5 bindet, dass C5 und oder dessen Spaltprodukte eine wichtige Rolle spielen in der Aktivierung von PMNs (Abb. 3.12).

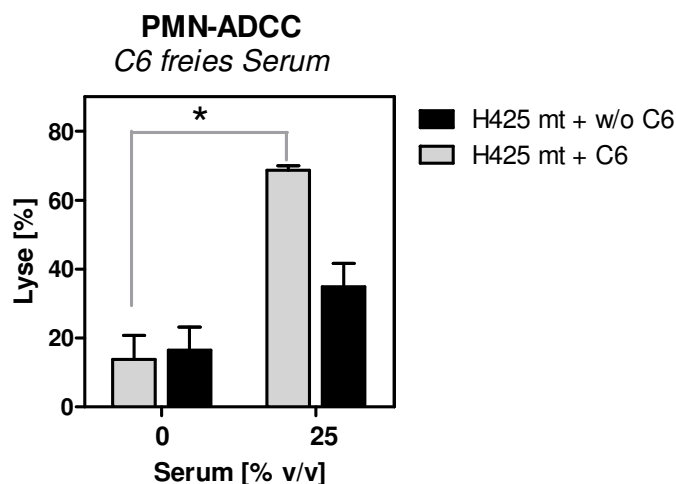


Abbildung 3.12 Chrom-Freisetzungsversuche mit A431 Zielzellen und PMNs. Die Effektor- Zielzellen Ratio (ET) beträgt 40:1. Die Versuche wurden ohne Serum oder in Gegenwart von 25% v/v C6-Freiem-Serum durchgeführt. Das C6-Freie-Serum wurde mit 65µg/ml C6 rekonstituiert oder unbehandelt gelassen. H425 mt oder der Kontrollantikörper lagen mit 10µg/ml vor.

Ergebnisse

Um zu überprüfen ob Eculizumab die initiale Anlagerung der Komplement Faktoren durch H425mt an A431 Zellen beeinflusst, wurden durchflusszytometrische Untersuchungen in An- und Abwesenheit von Eculizumab durchgeführt. Wie sich in Abb. 3.13 zeigt, verhindert die Zugabe von Eculizumab zum Serum nicht die von H425mt vermittelte Anlagerung von C1q, C4b(c) oder (i)C3b an die Zelloberfläche von A431 Zellen. Wie zu erwarten war, kommt es nicht zu der Bildung des MAC (C5b-9) auf A431 Zellen, wenn diese mit H425 mt und Eculizumab inkubiert werden (Abb. 3.13).

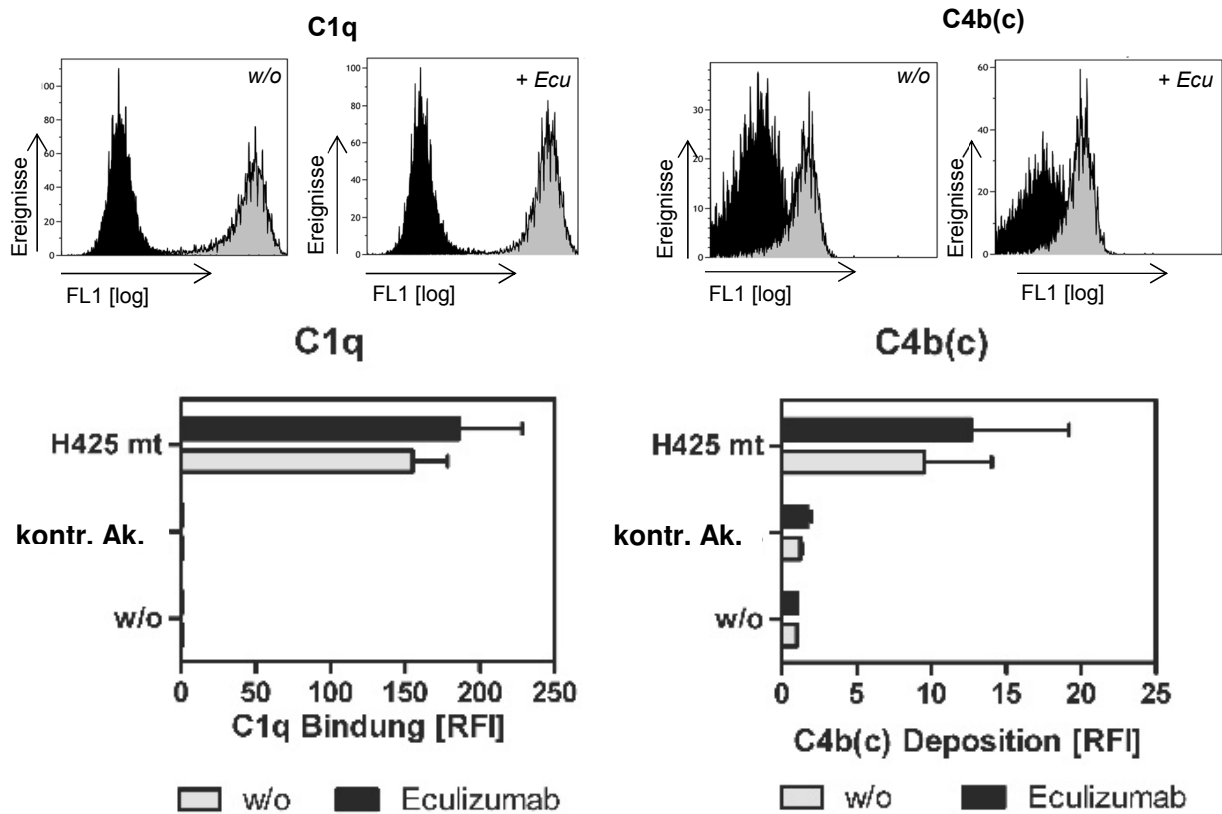


Abbildung 3.13: Erläuterungen siehe nächste Seite.

Ergebnisse

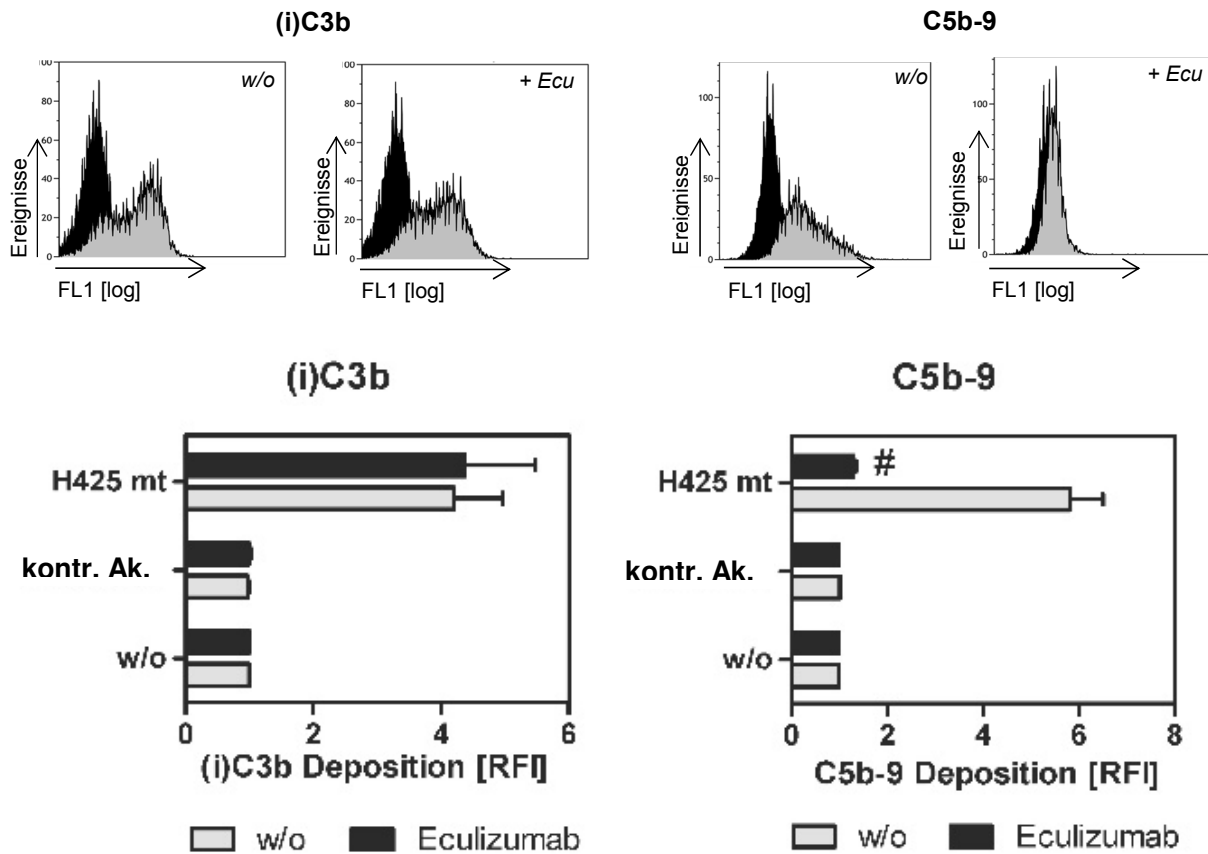


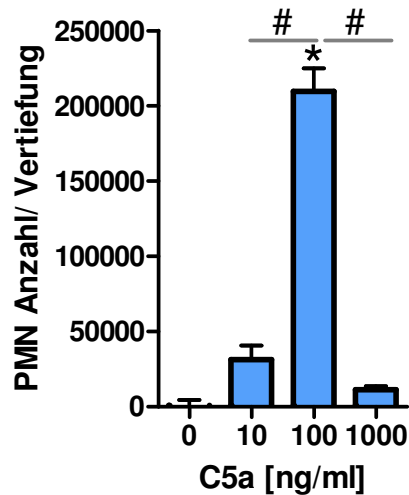
Abbildung 3.13 Durchflusszytometrische Analyse der Anlagerung der Komplementfaktoren, C1q, C4b(c), (i)C3b und C5b-9 an A431 Zellen. Die Versuche wurden in Gegenwart von 25% v/v Serum durchgeführt. H425 mt oder der Kontrollantikörper lagen mit 10µg/ml vor. Es wurden 50µg/ml Eculizumab dazu gegeben oder weggelassen. Die Versuchsreihen wurden für drei Stunden bei 37°C inkubiert. Die Ergebnisse sind Mittelwertangaben aus mindestens drei Versuchen mit verschiedenen, gesunden Probanden. * $p \leq 0,05$; (D) # $p \leq 0,05$ w/o Eculizumab vs. Eculizumab

3.8 C5a verbessert PMN-vermittelte Zellyse

Das Anaphylatoxin C5a ist ein Spaltprodukt des Komplementfaktors C5 und besitzt eine hohe biologische Aktivität. Der C5a-Rezeptor ist ein G-Protein gekoppelter Rezeptor mit zentraler Bedeutung für inflammatorische Prozesse [30].

Es ist bekannt, dass C5a einer der potentesten Botenstoffe für Chemotaxis der PMNs ist [58]. Zur Klärung der C5a Konzentration für in vitro Versuche wurde die Migration von PMNs in Transwell Mikrokammer Versuchen untersucht. Es zeigte sich, dass signifikante Migration von PMNs Richtung 100ng/ml C5a stattfindet, nicht aber Richtung 10 oder 1000ng/ml C5a. (Abb. 3.14).

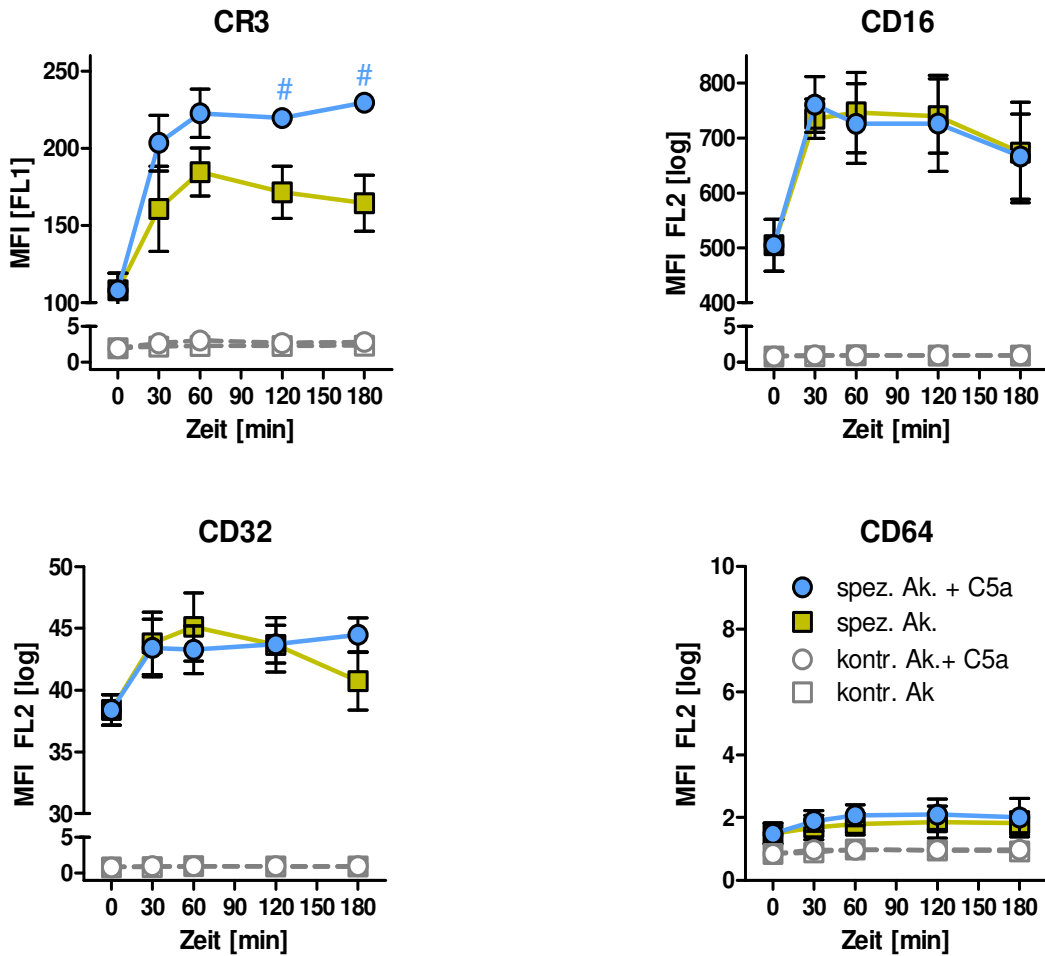
Ergebnisse



Abbildungen 3.14: Induktion von Chemotaxis der PMNs durch C5a. Die Transwell Mikroammer Platten wurden nach drei Stunden Inkubation bei 37°C ausgezählt. * $p \leq 0.05$ C5a vs. w/o; # $p \leq 0.05$.

Die zytotoxische Aktivität der PMNs, welche durch Antikörper hervorgerufen wird, beruht hauptsächlich auf der Interaktion des Fc-Fragments des Antikörpers mit CD32a auf den PMNs. Es konnte jedoch gezeigt werden, dass auch CR3 eine wichtige Rolle in der Aktivierung der PMNs spielt [59, 60]. Aufgrund der Erkenntnis, dass PMNs eine hohe Dichte an C5a-Rezeptoren auf ihrer Zelloberfläche exprimieren, wurde der Einfluss von C5a auf die Expression von CR3 sowie der Fc γ -Rezeptoren, CD16, CD32 oder CD64, untersucht.

Die Stimulation der PMNs mit C5a, GM-CSF oder mit GM-CSF und C5a wurde über drei Stunden hinweg untersucht (Abb. 3.15). Die Stimulation mit GM-CSF oder GM-CSF und C5a wurde durchgeführt aufgrund der Tatsache, dass in den vorherigen Versuchen auch mit GM-CSF stimuliert wurde.



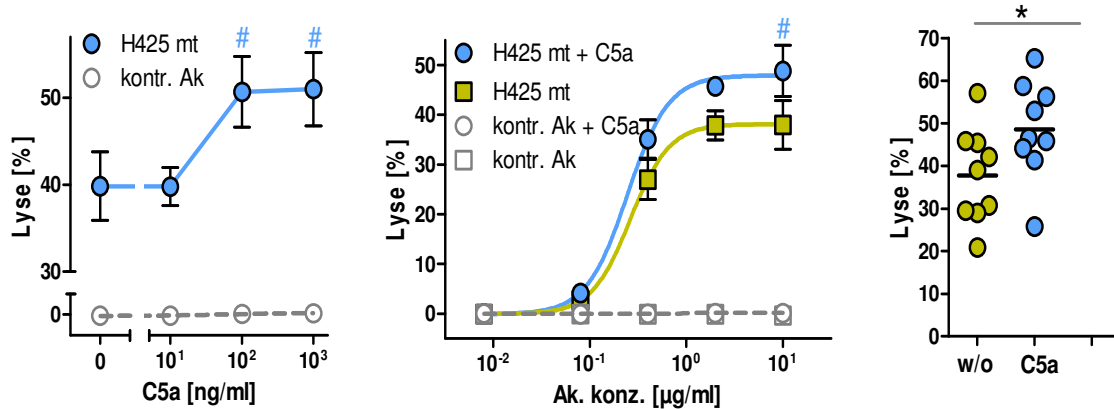
Abbildungen 3.15 PMNs wurden mit 100ng/ml C5a stimuliert. Stimulation von PMNs mit C5a, GM-CSF oder C5a und GM-CSF. Messung der Expression der Fc γ -Rezeptoren und der Komplement Rezeptoren, in halb bis stündlichen Abständen über drei Stunden, mittels Durchflusszytometrie. * $p \leq 0.05$ C5a + GM-CSF oder GM-CSF vs. C5a; # $p \leq 0.05$ w/o C5a + GM-CSF oder GM-CSF vs. C5a

Bei der Analyse der Ergebnisse zeigt sich, dass die Stimulation der PMNs innerhalb der ersten dreißig Minuten zu einer stark vermehrten Expression von CR3 und CD16 und einer mäßig vermehrten, aber signifikant vermehrten Expression von C1qRp, CR1 und CD32 auf der Zelloberfläche führt. Es wurde keine signifikanten Unterschiede zwischen den drei Stimuli hinsichtlich der Expressionsmuster nach dreißigminütiger Inkubation gefunden.

Die Kombination der beiden Stimuli, C5a und GM-CSF, führt zu signifikant höherer Expression von CD32 und CR3, bei einer Inkubationsdauer von über 180 Minuten, im Vergleich mit C5a Stimulation und im Falle von CR3 mit GM-CSF Stimulation. Im Vergleich aller Ergebnisse wurde bei dualer Stimulation (C5a und GM-CSF) für CR3 der deutlichste Anstieg detektiert. Des Weiteren konnten in diesen Stimulus-Versuchen keine signifikanten Veränderungen vom CD64, cC1qR oder gC1qR Expressionsmuster festgestellt werden.

Ergebnisse

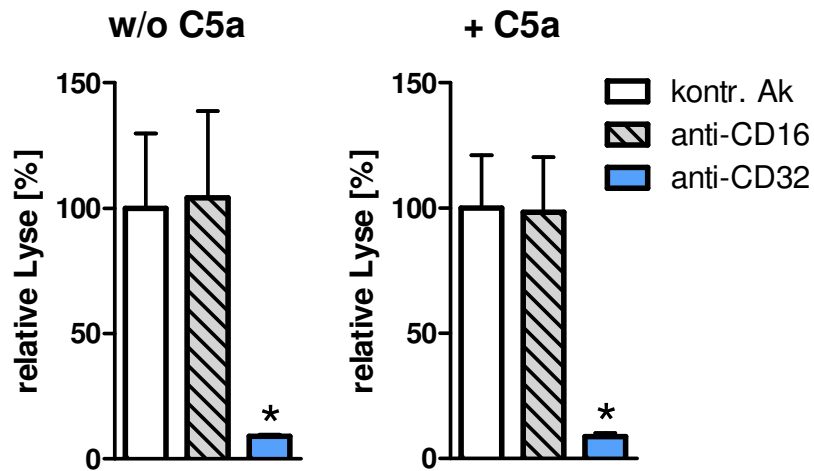
Um den Einfluss auf die lytische Aktivität der PMNs zu untersuchen, wurden ADCCs mit vor-stimulierten PMNs durchgeführt. Die PMNs wurden für 30 Minuten, bevor die ADCCs gestartet wurden, mit C5a bei 37°C inkubiert.



Abbildungen 3.16 (A) PMN vermittelte ADCCs, Humanes C5a in steigenden Konzentrationen und 10 µg/ml H425 mt. PMNs und A431 Zielzellen wurden in einem E:T Verhältnis von 80:1 konzentriert. . **(B)** 100 ng/ml Humanes C5a und steigende Konzentrationen des H425 mt. **(C)** 10µg/ml H425 mt +/- 100 ng/ml C5a. # $p \leq 0.05$

Es zeigte sich, dass C5a konzentrationsabhängig die Lyserate des ADCCs signifikant steigert. Bei einer Konzentration von 10µg/ml des H425 mt und einer E:T von 80:1 führten 100 ng/ml zur maximalen Steigerung der Lyse (Abb. 3.16 A+B). Des Weiteren zeigten ADCCs mit Dosis-Wirkungs-Kurve für H425 mt, dass die Stimulation der PMNs mit 100ng/ml C5a zu einer signifikanten Verbesserung der Lyse führt (Abb. 3.16 C) ADCCs mit MNCs als Effektorzellen, welche keine C5aR besitzen, zeigten keine verstärkte Lyse der A431 Zielzellen nach Behandlung mit C5a (Ergebnisse nicht abgebildet).

Um herauszufinden ob die durch H425 mt ausgelöste Zelllyse an die Interaktion mit CD16 oder CD32 gebunden ist und ob die Interaktion durch Stimulation mit C5a sich ändert, wurden PMN-Vermittelte ADCCs mit und ohne CD16 oder CD32 blockierenden Antikörpern durchgeführt. Es zeigte sich wie erwartet, dass die Blockade von CD16 keinen Effekt auf den PMN-Vermittelten ADCC hat. Die Zugabe von CD32 blockierenden Antikörpern hingegen unterbindet völlig die Tumorzelllyse im ADCC. Weiterhin zeigte sich, dass die Stimulation mit C5a zu keiner Veränderung der Ergebnisse im Rahmen dieser Fragestellung führte (Abb.3.17).



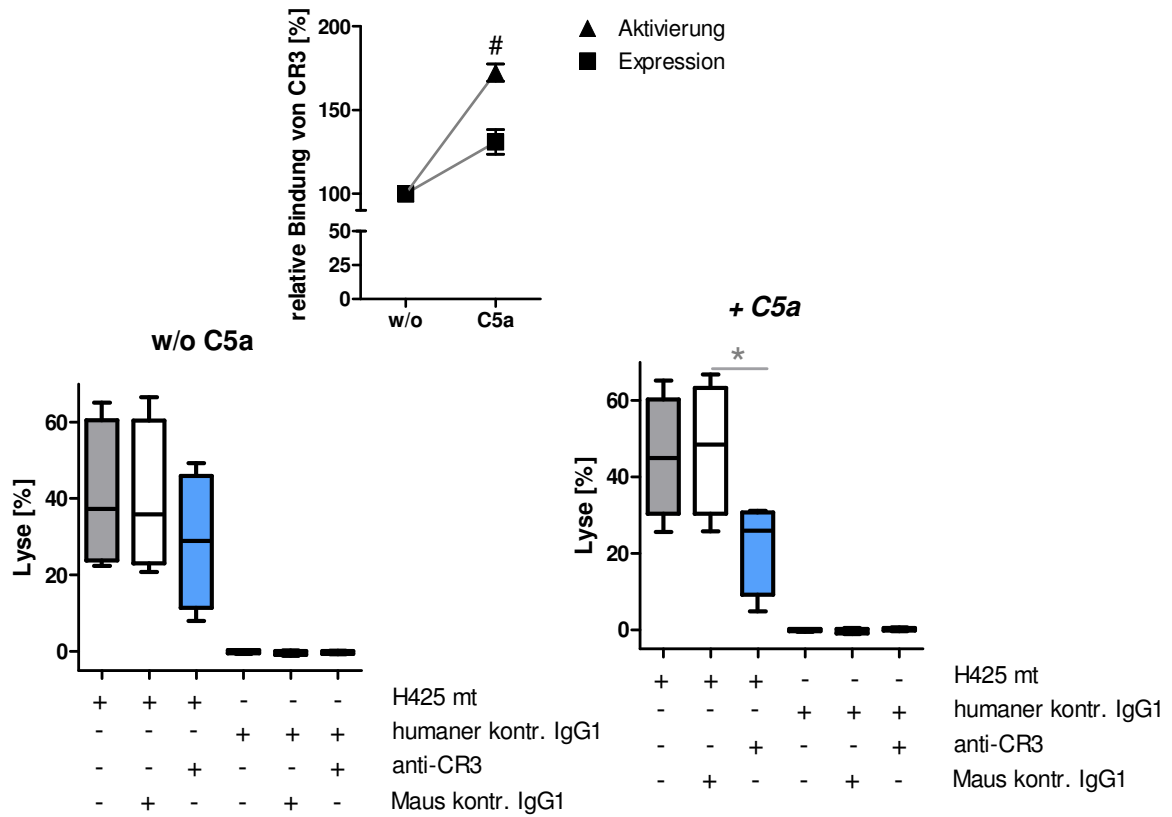
Abbildungen 3.17 H425 mit induzierter PMN-Vermittelter ADCC gegen A431 Zellen wurde analysiert in der Gegenwart von anti-CD16, anti-CD32 oder Kontrollantikörper. PMNs wurden vorstimuliert (Grafik links) oder nicht (Grafik rechts) mit C5a.

Die bisherigen Ergebnisse zeigen, dass C5a für PMNs nicht nur ein wichtiger Botenstoff der Chemotaxis ist, sondern auch zur Veränderungen der Rezeptorexpression führt sowie zu verstärkter Lyse im ADCC. Zur genaueren Bestimmung des Mechanismus der Steigerung der Lyserate wurden PMN - ADCCs mit CR3 (CD11b) blockenden Antikörpern durchgeführt.

Interessanterweise wurde die Lyserate signifikant (~ 50%) durch CR3 blockende Antikörper gehemmt, jedoch nur wenn die PMNs mit C5a stimuliert wurden. Im Versuchsaufbau ohne C5a führte die Zugabe von CR3 blockenden Antikörpern nicht zu einer Veränderung der Lyserate (Abb. 3.18 A+B).

Die erarbeiteten Daten dieser Arbeit zeigen, dass C5a einerseits wichtig im Bereich der Chemotaxis der PMNs ist, andererseits eine große Rolle in der Aktivierung und PMN vermittelten Tumorlyse spielt. Es konnte gezeigt werden, dass C5a über eine verstärkte Expression von CR3 zu einer erhöhten Zytotoxizität der PMNs, in einem durch H425 mt vermittelten ADCC führt.

Ergebnisse



Abbildungen 3.18 (A) PMNs wurden mit oder ohne Zusatz von 100 ng/ml C5a bei 37°C inkubiert, für 30 Minuten. Danach wurde in steigender Konzentration ein CR3 blockender Antikörper hinzugegeben und die konzentrationsabhängige Antikörperbindung durch indirekte Durchflusszytometrie analysiert, mittels des Antikörpers 2LPM19c oder CBRM1/5 (beide mit einer Konzentration von 10 µg/ml) # $p \leq 0.05$ (CR3 Aktivierung vs. CR3 Expression). **(B)** PMN vermittelter ADCC mit oder ohne C5a (100 ng/ml) Stimulation und in Gegenwart oder ohne 2 µg/ml CR3 blockenden Antikörpers (2LPM19c). # $p \leq 0.05$ C5a + vs. w/o.

Diskussion

4.1 Einleitung

Das Komplementsystem ist mit seinen fast sechzig Proteinen und aktivierenden Fragmenten sowie zahlreichen Interaktionen ein hoch komplexes und effektives System zur Bekämpfung von Krankheitserregern[61]. Medikamente wie Rituximab, welche das Komplementsystem potentiell gegen Krebszellen richten, zeichnen sich durch eine hohe lytische Wirksamkeit aus, jedoch kann eine effiziente Wirksamkeit auch mit starker Toxizität einhergehen[62]. Daher gilt es das Komplementsystem als Teil der Effektormechanismen in der zielgerichteten Krebstherapie genau zu untersuchen sowie die Interaktionen des humoralen und zellulären Immunsystems. Ein genaues Verständnis der regulatorischen Interaktionen bei Entzündungsprozessen sowie im Tumorgewebe birgt die Möglichkeit, effektivere Medikamente mit limitierter Toxizität zu entwickeln und Therapien besser zu steuern.

4.2 Komplement optimierter Matuzumab Antikörper

Die potentielle Verbesserung der Effektorfunktionen durch eine Verbesserung des Zusammenspiels von humoralen und zellulären Effektormechanismen, mittels einer gesteigerten Komplementsystemaktivierungskapazität des Antikörpers Matuzumab, ist wohl das hervorstechendste Ergebnis im Rahmen dieser Arbeit.

Die Aktivierung des Komplementsystems in vitro durch EGFR-Antikörper, wie Cetuximab, Panitumumab und Matuzumab ist nur durch Kombination von zwei nicht kreuzblockierenden Antikörpern möglich [52].

Der gegen den EGF-Rezeptor gerichtete IgG1 Antikörper Matuzumab wurde durch den Austausch zweier Aminosäuren (K326A/ E333A) in der CH2 Domäne des Fc-Teils so modifiziert, dass er den klassischen Weg der Komplementkaskade induzieren kann. Dies resultiert in einer effizienten Zellyse von circa 40% (A431, DiFi, A1207) durch das Komplementsystem in vitro. Die von Idusogie et al. erzeugte und beschriebene Mutation der CH2 Domäne bewirkte eine Verstärkung der Aktivierung des Komplementsystems, ohne Verringerung des ADCCs bei dem CD20 Antikörper Rituximab [33]. Für den Matuzumab Antikörper wurde durch diese Mutation die Aktivierung des Komplementsystems ermöglicht, welche der Wildtyp nicht aufweist.

Der Anteil von CDC an der Effektivität von Antikörpern in vivo wird kontrovers diskutiert, da Tumore über Expression von CRP die Aktivierung des Komplementsystems

inhibieren können. Um eine Inhibierung des CDC zu überwinden, könnte die Modifizierung der CH2 Domäne beitragen [41, 63].

In den ADCC Versuchen mit MNCs oder mit GM-CSF stimulierten PMNs, zeigte sich kein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Antikörpervarianten oder den Effektorpopulationen hinsichtlich der Effektorzell-vermittelten Zytotoxizität. Die maximale Lyse lag bei ca. 30% der Zielzellen. Diese Ergebnisse zeigen, dass die verbesserte Komplementaktivierung auch beim Matuzumab Antikörper nicht zu einer Beeinträchtigung der Interaktion mit MNCs oder PMNs führt.

Durch Hinzufügen von Serum als Effektorquelle zusätzlich zu MNCs, kam es zu signifikanten Unterschieden bei der Lyse von A431 Zielzellen. So erzielte der H425 mt Antikörper eine maximale Lyse der Zielzellen von über 60%, wenn MNCs und Serum als Effektoren vorlagen. H425 wt hingegen zeigte keine gesteigerte Lyse der Zielzellen in dem Versuchsaufbau.

Die Kombination von PMNs und Serum als Effektoren zeigt einmal mehr die Überlegenheit hinsichtlich der Lyse von A431 Zielzellen, vermittelt von H425 mt gegenüber H425 wt.

Die Aktivierung des Komplementsystems durch H425 mt führt nicht nur zur Lyse durch den MAC, sondern auch zur Opsonierung der Zielzellen, wodurch die Effektivität des CDCC gesteigert wird [64]. Es ist jedoch fraglich, ob die Opsoninkonzentrationen in diesen Versuchen signifikante Auswirkungen hat. Jedoch wird durch das Zusammenwirken von Komplement und PMNs eine Steigerung der Lyse von ~30% auf ~50% der Zielzellen erreicht.

Die vom Matuzumab Antikörper vermittelte Lyse von ~30% der Zielzellen wird durch Hinzugabe von Serum zu den PMNs auf ~8% reduziert. Dies ist wahrscheinlich auf, um den Fc γ R1IIa konkurrierende Antikörper aus dem Serum zurück zu führen.

In den CDCC Versuchen mit Vollblut von Patienten, welche mit G-CSF behandelt wurden, zeigte sich weiterhin die signifikante Verbesserung der Lyserate durch Aktivierung des Komplementsystems. So erreichte H425 wt eine Lyse von ~20% und der H425 mt ~50%. Die Lyserate von ~20% beruht auf der Stimulierung mit G-CSF, in Versuchen ohne wurden keine deutlich signifikanten Ergebnisse durch H425 wt erzielt (Daten nicht abgebildet). Rösner et al. zeigte in Vollblut CDCCs mit CD20 Antikörpern gegen CD 20 positive Zellen ähnliche Ergebnisse. Durch die Inhibierung des Komplementsystems mit Eculizumab wurde die Lyse der Zielzellen inhibiert. Außer bei Zellen der Ramos Zelllinie, welche die höchste Antigendichte aufweisen, diese zeigten

eine geringe Inhibierung des CDCC durch Eculizumab. Interessanterweise zeigt sich in den Versuchen, dass das Komplementsystem auch bei geringer Antigendichte signifikante Lyseraten erzielt im Gegensatz zur Zell-vermittelten-Zytotoxizität.

Es gilt jedoch zu bedenken, dass diese gesteigerte Effektivität mit verstärkten Nebenwirkungen in vivo einhergehen könnte. Ein viel diskutierter Punkt ist die mögliche Schädigung der Leber durch die Aktivierung des Komplementsystems im gesunden Lebergewebe [22]. Auch die akneiforme Dermatitis könnte durch einen Komplementsystem optimierten Antikörper therapielimitierende Ausmaße annehmen. Analysen ergaben, dass Patienten mit stärkeren Nebenwirkungen oft eine verbesserte Wirksamkeit der EGFR-Antikörper aufzeigen [65, 66]. Im Umkehrschluss könnten Antikörper mit massiv gesteigerter Wirkung aber auch verstärkte Hautreaktionen hervorrufen.

4.3 Auswirkung der Komplementsystemaktivierung auf ADCC

Durch die CDC-Optimierung des Matuzumab Antikörpers kommt es zu einer Steigerung der Tumorzellyse im experimentellem Setting, welche unter anderem durch Interaktion von humoralen und zellulären Effektoren erreicht wird. In den Versuchen dieser Arbeit wurden keine Einflüsse von Serum oder Komplementspaltprodukten auf MNC-vermittelten CDCC festgestellt. Interessanterweise konnte Mamidi et al. eine Steigerung der MNC vermittelten Lyse, durch Hinzufügen von C8 defizienten Serum, nachweisen [67]. Der Versuchsaufbau unterschied sich jedoch von den Versuchen dieser Arbeit; so wurde eine Opsonisierung und Anstieg der Anaphylatoxine erzielt, bevor die MNCs zu den Zielzellen hinzugefügt wurden. Des Weiteren könnten die verschiedenen Ergebnisse auf Verwendung von unterschiedlichen EGFR-Antikörpern oder Zielzellen beruhen. Eine aktivierende Wirkung von Komplementspaltprodukten auf MNCs ist jedoch durch Modifizierung des Versuchsaufbaus wahrscheinlich nachweisbar.

Hinsichtlich des PMN-vermittelten ADCCs zeigte sich, dass die Spaltung von C5 essentiell ist. Die genauere Analyse ergab, dass das Anaphylatoxin C5a direkt CR3-abhängigen PMN-vermittelten ADCC gegen Tumorzellen verstärkt. In den CDCCs fiel auf, dass es durch die kombinierte Lyse vom Komplementsystem und PMNs zu einer signifikanten Steigerung der Zellyse kam.

Die Inhibierung des PMN ADCCs durch Hinzufügen von Serum und Eculizumab ist wie

oben besprochen vermutlich auf um den Fc-Rezeptor CD32a, konkurrierende Antikörper zurückzuführen [68, 69]. In Versuchen, deren Daten hier nicht aufgeführt werden, zeigte sich eine signifikante Inhibierung des PMN ADCCs durch Hinzugabe von hitzeinaktiviertem Serum. Dadurch wurden die hitzeinstabilen Proteine des Komplementsystems als Verursacher ausgeschlossen.

In weiteren Versuchen konnte ein weiterer Hinweis auf die stimulierende Wirkung von C5a auf PMNs aufgezeigt werden. Es zeigte sich deutlich im Versuch mit C6-defizientem Serum, die signifikante Steigerung der Lyse des PMN ADCCs durch Ablauf der Komplementkaskade bis C6, bei welcher es zur Generierung von C5a kommt.

Zur genaueren Analyse des Einflusses von C5a auf PMNs wurden die Versuche mit C5a und PMNs durchgeführt. In diesen wird die signifikante Stimulierung der PMNs die sich unter anderem durch das vermehrte Expressieren der CR3 Rezeptoren zeigt, deutlich. Interessanterweise zeigen auch die Daten von Brekke et al. eine Verbindung von C5a Stimulation zu CR3 Expression und Effektormechanismen von Granulozyten. So werden Phagozytose von *E. coli*, Oxidativer-burst sowie Expression von CR3 durch C5aR-Antagonist oder ein anti-C5-Antikörper in Versuchen mit menschlichem Vollblut inhibiert. Eine Stimulation mit C5a hingegen, führt auch in jenen Versuchen zu einer verstärkten Expression von CR3 auf Granulozyten [70].

Als ergänzender Punkt soll hier erwähnt werden, dass der CR3 nicht nur Opsonine aus der Komplementkaskade wie C3b und seine Derivate bindet, sondern über seine Lektin-like Bindungsstelle auch mit dem FcγRIIIb interagiert. Diese Interaktion führt bei neutrophilen Zellen zu einer verstärkten intrazellulären Freisetzung von Kalzium sowie Produktion von Superoxiden, sofern diese Reaktion durch effektive Immunkomplexe ausgelöst wird [71-73]. Insgesamt unterstützen diese Ergebnisse die Hypothese, welche von Ehlenberger-Nussenzweig aufgestellt wurde, dass die Bindung von Spaltprodukten des Komplementsystems an seine Rezeptoren essentiell ist, um eine effektive Präsentation von IgG Immunkomplexe, den Phagozytenrezeptoren, wie dem FcγRIIIb, hervorzurufen und PMN-Effektorfunktionen gegen pathogene Keime zu steigern [74].

4.4 Die Rolle von C5a in der Tumorprogression

Es ist weithin bekannt, dass C5a ein chemotaktischer Botenstoff ist. In Mausmodellversuchen wurde gezeigt, dass C5a neutrophile Granulozyten an Orte der

viralen [75], bakteriellen oder pilzartigen [76] Infektion rekrutiert und aktiviert. Hier wurde die Aktivierung von Granulozyten durch C5a schon beschrieben und auch die chemotaktische Wirkung auf humane Granulozyten verifiziert. Der positive Beitrag zur Infekt Bekämpfung ist unstrittig, jedoch wurden gegensätzliche Effekte von C5a in soliden Tumoren hinsichtlich der Tumorprogression beobachtet und beschrieben [77]. So zeigte sich in Mausmodellversuchen, mit C5a-transfizierten Tumoren, zu mit Kontrollvektor transfizierten xenotransplantat Tumoren, eine geringere Tumorlast. Im Gegensatz dazu ergaben Mausmodellversuche in Hinblick auf Lymphome, die hohe Konzentrationen an C5a aufweisen, im Vergleich zu genidentischen Lymphomen, mit niedrigen C5a Konzentrationen, mehr myeloische Zellen in der Milz und eine beschleunigte Tumorprogression [77]. Somit zeigte Gunn et al., dass die Aktivierung des Komplementsystems das Tumorwachstum verstärkt. Dies ist vor allem auf die von C5a ausgelöste Signalkaskade zurück zu führen und wird unterstützt durch die Beobachtung, dass C5a zu verstärkter Infiltration des Tumors mit myeloisch-regulatorischen Zellen führt. Letztere bewirken eine Hemmung der anti-tumorösen zytotoxischen T-Zellen [78]. Das Vergleichen der Ergebnisse von Gunn et al. und Markiewski et al. stärkt die Hypothese, dass abhängig vom Tumormilieu und der Konzentration der Botenstoffe, das Komplementsystem fördernde oder hemmende Auswirkungen auf das Wachstum solider Tumore hat.

In den Chemotaxis Versuchen dieser Arbeit zeigte sich, dass eine zu starke Steigerung der C5a Konzentration eine Hemmung der PMN Migration bewirkt. Des Weiteren zeigte sich in den Stimulationsversuchen mit C5a kein inhibierender Effekt von überhöhten C5a Konzentrationen aber auch keine weitere Stimulation. Im Rahmen dieser Arbeit wurde jedoch wiederholt die signifikante Steigerung der Lyserate durch Aktivierung des Komplementsystems nachgewiesen.

4.5 Die Interaktion von Komplement- und Fc-Rezeptoren

In dieser Arbeit konnte eine deutliche Steigerung der Effektorfunktion der PMNs durch C5a nachgewiesen werden. Mittels Durchflusszytometrie wurde eine vermehrte Expression von CR3 sowie eine gesteigerte Affinität, nach Stimulierung mit C5a bewiesen.

Die Affinität der Integirne, wie zum Beispiel CR3, zu ihren Liganden, wird durch G-Protein gekoppelte Rezeptoren (engl. G-protein coupled receptor, GPCR) gesteuert.

Verantwortlich dafür sind „inside-out“ (vom Zellinnern nach außen) Signale, nachgewiesen in Leukozyten [79]. Aus diesem Grund könnte man die Hypothese aufstellen, dass gesteigerte CR3 Aktivierung, hervorgerufen durch C5a, ein Resultat der GPCR des C5aR vermittelten „inside-out“ Signals von PMNs ist. Dieses „inside-out“ Signal ermöglicht die weitere CR3-abhängige Aktivierung der Tyrosinkinase Src, welche die Phosphorylierung des ITAM-beinhaltenen CD32a bewirkt. Der FcγRIIIa wiederum aktiviert die Tyrosinkinase Syk [80], die eine zentrale Rolle in der Phagozytose einnimmt [81]. Es ist bekannt, dass die ADCC-Aktivität von Granulozyten, vermittelt durch gegen EGFR gerichtete IgG1 Antikörper, vor allem durch die Liganden von CD32a hervorgerufen wird [59]. Auch in Versuchen dieser Arbeit führte die Stimulierung von PMNs über den CR3 zu einer gesteigerten ADCC Aktivität gegen EGFR positive Tumore. Der Einfluss von C5a auf die Fc-Rezeptoren wurde in verschiedensten Mausmodell Versuchen untersucht. In diesen Studien resultiert die Bindung von C5a an seinen Rezeptor C5aR in der vermehrten Expression von aktivierenden Fc-Rezeptoren und parallel zur verminderten Expression vom inhibitorischen Rezeptor FcγRIIIb auf alveolaren oder peritonealen Makrophagen sowie auf Kupfferzellen. Diese regulatorische Funktion von C5aR Signalen führte zu einer relative höheren Oberflächenexpression von aktivierenden gegenüber inhibierenden Fc-Rezeptoren, dies wurde von verstärkter Aktivierung der Effektorzellen begleitet [82-84].

Die Wichtigkeit der Interaktion zwischen Komplementrezeptoren und Fc-Rezeptoren auf den Effektorzellen im Rahmen der Antikörpertherapie, wurde durch weitere syngene Tumormäusemodelle mit löslichen β-Glucan aus Hefe, einem natürlich vorkommenden CR3 aktivierendem Polysaccharid, gezeigt. In den Versuchen führte die Behandlung mit β-Glucan zu einer Verbesserung der CR3-abhängigen anti-tumorösen Effekte, der gegen den Tumor gerichteten Antikörper (anti-GD2 oder anti-MUC1). In jener Studie sollten die Granulozyten die hauptsächliche Effektor-Population sein, da keine anti-tumorösen Effekte in Mäusen gesehen wurde, bei denen die Granulozyten entfernt wurden [85]. Diese Daten wurden durch eine erweiternde Studie ergänzt, welche die Effekte von C5a unter β-Glucan Behandlung genauer betrachtet. Es zeigte sich, dass die Signalkette, ausgelöst durch C5a von zentraler Bedeutung ist, um die Antikörpervermittelte Elimination von Krebszellen durch Granulozyten, in jenem Tumormäusemodell zu steigern [86]. Die gleiche Arbeitsgruppe publizierte zwei Jahre später eine weitere Studie, welche ähnliche Effekte von β-

Glucan in der Behandlung von Tumoren mit anti-Her2/neu (Trastuzumab) oder anti-EGFR (Cetuximab) in Mäusemodellen zeigte [87]. In dieser Studienreihe wurde einmal mehr nachgewiesen wie wichtig die komplexe Wechselwirkung zwischen Fc-Rezeptoren und Komplementrezeptoren auf Granulozyten in der Krebstherapie mit Antikörpern ist. Eine kürzlich veröffentlichte Studie von Zhu et al. zeigte in Tumormausmodellen, die zentrale Rolle von abgestimmten Effekten beim Zusammenspiel zwischen angeborenem und erworbenem Immunsystem. In diesen Tumormodellen kam es zu einer Stimulierung von NK-Zellen und CD8⁺ T-Zellen durch Verabreichen von dem Antikörper TA99 und Fc/IL2. Dies führte zur Rekrutierung von neutrophilen Granulozyten durch MIP-2, welches von Makrophagen freigesetzt wurde, sowie einem Zytokinsturm im Tumor. Insgesamt wurde so die Effektivität der Antikörpertherapie gesteigert durch Nutzung des PMN vermittelten ADCCs [88]. Folglich sollte die verbesserte Aktivierung von Granulozyten, sowie die Rekrutierung des Komplementsystems und den daraus resultierenden verstärkten Effektorfunktionen, Ziel der gegen EGFR positive Tumore gerichteten Antikörpertherapie sein.

4.6 Schlusswort

In dieser Arbeit sind neue Ergebnisse hinsichtlich eines gegen den EGF-Rezeptor gerichteten Komplement-optimierten Antikörpers vorgestellt worden. Dieser Antikörper führte zu interessanten Einblicken in das Zusammenspiel von Komplementsystem und Granulozyten und verdeutlichte, dass durch Aktivierung des Komplementsystems zelluläre Effektorfunktionen gesteigert werden.

Die Entwicklung von Komplement-optimierten EGFR Antikörpern birgt die Hoffnung Medikamente zu finden, welche in Erkrankungsstadien wirken, die zurzeit durch unaufhaltbaren Progress gekennzeichnet sind. Diese neue „Klasse“ von Antikörper rekrutiert das Komplementsystem sowie die Effektorzellen des Immunsystems um effektiv die Destruktion von Krebszellen herbeizuführen. Durch die zusätzliche Aktivierung des Komplementsystems werden die Granulozyten in ihrer Effektorfunktion mittels C5a stimuliert und durch Opsonine der Komplementkaskade Tumorzellen markiert. Es bleibt abzuwarten und vor allem zu erforschen, ob diese positiven Ergebnisse in vitro zu verbesserten Antikörpertherapien von Krebspatienten führen.

Literaturverzeichnis

1. Hanahan, D. and R.A. Weinberg, The hallmarks of cancer. *Cell*, 2000. **100**(1): p. 57-70.
2. Hanahan, D. and R.A. Weinberg, Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*, 2011. **144**(5): p. 646-74.
3. Sliwkowski, M.X. and I. Mellman, Antibody therapeutics in cancer. *Science*, 2013. **341**(6151): p. 1192-8.
4. Cohen, S., G. Carpenter, and L. King, 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): p. 4834-4842.
5. Ganten, D., K. Ruckpaul, and S. Aretz, *Grundlagen der Molekularen Medizin*. 3., überarbeitete und erw. Aufl. ed. 2008, Heidelberg: Springer Medizin. 546.
6. Ciardiello, F. and G. Tortora, EGFR antagonists in cancer treatment. *N. Engl. J. Med.*, 2008. **358**: p. 1160-1174.
7. Citri, A. and Y. Yarden, EGF-ERBB signalling: towards the systems level. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2006. **7**(7): p. 505-16.
8. Salomon, D.S., et al., Epidermal growth factor-related peptides and their receptors in human malignancies. *Crit Rev Oncol Hematol*, 1995. **19**(3): p. 183-232.
9. Lubin, J.H. and N.E. Caporaso, Cigarette smoking and lung cancer: modeling total exposure and intensity. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 2006. **15**(3): p. 517-23.
10. Doll, R. and A.B. Hill, Smoking and Carcinoma of the Lung. *Br Med J*, 1950. **2**(4682): p. 739-48.
11. Creighton, N., D. Perez, and T. Cotter, Smoking-attributable cancer mortality in NSW, Australia, 1972-2008. *Public Health Res Pract*, 2015. **25**(3).
12. Smith, C.J., et al., "IARC group 2A Carcinogens" reported in cigarette mainstream smoke. *Food Chem Toxicol*, 2000. **38**(4): p. 371-83.
13. Leon, M.E., et al., *European Code Against Cancer*, 4th edition: Tobacco and cancer. *Cancer Epidemiol*, 2015.
14. GEKID, *Krebs in Deutschland, Häufigkeiten und Trends*. 5. überarbeitete, aktualisierte Ausgabe. 2006 GEKID Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e. V. in Zusammenarbeit mit dem Robert Koch Institut.
15. Herold, G., *Innere Medizin: Eine vorlesungsorientierte Darstellung : unter Berücksichtigung des Gegenstandskataloges für die Ärztliche Prüfung : mit ICD 10-Schlüssel im Text und Stichwortverzeichnis*. 2013 ed. 2013, Köln: Herold. 988 S.
16. Van Cutsem, E., et al., Cetuximab and chemotherapy as initial treatment for metastatic colorectal cancer. *N Engl J Med*, 2009. **360**(14): p. 1408-17.
17. Lievre, A., et al., KRAS mutations as an independent prognostic factor in patients with advanced colorectal cancer treated with cetuximab. *J Clin Oncol*, 2008. **26**(3): p. 374-9.
18. Allegra, C.J., 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. *J Clin Oncol*, 2009. **27**(12): p. 2091-6.
19. Bendig, M.M.W.H., C.A.W.H. Kettleborough, and J.E. Saldanha, Humanisierte monoklonale antikörper. 2004, Google Patents.

20. Rivera, F., et al., Current situation of Panitumumab, Matuzumab, Nimotuzumab and Zalutumumab. *Acta Oncol*, 2008. **47**(1): p. 9-19.
21. Schmiedel, J., et al., Matuzumab binding to EGFR prevents the conformational rearrangement required for dimerization. *Cancer Cell*, 2008. **13**(4): p. 365-73.
22. Peipp, M., M. Dechant, and T. Valerius, Sensitivity and resistance to EGF-R inhibitors: approaches to enhance the efficacy of EGF-R antibodies. *MABs*, 2009. **1**(6): p. 590-9.
23. Kohrt, H.E., et al., Combination strategies to enhance antitumor ADCC. *Immunotherapy*, 2012. **4**(5): p. 511-27.
24. Takeda. Takeda Discontinues Development of Matuzumab. 2008.
25. Edelman, G.M., et al., The covalent structure of an entire γ G immunoglobulin molecule. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 1969. **63**(1): p. 78-85.
26. Strebhardt, K. and A. Ullrich, Paul Ehrlich's magic bullet concept: 100 years of progress. *Nat Rev Cancer*, 2008. **8**(6): p. 473-480.
27. Sir Frank Macfarlane Burnet 1899-1985. *Nat Immunol*, 2007. **8**(10): p. 1009-1009.
28. Köhler, G. and C. Milstein, Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature*, 1975. **256**(5517): p. 495-497.
29. Reichert, J.M., Antibodies to watch in 2014. *MABs*, 2014. **6**(1): p. 5-14.
30. Murphy, K., *Janeway's immunobiology*. 2014, [Place of publication not identified]: Garland Science.
31. Peipp, M., M. Dechant, and T. Valerius, Effector mechanisms of ErbB antibodies. *Curr Opin Immunol*, 2008. **20**: p. 436-443.
32. Jefferis, R., J. Lund, and J.D. Pound, IgG-Fc-mediated effector functions: molecular definition of interaction sites for effector ligands and the role of glycosylation. *Immunol Rev*, 1998. **163**: p. 59-76.
33. Idusogie, E.E., et al., Engineered antibodies with increased activity to recruit complement. *J Immunol*, 2001. **166**(4): p. 2571-5.
34. Dashivets, T., et al., Multi-Angle Effector Function Analysis of Human Monoclonal IgG Glycovariants. *PLoS One*, 2015. **10**(12): p. e0143520.
35. Ehrlich P, M.J., Ueber Haemolysine : zweite Mittheilung. *Berliner Klinische Wochenschrift*, 1899. **36**: p. 481-486
36. Ehrlich P, M.J., Zur Theorie der Lysinwirkung. *Berliner Klinische Wochenschrift* 1899. **36**: p. 6-9.
37. Ehrlich P, M.J., Ueber Haemolysine : dritte Mittheilung. *Berliner Klinische Wochenschrift* 1900. **37**: p. 453-458.
38. Ehrlich P, M.J., Ueber Hämolysine : vierte Mittheilung. *Berliner Klinische Wochenschrift* 1900: p. 681-687
39. Kemper, C. and D.E. Hourcade, Properdin: New roles in pattern recognition and target clearance. *Mol Immunol*, 2008. **45**(16): p. 4048-56.
40. Takahashi, M., et al., Role of MBL-associated serine protease (MASP) on activation of the lectin complement pathway. *Adv Exp Med Biol*, 2007. **598**: p. 93-104.
41. Gelderman, K.A., et al., Complement function in mAb-mediated cancer immunotherapy. *Trends Immunol*, 2004. **25**(3): p. 158-64.
42. Paul Hannan, J., The Structure-Function Relationships of Complement Receptor Type 2 (CR2; CD21). *Curr Protein Pept Sci*, 2015.
43. Muto, S., V. Vetvicka, and G.D. Ross, CR3 (CD11b/CD18) expressed by cytotoxic T cells and natural killer cells is upregulated in a manner similar to neutrophil CR3 following stimulation with various activating agents. *J Clin Immunol*, 1993. **13**(3): p. 175-84.

44. Matsubara, S., et al., Complement C4-derived monocyte-directed chemotaxis-inhibitory factor. A molecular mechanism to cause polymorphonuclear leukocyte-predominant infiltration in rheumatoid arthritis synovial cavities. *Am J Pathol*, 1991. **138**(5): p. 1279-91.
45. Klos, A., et al., The role of the anaphylatoxins in health and disease. *Molecular Immunology*, 2009. **46**(14): p. 2753-2766.
46. el-Lati, S.G., C.A. Dahinden, and M.K. Church, Complement peptides C3a- and C5a-induced mediator release from dissociated human skin mast cells. *J Invest Dermatol*, 1994. **102**(5): p. 803-6.
47. Klos, A., et al., The role of the anaphylatoxins in health and disease. *Mol Immunol*, 2009. **46**(14): p. 2753-66.
48. Fischer, W.H. and T.E. Hugli, Regulation of B cell functions by C3a and C3a(desArg): suppression of TNF-alpha, IL-6, and the polyclonal immune response. *J Immunol*, 1997. **159**(9): p. 4279-86.
49. Polunina, T.A., et al., [Proteomic methods of protein separation and analysis]. *Zh Mikrobiol Epidemiol Immunobiol*, 2014(3): p. 107-14.
50. Janeway, C.A., Jr. and R. Medzhitov, Innate immune recognition. *Annu Rev Immunol*, 2002. **20**: p. 197-216.
51. Peipp, M., et al., Antibody fucosylation differentially impacts cytotoxicity mediated by NK and PMN effector cells. *Blood*, 2008. **112**: p. 2390-2399.
52. Dechant, M., et al., Complement- dependent tumor cell lysis triggered by combinations of EGF-R antibodies. *Cancer Res*, 2008. **68**: p. 4998-5003.
53. Repp, R., et al., Combined Fc-protein- and Fc-glyco-engineering of scFv-Fc fusion proteins synergistically enhances CD16a binding but does not further enhance NK-cell mediated ADCC. *J Immunol Methods*, 2011. **373**(1-2): p. 67-78.
54. Moore, G.L., et al., Engineered Fc variant antibodies with enhanced ability to recruit complement and mediate effector functions. *MAbs*, 2010. **2**(2).
55. Clark, M.R., IgG effector mechanisms. *Chem Immunol*, 1997. **65**: p. 88-110.
56. Wang, S.Y., et al., NK-cell activation and antibody-dependent cellular cytotoxicity induced by rituximab-coated target cells is inhibited by the C3b component of complement. *Blood*, 2008. **111**(3): p. 1456-63.
57. van Meerten, T., et al., Complement-induced cell death by rituximab depends on CD20 expression level and acts complementary to antibody-dependent cellular cytotoxicity. *Clinical Cancer Research*, 2006. **12**(13): p. 4027-35.
58. Ehrenguber, M.U., T. Geiser, and D.A. Deranleau, Activation of human neutrophils by C3a and C5A. Comparison of the effects on shape changes, chemotaxis, secretion, and respiratory burst. *FEBS Lett*, 1994. **346**(2-3): p. 181-4.
59. Derer, S., et al., Increasing FcγRIIIa affinity of an FcγRIII-optimized anti-EGFR antibody restores neutrophil-mediated cytotoxicity. *MAbs*, 2014. **6**(2): p. 409-21.
60. van Spriel, A.B., et al., Mac-1 (CD11b/CD18) is essential for Fc receptor-mediated neutrophil cytotoxicity and immunologic synapse formation. *Blood*, 2001. **97**(8): p. 2478-86.
61. M, K.L. and J.P. Atkinson, Complement regulators in human disease: lessons from modern genetics. *J Intern Med*, 2015. **277**(3): p. 294-305.
62. Winkler, U., et al., Cytokine-release syndrome in patients with B-cell chronic lymphocytic leukemia and high lymphocyte counts after treatment with an anti-CD20 monoclonal antibody (rituximab, IDEC-C2B8). *Blood*, 1999. **94**(7): p. 2217-24.
63. Derer, S., et al., Complement in Antibody-Based Tumor Therapy. *Critical*

- Reviews in Immunology, 2014. **34**(3): p. 199-214.
64. Gelderman, K.A., et al., The inhibitory effect of CD46, CD55, and CD59 on complement activation after immunotherapeutic treatment of cervical carcinoma cells with monoclonal antibodies or bispecific monoclonal antibodies. *Lab Invest*, 2002. **82**(4): p. 483-93.
 65. Kurbel, B., A.Z. Golem, and S. Kurbel, Are predictions of cancer response to targeted drugs, based on effects in unrelated tissues, the 'Black Swan' events? *Future Oncol*, 2015. **11**(16): p. 2307-14.
 66. Macdonald, J.B., et al., Cutaneous adverse effects of targeted therapies: Part I: Inhibitors of the cellular membrane. *J Am Acad Dermatol*, 2015. **72**(2): p. 203-18; quiz 219-20.
 67. Mamidi, S., et al., Lipoplex mediated silencing of membrane regulators (CD46, CD55 and CD59) enhances complement-dependent anti-tumor activity of trastuzumab and pertuzumab. *Mol Oncol*, 2013. **7**(3): p. 580-94.
 68. Bruhns, P., et al., Specificity and affinity of human Fcγ receptors and their polymorphic variants for human IgG subclasses. *Blood*, 2009. **113**(16): p. 3716-3725.
 69. Hughes-Jones, N.C., Functional affinity constants of the reaction between ¹²⁵I-labelled C1q and C1q binders and their use in the measurement of plasma C1q concentrations. *Immunology*, 1977. **32**(2): p. 191-8.
 70. Brekke, O.L., et al., The role of complement C3 opsonization, C5a receptor, and CD14 in E. coli-induced up-regulation of granulocyte and monocyte CD11b/CD18 (CR3), phagocytosis, and oxidative burst in human whole blood. *J Leukoc Biol*, 2007. **81**(6): p. 1404-13.
 71. Sehgal, G., et al., Lectin-like inhibition of immune complex receptor-mediated stimulation of neutrophils. Effects on cytosolic calcium release and superoxide production. *J Immunol*, 1993. **150**(10): p. 4571-80.
 72. Zhou, M.J. and E.J. Brown, CR3 (Mac-1, alpha M beta 2, CD11b/CD18) and Fc gamma RIII cooperate in generation of a neutrophil respiratory burst: requirement for Fc gamma RIII and tyrosine phosphorylation. *J Cell Biol*, 1994. **125**(6): p. 1407-16.
 73. Zhou, M. and E.J. Brown, Leukocyte response integrin and integrin-associated protein act as a signal transduction unit in generation of a phagocyte respiratory burst. *J Exp Med*, 1993. **178**(4): p. 1165-74.
 74. Ehlenberger, A.G. and V. Nussenzweig, The role of membrane receptors for C3b and C3d in phagocytosis. *J Exp Med*, 1977. **145**(2): p. 357-71.
 75. Price, P.J., et al., Complement Component C5 Recruits Neutrophils in the Absence of C3 during Respiratory Infection with Modified Vaccinia Virus Ankara. *J Immunol*, 2015. **194**(3): p. 1164-8.
 76. Hunniger, K., et al., A second stimulus required for enhanced antifungal activity of human neutrophils in blood is provided by anaphylatoxin c5a. *J Immunol*, 2015. **194**(3): p. 1199-210.
 77. Gunn, L., et al., Opposing roles for complement component C5a in tumor progression and the tumor microenvironment. *J Immunol*, 2012. **189**(6): p. 2985-94.
 78. Markiewski, M.M., et al., Modulation of the antitumor immune response by complement. *Nat Immunol*, 2008. **9**(11): p. 1225-35.
 79. Montresor, A., et al., Chemokines and the signaling modules regulating integrin affinity. *Front Immunol*, 2012. **3**: p. 127-136.
 80. Mocsai, A., et al., Integrin signaling in neutrophils and macrophages uses adaptors containing immunoreceptor tyrosine-based activation motifs. *Nat Immunol*, 2006. **7**(12): p. 1326-33.

81. Tohyama, Y. and H. Yamamura, Protein tyrosine kinase, syk: a key player in phagocytic cells. *J Biochem*, 2009. **145**(3): p. 267-73.
82. Shushakova, N., et al., C5a anaphylatoxin is a major regulator of activating versus inhibitory FcγR in immune complex-induced lung disease. *J Clin Invest*, 2002. **110**(12): p. 1823-30.
83. Godau, J., et al., C5a initiates the inflammatory cascade in immune complex peritonitis. *J Immunol*, 2004. **173**(5): p. 3437-45.
84. Kumar, V., et al., Cell-derived anaphylatoxins as key mediators of antibody-dependent type II autoimmunity in mice. *J Clin Invest*, 2006. **116**(2): p. 512-20.
85. Hong, F., et al., Beta-glucan functions as an adjuvant for monoclonal antibody immunotherapy by recruiting tumoricidal granulocytes as killer cells. *Cancer Res*, 2003. **63**(24): p. 9023-31.
86. Allendorf, D.J., et al., C5a-mediated leukotriene B₄-amplified neutrophil chemotaxis is essential in tumor immunotherapy facilitated by anti-tumor monoclonal antibody and beta-glucan. *J Immunol*, 2005. **174**(11): p. 7050-6.
87. Li, B., et al., Combined yeast β-glucan and antitumor monoclonal antibody therapy requires C5a-mediated neutrophil chemotaxis via regulation of decay-accelerating factor CD55. *Cancer Res*, 2007. **67**(15): p. 7421-30.
88. Zhu, E.F., et al., Synergistic innate and adaptive immune response to combination immunotherapy with anti-tumor antigen antibodies and extended serum half-life IL-2. *Cancer Cell*, 2015. **27**(4): p. 489-501.

Anhang

A.1 Verwendete Chemikalien und Reagenzien

Bezeichnung	Hersteller
Ampicillin	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
β -Mercapto-Ethanol	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Bovine Serum Albumin Fraktion V	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Chromium51	Hartmann Analytik, Braunschweig
Destilliertes Wasser	Invitrogen, Carlsbad, CA, USA
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Destilliertes Wasser	Invitrogen, Carlsbad, CA, USA
Ficoll-Plaque PLUS	GE Healthcare, Chalfont St Giles, GB
Fötales Kälberserum (FCS)	Invitrogen, Carlsbad, CA, USA
Glucose	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Glycin	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Hanks	PAA Laboratories, Pasching, Österreich
Heparin-Natrium (25.000 I.E./5 ml)	Ratiopharm GmbH, Ulm
Optiphas Supermix	PerkinElmer, Waltham, MA, USA
Penicillin/Streptomycin (Pen/Strep)	PAA Laboratories, Pasching, Österreich
Percoll Trennlösung (1,124 g/ml)	Biochrome AG, Berlin
RPMI-1640 (+L-Glutamin +Phenolrot)	Invitrogen, Carlsbad, CA, USA
Smart Ladder	Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, CA, USA
TritonX-100	Merck Chemicals, Darmstadt
Trypanblau	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Trypsin-EDTA	Invitrogen, Carlsbad, CA, USA
1xPBS / 10xPBS	PAA Laboratories, Pasching, Österreich

A.2 Verbrauchsmaterialien

Bezeichnung	Hersteller
Butterfly-Kanülen Micro-Flo	Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ
Cellstar® Gewebekulturflaschen mit Filter 25 cm ² steril	Greiner bio-one, Frickenhausen
Cellstar® Gewebekulturflaschen mit Filter 75 cm ² steril	Greiner bio-one, Frickenhausen
Cellstar® PP-Röhrchen mit Deckel, 15 ml, steril	Greiner bio-one, Frickenhausen
Cellstar® PP-Röhrchen mit Deckel, 50 ml steril	Greiner bio-one, Frickenhausen
Citrat-Röhrchen	Sarstedt, Newton, NC, USA
Cryo.s™ Einfrierröhrchen 2 ml	Greiner bio-one, Frickenhausen

Anhang

Multiple Well Plate, 96-Loch Platten steril	Sarstedt, Newton, NC, USA
PP-Röhrchen, 5 ml	Sarstedt, Newton, NC, USA
Sample Plate 96-Well	Wallac, Turku, Finnland
Serologische Pipetten 2, 5, 10 und 25 ml, steril	Sarstedt, Newton, NC, USA
S-Monovetten 9 ml, Z	Sarstedt, Newton, NC, USA
TopSeal-A	PerkinElmer, Waltham, MA, USA

A.3 Technische Gerätschaften

Bezeichnung	Hersteller
AF 200 Eismaschine	Scotsman Ice Systems; Vernon Hills, IL, USA
Brutschrank Heraeus® HERAccl® 240	Thermo Fischer Scientific, Waltham, MA, USA
Durchflusszytometer Coulter Epics XL-MCL	Beckman Coulter, Fullerton, CA, USA
ELISA Reader Sunrise™	Tecan Group Ltd., Männedorf, Schweiz
Experion automated electrophoresis system	Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA
Gamma Counter Wallac 1470 wizard	Perkin Elmer, Waltham, MA, USA
Heraeus® Reinluftwerkbank Typ HS15	Therom Fischer Scientific, Waltham, MA, USA
Lichtmikroskop Axiovert 40 CFL	Carl Zeiss, Jena
Mini-Membran-Vakuumpumpe VP 86	VWR International, Darmstadt
Neubauer Zählkammer 0,1 mm	Paul Marienfeld GmbH & Co. KG, Königshofen
PowerPac HC Power Supply	Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA
Wasserbad	GFL, Burgwedel
X Cell Sure Lock™ Mini-Cell	Invitrogen, Carlsbad, CA, USA
Zentrifuge Heraeus® Multifuge 3S+	Thermo Fischer Scientific, Waltham, MA, USA
Heraeus Megafuge 1.0R	Thermo Fischer Scientific, Waltham, MA, USA
1450 MicroBeta TriLux. LSC & Luminescence Counter	Perkin Elmer, Waltham, MA, USA

Danksagung

Meinem Doktorvater, Herrn Prof. Dr. med. Thomas Valerius, danke ich dafür, mir die Möglichkeit zur Erstellung dieser Arbeit gegeben zu haben. Für die Mühen und die Zeit, die in meine Promotion geflossen sind, bin ich Ihnen aufrichtig dankbar. Durch die Arbeit in Ihrer Forschungsgruppe habe ich viel gelernt und tiefe Einblicke in das universitäre wissenschaftliche Arbeiten erhalten.

Bei Dr. rer. nat. Stefanie Derer möchte ich mich für die außerordentlich gute Betreuung im Rahmen der Doktorarbeit und für das von ihr in mich gesetzte Vertrauen bedanken. Vielen Dank auch für die Anregungen, den regen wissenschaftlichen Austausch sowie die Arbeit an der Publikation. Es war mir stets eine große Freude mit Dir zusammen zu arbeiten.

Ein großer Dank gehört auch Dr. rer. nat. Thies Rösner, dessen Begeisterungsfähigkeit, Hilfsbereitschaft und Offenherzigkeit mich überzeugt haben, diese Arbeit aufzunehmen. Die Selbstlosigkeit, die Du während der Laborarbeit gezeigt hast, hat mich beeindruckt.

Ferner gilt mein Dank dem gesamten Team des Labors im Dr. Mildred-Schell Haus für die Hilfsbereitschaft und freundliche Atmosphäre. Besonders möchte ich hier Christyn Wildgrube und Yasmin Brodtmann erwähnen, deren technische Assistenz ich immer sehr geschätzt habe.

Abschließend sei meiner Familie und meinen Freunden gedankt für die große Unterstützung, die mir zuteilwurde.

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name Michael Leonard Kenyon Cossham
Geburtsdatum/-ort 25.07.1983 Eckernförde

Ausbildung/Studium

seit	09/2012	Promotion an der CAU, Kiel Titel: „Optimierung der Komplementaktivierung eines EGFR-Antikörpers führt zu verstärkter Aktivierung von Granulozyten mittels Anaphylatoxin C5a“ Dr.-Vater: Prof. Dr. med. T. Valerius
04/2011	06/2015	Christian-Albrechts Universität, Kiel Studium der Humanmedizin Abschluss: 3. ärztliche Prüfung
08/2008	08/2010	Georg-August-Universität Göttingen Studium der Humanmedizin Abschluss: 1. Ärztliche Prüfung
08/2006	06/2008	Sheffield College, England Abschluss: fachgebundene Hochschulqualifikation
09/2003	09/2004	Zivildienst Camphill Community Dushane, Ireland
08/1990	06/2003	Freie Waldorfschule, Kiel Abschluss: Abitur

Praktisches Jahr

12/2014	04/2015	3.Tertial, Städtisches Krankenhaus Kiel Abteilungen für Unfall- und Viszeralchirurgie
09/2014	12/2014	2.Tertial, Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Kiel Abteilungen für Radiologie und Strahlentherapie
07/2014	09/2014	1.Tertial, Städtisches Krankenhaus Kiel Abteilung für Innere Medizin
05/2014	07/2014	Weston Park Hospital, Sheffield, UK Abteilung für Onkologie

Sonstige berufliche Tätigkeiten

seit	09/2013	Kleingewerbe Gastronomie/Promotion
03/2012	10/2013	Mobiler Pflegeservice Kiel Pflegehilfskraft
08/2007	08/2008	The Sheaf View, Sheffield, UK Bartender
07/2006	07/2007	Morrison Supermarkets, Sheffield, UK Sales Assistant
03/2005	04/2006	Dr. med. K. Jessen und PD. Dr. med. H. Grimm medizinische Hilfskraft

Publikation

Stefanie Derer, Michael Cossham, Thies Rösner, Christian Kellner, Frank J. Beurskens, Ralf Schwanbeck, Stefan Lohse, Christian Sina, Matthias Peipp und Thomas Valerius

A Complement-Optimized EGFR Antibody Improves Cytotoxic Functions of Polymorphonuclear Cells against Tumor Cells.

The Journal of Immunology November 15, 2015 vol. 195 no. 10 5077-5087