

**Generierung, präklinische Charakterisierung und  
Optimierung monoklonaler Antikörper zur  
anti-angiogenetischen Therapie solider Tumoren**

DISSERTATION

der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät  
der EBERHARD KARLS UNIVERSITÄT TÜBINGEN  
zur Erlangung des Grades eines  
Doktors der Naturwissenschaften  
(Dr. rer. nat.)

vorgelegt von

**Dipl.-Biol. Karolin Schwartz**

aus Babelsberg

Tübingen  
2013



Tag der mündlichen Qualifikation:

Dekan:

1. Berichterstatter:

2. Berichterstatter:

16.07.2013

Prof. Dr. Wolfgang Rosenstiel

Prof. Dr. Hans-Georg Rammensee

Prof. Dr. Gundram Jung



*Meiner Familie.*





Autor: unbekannt, Quelle: Internet



## Zusammenfassung

Im Kampf gegen Krebs gehört der anti-vaskuläre Therapieansatz zu den Erfolg versprechendsten. Die Inhibierung der Neoangiogenese soll dabei durch Unterversorgung des Tumors zur Wachstumsblockade führen. Im Gegensatz zur Hemmung löslicher Angiogenesefaktoren, wie etwa VEGF, wird in der vorliegenden Arbeit ein direkt gegen das Tumorendothel gerichteter, Antikörper-basierter Ansatz verfolgt. Neben der gezielten Lyse des Tumorendothels soll durch Öffnung der Tumorgefäße die Einwanderung körpereigener Immunzellen begünstigt werden und somit zusätzlich, durch Induktion einer spezifischen Immunantwort, ein direkter Effekt gegen die malignen Zellen erzielt werden.

Ziel dieser Arbeit war demnach die Entwicklung eines Antikörpers mit verbesserter Spezifität für das Tumorgefäßsystem und optimierter immunologischer Effektorfunktion. Grundlage für eine solche anti-endotheliale Therapie ist die Annahme, dass die unkontrollierte, Tumor-induzierte Neoangiogenese zu einer aberranten Proteinexpression auf den Endothelzellen des Tumors führt. Das Membranprotein Endoglin stellt für einen solchen Therapieansatz, aufgrund einer starken, sowie relativ spezifischen Überexpression auf aktivierten proliferierenden Endothelzellen, ein Erfolg versprechendes Zielantigen dar. Es wurden deshalb zunächst 21 neue  $\alpha$ Endoglin-Antikörper mittels Hybridomtechnik generiert. Die anschließende Charakterisierung umfasste wesentlich die Spezifität für das aktivierte Endothel des malignen Gewebes, aber auch weitere den Therapieerfolg potentiell beeinflussende Parameter. Auf dieser Grundlage erfolgte die Auswahl von vier besonders Erfolg versprechenden Antikörpern, welche sowohl chimärisiert, als auch mit einer gentechnischen Modifikation des Fc-Teils zur verbesserten Rekrutierung der Effektorzellen versehen wurden. In allen vergleichenden Untersuchungen wurde der bereits in klinischen Studien eingesetzte chimäre  $\alpha$ Endoglin-Antikörper TRC105 (Tracon Pharmaceuticals) mitgeführt.

Von allen im Rahmen dieser Arbeit generierten Antikörpern, war der  $\alpha$ Endoglin-Antikörper  $\chi$ K-ro8SDIEM aufgrund einer besonders guten Spezifität für das Tumorendothel und einer verbesserten ADCC-Aktivität am vielversprechendsten.

Mittels immunhistologischer Färbungen wurde weiterhin gezeigt, dass Endoglin, vor allem auf Pankreaskarzinomen, neben dem Tumorendothel auch auf dem Tumorstroma exprimiert wird. Bei solchen Tumoren erscheint deshalb der Einsatz des neuen  $\alpha$ Endoglin-Antikörpers besonders interessant. Die Anwendung des  $\chi$ K-ro8SDIEM in individuellen Heilversuchen und klinischen Studien zur Behandlung von Patienten mit soliden Tumoren ist in Planung.

Neben der Generierung von  $\alpha$ Endoglin-Antikörpern konnte in dieser Arbeit ein weiteres, interessantes vaskuläres Zielantigen identifiziert werden. Der bereits beschriebene  $\alpha$ FZD9-Antikörper W3C4E11 zeigte in immunhistologischen Untersuchungen verschiedener Tumortypen, sowie entsprechender Normalgewebe, ein deutlich Tumorendothel-spezifisches Färbemuster. Allerdings konnte durch den Vergleich mit dem neuen  $\alpha$ FZD9-Antikörper K-zd1, welcher in dieser Arbeit mittels Hybridomtechnik generiert wurde, das beschriebene Antigen nicht bestätigt werden. Aufgrund dieser initialen Ergebnisse wurde der Mausantikörper W3C4E11 mit unklarer

Spezifität in ein sowohl chimäres, als auch SDIEM-optimiertes Ig $\gamma$ 1-Format kloniert. Damit wurde ein weiterer Kandidat zur anti-vaskulären Tumorthherapie identifiziert, der jedoch noch der näheren Charakterisierung bedarf.

## Abstract

In the fight against cancer therapeutic strategies directed against the tumour vasculature appear particularly promising. The inhibition of neoangiogenesis results in suppression of tumor growth. In contrast to the blockade of soluble angiogenic factors, such as VEGF, the approach pursued in this work aims at the destruction of tumor endothelial cells using optimized, recombinant antibodies. In addition to the suppression of tumor angiogenesis the damaged endothelial barrier may facilitate the influx of immune cells thereby supporting immune reactions against the tumor. Thus, it was the major aim of this work to develop antibodies with increased specificity for tumor endothelial cells and optimized immunological effector functions. Endoglin, a membrane protein preferentially expressed on activated endothelial cells, was used as a major target for this approach. 21 new anti-endoglin antibodies were generated using hybridoma technology. Characterization of these antibodies focused mainly on the specificity for tumor endothelium but also on other parameters relevant for clinical application. Based on these data four antibodies were chosen for optimization by recombinant antibody technology, that is chimerization and optimization of Fc parts. The comparative analysis of these optimized antibodies included the anti-endoglin antibody TRC105 (TRACON Pharmaceuticals), which is currently used in clinical trials, as a benchmark. The experiments outlined above resulted in the identification of  $\chi$ K-ro8SDIEM as an anti-endoglin antibody with improved specificity for tumor endothelial cells and superior ADCC activity. In addition to antibody development it was demonstrated that on pancreatic tumors endoglin is expressed not only on tumor vasculature but also on tumor stroma. Thus, it appears promising to use  $\chi$ K-ro8SDIEM for the treatment of patients with pancreatic carcinoma, a tumor with a particularly bad prognosis.

In addition to the generation of anti-endoglin antibodies, in this work another interesting vascular target antigen was identified. Immunohistochemical experiments using the antibody W3C4E11, which was already described as specific for FZD9, showed a vascular and tumor-specific staining pattern on different tumor types and some corresponding normal tissues. However, the comparison with a new anti-FZD9 antibody K-zd1, which was generated in this work, could not confirm FZD9 as target antigen for anti-angiogenic tumor therapy. Based on these initial results W3C4E11 with now unclear specificity was cloned and expressed as a chimeric Ig $\gamma$ 1 and a SDIEM-chimeric format. Thus, an alternative candidate for anti-vascular tumor therapy was defined, which awaits further characterization.



# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung</b>	<b>1</b>
1.1	Entstehung von Krebs . . . . .	2
1.2	Tumorimmunologie: Interaktion zwischen Immun- und Tumorzellen . . . . .	4
1.3	Therapiemöglichkeiten bei Krebs . . . . .	4
1.4	Die Antikörpertherapie . . . . .	5
1.5	Angiogenese . . . . .	15
1.6	Endoglin . . . . .	21
1.7	Ziel der Arbeit . . . . .	28
<b>2</b>	<b>Material und Methoden</b>	<b>29</b>
2.1	Material . . . . .	31
2.2	Zellbiologische Methoden . . . . .	48
2.3	Generierung monoklonaler Antikörper . . . . .	50
2.4	Molekularbiologische Methoden . . . . .	52
2.5	Analytische Methoden . . . . .	59
<b>3</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>67</b>
3.1	Endoglin als vaskuläres Zielantigen . . . . .	69
3.2	Identifizierung neuer vaskulärer Zielantigene . . . . .	114
<b>4</b>	<b>Diskussion</b>	<b>121</b>
4.1	Endoglin als vaskuläres Zielantigen . . . . .	122
4.2	W3C4E11 als anti-vaskulärer Antikörper . . . . .	135
<b>5</b>	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>136</b>
<b>6</b>	<b>Appendix</b>	<b>148</b>
6.1	Abkürzungsverzeichnis . . . . .	148
6.2	Danksagung . . . . .	151
6.3	Curriculum Vitae . . . . .	152

# Abbildungsverzeichnis

1.1	Kennzeichen von Krebs . . . . .	3
1.2	Antikörperstruktur . . . . .	7
1.3	Effektorfunktionen eines Antikörpers . . . . .	9
1.4	Klassifizierung und Nomenklatur therapeutischer Antikörper . . . . .	11
1.5	Ablauf der Tumor-induzierten Angiogenese . . . . .	16
1.6	Aufbau von Endoglin . . . . .	21
1.7	Struktur von Endoglin . . . . .	22
1.8	Funktion von Endoglin . . . . .	25
3.1	Vaskuläres Färbemuster von Endoglin . . . . .	69
3.2	Immunhistologischer Vergleich zweier $\alpha$ Endoglin-Antikörper auf Skelettmuskel . . . . .	72
3.3	Durchflusszytometrische Analyse unterschiedlicher $\alpha$ Endoglin-Antikörper auf NALM-16 . . . . .	73
3.4	Endoglin-Expression der generierten Sp2/0-Ag14 Transfektante . . . . .	74
3.5	Durchflusszytometrische Analyse der generierten $\alpha$ Endoglin-Antikörper aus Fusion Nr. 17 und Nr. 18 . . . . .	76
3.6	Kreuzreaktivität der $\alpha$ Endoglin-Antikörper mit Maus-Endoglin . . . . .	78
3.7	Titration der zwölf aufgereinigten mK-ro-Antikörper auf ENG <sup>+</sup> NALM-16 Zelllinie . . . . .	79
3.8	Keine Verdrängung des Liganden TGF- $\beta$ 1 durch Antikörper . . . . .	80
3.9	Bindung der Antikörper mK-ro und SN6 an lösliches Endoglin . . . . .	81
3.10	Analyse der Endoglinexpression nach Bindung der aufgereinigten Antikörper . . . . .	82
3.11	<i>Gating</i> -Strategie der primären Nierenzellen . . . . .	85
3.12	Bindung der $\alpha$ Endoglin-Antikörper auf CD45 <sup>-</sup> CD31 <sup>+</sup> CD34 <sup>high</sup> Endothelzellen der Niere . . . . .	86
3.13	Bindung der $\alpha$ Endoglin-Antikörper auf CD45 <sup>-</sup> CD31 <sup>+</sup> CD34 <sup>high</sup> Endothelzellen der Niere . . . . .	87
3.14	<i>Gating</i> -Strategie der primären Knochenmarkzellen . . . . .	88
3.15	Bindung der $\alpha$ Endoglin-Antikörper auf humanen CD34 <sup>+</sup> CD45dim-Vorläuferzellen des Knochenmarks . . . . .	89
3.16	Verdrängung der vier $\alpha$ Endoglin-Antikörper untereinander . . . . .	91
3.17	Agarosegel mit PCR-Amplikons, welche mittels degenerierter Primerpools (PP) generiert wurden . . . . .	92
3.18	Analyse aller chimärisierten Antikörper mittels SDS-PAGE . . . . .	95

3.19	Bestimmung der Homogenität des Referenzantikörperklons SN6j mittels Gelfiltration . . . . .	96
3.20	Bestimmung des Reinheitsgrades der Antikörperklone K-ro8 und K-ro10 mittels Gelfiltration . . . . .	97
3.21	Bestimmung des Reinheitsgrades der Antikörperklone K-ro22 und K-ro23 mittels Gelfiltration . . . . .	98
3.22	Titration der chimärisierten Antikörper auf ENG <sup>+</sup> NALM-16 Zelllinie	99
3.23	Verdrängungsexperiment zwischen $\chi$ SN6j-PE und den generierten $\alpha$ Endoglin-Antikörpern . . . . .	100
3.24	Bindung der $\alpha$ Endoglin-Antikörper auf CD45 <sup>-</sup> CD31 <sup>+</sup> CD34 <sup>high</sup> -Endothelzellen der Niere . . . . .	104
3.25	Bindung der $\alpha$ Endoglin-Antikörper auf CD45 <sup>-</sup> CD31 <sup>+</sup> CD34 <sup>high</sup> -Endothelzellen der Niere . . . . .	105
3.26	Bindung der $\alpha$ Endoglin-Antikörper auf CD45 <sup>-</sup> CD31 <sup>+</sup> CD34 <sup>high</sup> -Endothelzellen der Niere . . . . .	106
3.27	Komplement-abhängige Zytotoxizität der $\alpha$ Endoglin-Antikörper . . .	107
3.28	ADCC-Aktivität der $\alpha$ Endoglin-Antikörper auf NALM-16 . . . . .	109
3.29	ADCC-Aktivität der $\alpha$ Endoglin-Antikörper auf NALM-16 . . . . .	110
3.30	ADCC-Aktivität der $\alpha$ Endoglin-Antikörper auf HUVEC . . . . .	111
3.31	Endoglin-Expression auf malignem Pankreasgewebe . . . . .	113
3.32	W3C4E11-Bindung auf transfizierter Zelllinie . . . . .	115
3.33	Immunhistologischer Vergleich von W3C4E11 und K-zd1 . . . . .	116
3.34	FACS-Analyse der beiden Antikörperklone mK-zd1 und W3C4E11 auf verschiedenen Zelllinien . . . . .	119

# Tabellenverzeichnis

1.1	Zugelassene anti-Tumor-Antikörper . . . . .	14
1.2	Zugelassene Therapeutika mit anti-angiogenetischer Wirkung . . . . .	20
2.16	Eichproteine der analytischen Gelfiltration . . . . .	63
3.1	Immunhistologische Färbung der $\alpha$ Endoglin-Antikörperklone SN6 und Endo-2 auf einem <i>human frozen tissue array</i> . . . . .	71
3.2	Übersicht der generierten $\alpha$ Endoglin-Antikörperklone mK-ro bezüglich Isotyp und Nomenklatur . . . . .	75
3.3	Selektion der $\alpha$ Endoglin-Antikörper zur Chimärisierung . . . . .	90
3.4	Immunhistologische Färbung der optimierten $\alpha$ Endoglin-Antikörper- klone auf einem <i>human frozen tissue array</i> . . . . .	102
3.5	Immunhistologische Färbung des Antikörperklons W3C4E11 auf ei- nem <i>human frozen tissue array</i> . . . . .	114

# Kapitel 1

## Einleitung

### Inhaltsangabe

---

<b>1.1</b>	<b>Entstehung von Krebs</b> . . . . .	<b>2</b>
<b>1.2</b>	<b>Tumorimmunologie: Interaktion zwischen Immun- und Tumorzellen</b> . . . . .	<b>4</b>
<b>1.3</b>	<b>Therapiemöglichkeiten bei Krebs</b> . . . . .	<b>4</b>
<b>1.4</b>	<b>Die Antikörpertherapie</b> . . . . .	<b>5</b>
1.4.1	Die Antikörperstruktur . . . . .	6
1.4.2	Effektorfunktionen eines therapeutischen Antikörpers des Ig $\gamma$ -Isotyps . . . . .	7
1.4.3	Etablierung therapeutischer Antikörper . . . . .	10
1.4.3.1	Antikörper der ersten Generation . . . . .	10
1.4.3.2	Antikörper der zweiten Generation . . . . .	10
1.4.3.3	Antikörper der dritten Generation . . . . .	11
<b>1.5</b>	<b>Angiogenese</b> . . . . .	<b>15</b>
1.5.1	Tumor-induzierte Angiogenese . . . . .	15
1.5.2	Anti-vaskuläre Tumorthherapie . . . . .	16
<b>1.6</b>	<b>Endoglin</b> . . . . .	<b>21</b>
1.6.1	Struktur des Membranproteins Endoglin . . . . .	21
1.6.2	Expression von Endoglin . . . . .	23
1.6.3	Regulierung der Angiogenese durch Endoglin . . . . .	24
1.6.4	Hereditäre hämorrhagische Teleangiektasie Typ1 . . . . .	25
1.6.5	Endoglin-abhängige Krebsprognose . . . . .	26
1.6.6	$\alpha$ Endoglin-Antikörper im Tiermodell . . . . .	27
1.6.7	$\alpha$ Endoglin-Antikörper in klinischen Studien . . . . .	27
<b>1.7</b>	<b>Ziel der Arbeit</b> . . . . .	<b>28</b>

---

## 1.1 Entstehung von Krebs

Krebs entsteht durch eine einzelne, mutierte Körperzelle, welche aufgrund eines gestörten Zellzyklus immortalisiert ist und somit unkontrolliert proliferieren kann. Fast jede Zelle des Körpers kann auf diese Weise entarten und je nach Zelltyp zur Entstehung unterschiedlicher Krebsarten führen. Die erste, grobe Klassifizierung erfolgt dabei in maligne Zellen des hämatopoetischen Systems, welche zur Entstehung von Leukämien und Lymphomen führen, sowie in die Ausbildung solider Tumoren. Diese Gruppe wird weiterhin, je nach Herkunft des Gewebes, in z.B. Karzinome (aus Epithel) oder Sarkome (aus Stütz- und Bindegewebe) unterteilt. Als Auslöser für die maligne Entartung gelten neben genetischer Disposition vor allem äußere Einflüsse, wie z.B. ionisierende Strahlung, Onkoviren, Adipositas, sowie Tabak- und Alkoholkonsum. Der in Deutschland häufigste Krebs bei Frauen ist das Mammakarzinom, Männer erkranken am häufigsten an Prostatakrebs. An zweiter und dritter Stelle steht geschlechtsunabhängig das Kolorektalkarzinom, sowie der Lungenkrebs.

Krebs gehört zu den häufigsten Todesursachen weltweit. Die globale Sterblichkeitsrate lag nach der Weltgesundheitsorganisation im Jahre 2008 bei 7,6 Millionen Menschen, was etwa 13% aller Todesfälle entspricht. In Deutschland lag der Anteil aller Krebs bedingten Todesfälle im Jahr 2011 bei 26% (Statistisches Bundesamt), ein für die meisten Industrieländer typischer Wert.

Robert A. Weinberg und Douglas Hanahan definierten im Jahr 2000 „Die Kennzeichen von Krebs“ (*engl.: The Hallmarks of Cancer*), in dem sie grundlegende physiologische Veränderungen von Krebszellen erstmals in sechs Eigenschaften zusammenfassten, welche im Folgenden aufgelistet sind [Hanahan und Weinberg, 2000]. Elf Jahre später ergänzten die beiden Forscher diese sechs Fähigkeiten durch zwei weitere Kennzeichen von Krebs (7 und 8), sowie zwei wichtige Voraussetzungen (9 und 10) für den Ablauf der komplexen Krebsentwicklung [Hanahan und Weinberg, 2011]:

1. *Autarkie der Wachstumssignale* Aktivierung von Onkogenen führt zur eigenständigen, pathologischen Mitose
2. *Unempfindlichkeit gegenüber wachstumshemmenden Signalen* Inaktivierung von Tumorsuppressorgenen, welche im Normalfall das Wachstum blockieren
3. *Umgehung der Apoptose* Aktivierung verschiedener anti-apoptotischer Faktoren bzw. Inaktivierung pro-apoptotischer Signale, führt zur Unterdrückung des programmierten Zelltodes
4. *Uneingeschränktes Fortpflanzungspotential durch Unterdrückung der Seneszenz* Aktivierung verschiedener Signalwege, z.B. durch Überexpression der Telomerase, führt zur immortalisierten Krebszelle
5. *Infiltratives Wachstum und Metastasierung* Ausbreitung der Krebserkrankung im gesamten Körper

6. *Induktion von Angiogenese* Sicherstellung der Tumorversorgung, wie Nähr- und Sauerstoff, sowie Abfallentsorgung z.B. mittels Überexpression des Wachstumsfaktors VEGF
7. *Störung zellulärer Energetik* Der gesteigerte Energiebedarf, u.a. bedingt durch die hohe Teilungsaktivität, kann z.B. durch Überexpression der Glukose-Transporter bewerkstelligt werden
8. *Immunevasion* Selektion und Etablierung entarteter Zellen mit verminderter Immunogenität
9. *Genomische Instabilität und Mutation* Inhibierung von Tumorsuppressorgenen, welche an dem komplexen Prozess der DNA-Reperaturmechanismen beteiligt sind
10. *Tumor-fördernde Entzündung* Auftretende Entzündung durch infiltrierte Immunzellen begünstigen das Tumorwachstum (v.a. durch anti-apoptotische und die Proliferation fördernde Signale)

In Abbildung 1.1 sind diese zehn Kernpunkte von Krebs übersichtlich dargestellt.

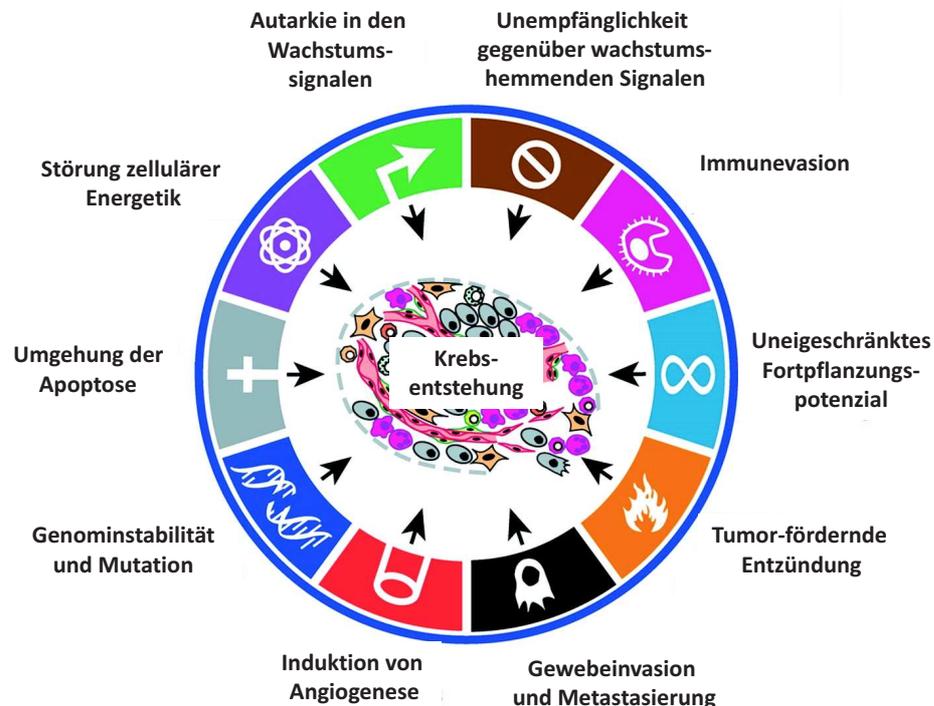


Abbildung 1.1: **Kennzeichen von Krebs:** Schematische Darstellung der durch Robert A. Weinberg und Douglas Hanahan definierten Hauptvoraussetzungen und Kennzeichen der Krebsentwicklung und -etablierung; modifiziert nach [Hanahan und Weinberg, 2011].

## 1.2 Tumorimmunologie: Interaktion zwischen Immun- und Tumorzellen

Paul Ehrlich postulierte erstmals im Jahr 1909, dass es zu den Aufgaben des körpereigenen Immunsystems gehört, neben Pathogenen ebenfalls entartete maligne Körperzellen zu erkennen und zu zerstören [Ehrlich, 1909]. Knapp 50 Jahre später stellten Sir Frank Macfarlane Burnet und Lewis Thomas die Hypothese der Immunüberwachung auf (*engl. immunosurveillance*) [BURNET, 1957]. Diese Theorie wurde später ergänzt und ist heute unter dem Begriff des *Immunoediting* bekannt. Dabei wird neben der schützenden Abwehrfunktion des Immunsystems, die gesamte Interaktion zwischen Tumor- und Immunzellen, sowie der daraus resultierende Selektionsdruck auf die Krebszellen und deren Anpassung mit einbezogen. Die Abwehr entarteter Zellen durch das Immunsystem schützt einerseits den Organismus, führt andererseits jedoch zur Selektion der „am besten getarnten“ Tumorzellen (entspricht dem 8. Kennzeichen von Krebs). Diesem Zusammenspiel aus Tumor- und Immunzellen liegen die erhöhte Genominstabilität, sowie die verstärkten Mutationsrate von Tumorzellen zugrunde. Das *Immunoediting* wird in drei Phasen (auch als „die drei E’s“ bekannt) unterteilt:

1. *elimination* bzw. die Eliminierung entarteter Zellen.
2. *equilibrium* bzw. das Gleichgewicht zwischen Eliminierung und Proliferation der Krebszellen. Diese Phase beschreibt den mehrstufigen Prozess der Selektion und Etablierung immun-resistenter Varianten.
3. *escape* bzw. dem Entkommen des Immunsystems. Diese Phase beschreibt die durch Umgehung der körpereigenen Abwehrmechanismen ungehinderte Proliferation der Tumorzellen und somit dem Ausbruch einer Krebserkrankung.

Diese Erkenntnisse verdeutlichen die zentrale Rolle des Immunsystems während der Entstehung und Etablierung von Krebs (näheres in den beiden Übersichtsartikeln [Dunn et al., 2002; Schreiber et al., 2011]).

## 1.3 Therapiemöglichkeiten bei Krebs

**Die drei klassischen Säulen: „Stahl/Strahl/Chemo“** Dem mehrstufigen Entwicklungsprozess von Tumoren standen lange Zeit die drei klassischen Säulen der Krebsbehandlung gegenüber: Resektion, Strahlen- und Chemotherapie, wobei die Behandlungsart je nach Klassifizierung und Lokalisation variiert. Aufgrund der relativ unspezifischen Wirkweise der Strahlen- bzw. Chemotherapie, können jedoch teilweise heftige Nebenwirkungen auftreten. In den letzten Jahren hat sich eine neue, aufgrund einer deutlich selektiveren Wirkung sehr vielversprechende, vierte Säule der Krebsbehandlung etabliert: die Immuntherapie.

**Die vierte Säule: die Immuntherapie** Die Krebs-Immuntherapie ist definiert als Modulation der körpereigenen Immunabwehr. Dabei kann das Immunsystem

einerseits selektiv stimuliert bzw. aktiviert werden (aktive Immunisierung), andererseits können künstlich hergestellte Proteine mit den körpereigenen Immunzellen interagieren (passive Immunisierung). Der große Vorteil gegenüber den drei klassischen Behandlungsmethoden liegt dabei in dem selektiveren Angriff auf die Tumorzellen, wodurch diese Therapiemöglichkeit sowohl hohe Erfolgschancen, als auch geringere Nebenwirkungen verspricht. Grundvoraussetzung für den Erfolg dieses Therapieansatzes ist allerdings die Auswahl eines geeigneten Zielantigens, das möglichst nur von malignen Zellen exprimiert wird. Solche Antigene werden je nach Expression in Tumor-spezifisch und Tumor-assoziiert unterteilt. Tumor-spezifisch ist z.B. ein ein durch Mutation entstandenes Protein, welches ausschließlich von Krebszellen exprimiert wird. Tumor-assoziierte Antigene werden hingegen von Tumorzellen, im Vergleich zu normalen Zellen, verstärkt exprimiert und weisen damit nur eine relative Spezifität auf.

Zur aktiven Immunisierung werden heutzutage verschiedene Moleküle verwendet, welche alle ein gemeinsames Ziel verfolgen: die Applikation Tumor-assoziiertes bzw. Tumor-spezifischer Antigene soll über Antigenpräsentation auf MHC-Proteinen zur Aktivierung spezifischer T-Zellen und somit zur Induktion einer adaptiven Immunantwort gegen die Krebszellen führen. Um diese gewünschte Immunreaktion zu verstärken, erfolgt die Applikation in der Regel in Kombination mit verschiedenen Adjuvantien.

Ein spezieller Ansatz der aktiven Vakzinierung stellt die Applikation Antigenkodierender RNA oder DNA dar. Grundlage hierfür ist die Aufnahme der Nukleinsäure in die Zelle, die anschließende Proteinexpression und die Antigenpräsentation auf MHC-Proteinen.

Die Antigenpräsentation kann außerdem über die *ex vivo*-Beladung körpereigener Dendritischer Zellen mit den gewünschten Peptiden und anschließendem Reinfundieren erzielt werden.

Neben den genannten Molekülen, kann die direkte Gabe von synthetischen Peptiden (Klasse I oder Klasse II) der Tumor-assoziierten bzw. Tumor-spezifischen Antigene zum gewünschten Erfolg führen. Dabei erscheint die personalisierte Immuntherapie, also die Vakzinierung mit individuell zusammengestellten Peptiden, besonders Erfolg versprechend.

Die passive Immunisierung bzw. Vakzinierung besteht im Wesentlichen in der Applikation von Antikörpern. Diese innovative Behandlungsmöglichkeit von Krebs ist die bisher einzig etablierte Immuntherapie und umfasst bereits eine Reihe zugelassener therapeutischer Moleküle.

## 1.4 Die Antikörpertherapie

Der erste Nobelpreis für Medizin wurde 1901 an die beiden Bakteriologen Emil von Behring und Kitasato Shibasaburo verliehen. Beide Forscher wurden dabei für ihre Arbeiten an den Krankheitserregern von Diphtherie und Tetanus geehrt. Sie führten erstmals eine Serumtherapie sowohl am Tier, als auch am Menschen durch und konnten damit das Prinzip der passiven Immunisierung durch vom Wirt generierte

„Antitoxine“ etablieren [EA. und S., 1890]. Der Nobelpreisträger des Jahres 1908, der deutsche Mediziner Paul Ehrlich, formulierte bereits damals die Idee, die durch ihn als „Antikörper“ bezeichneten Moleküle zur spezifischen Therapie maligner Tumoren einzusetzen [Ehrlich, 1900].

### 1.4.1 Die Antikörperstruktur

Bei der Etablierung der Immuntherapie mit Antikörpern bzw. Immunglobulinen (Ig) wurden zahlreiche, weitere Nobelpreise an Forscher vergeben, die sich mit der Struktur (Edelman und Porter, 1972), sowie der Funktion und Anwendung von Immunglobulinen beschäftigten. Antikörper erfüllen diverse Aufgaben im Immunsystem und sind in der Lage eine Vielzahl von Pathogenen über unterschiedliche direkte oder indirekte Wirkmechanismen aus dem Körper zu eliminieren.

Im Folgenden wird die Struktur eines Antikörpers am Beispiel eines Ig $\gamma$ 1-Moleküls erläutert (vgl. Abbildung 1.2). Dieser Antikörper-Isotyp besteht aus vier Polypeptidketten, welche über hydrophobe Wechselwirkungen verknüpft und über Disulfidbrücken stabilisiert sind. Dabei handelt es sich um zwei identische schwere Ketten (*engl. heavy chain*) mit je ca. 50 kDa, sowie um zwei identische leichte Ketten (*engl. light chain*) mit je ca. 25 kDa. Dies ergibt eine relative Molekülmasse von ca. 150 kDa.

Die einzelnen Antikörperketten sind aus mehreren Proteindomänen (je ca. 110 Aminosäuren) aufgebaut, welche in sich gefaltet und deutlich voneinander abgegrenzt sind. Die leichte Kette besteht aus zwei Proteindomänen, die schwere Kette hingegen aus vier dieser Domänen. Die aminoterminalen Domäne der leichten und schweren Kette entspricht den variablen Bereichen eines Antikörpers ( $V_H$  und  $V_L$ ), mit denen eine Bindung an eine Vielzahl von Antigenen möglich ist. Die carboxyterminale Domäne der leichten Kette, sowie die drei Domänen der schweren Kette werden als konstante Region bezeichnet ( $C_L$  und  $C_H1$ ,  $C_H2$ , usw.). Zwischen den beiden konstanten Domänen  $C_H1$  und  $C_H2$  der schweren Ketten gewährleistet eine Gelenkregion (*engl. hinge*) die hohe Flexibilität des Antikörpers.

Jede der Proteindomänen besteht aus zwei antiparallelen  $\beta$ -Faltblättern, welche aufgrund der Verdrillung eine zylinderartige Form bilden (*engl. beta-barrel*) und über eine Disulfidbrücke stabilisiert sind. Diese besondere Struktur wird als Immunglobulinfaltung bezeichnet. Im Bereich der variablen Domänen wurden jeweils drei hypervariable Regionen identifiziert (CDR1, CDR2 und CDR3; *engl. complementarity determining regions*), welche von weniger variablen, konformationsbildenden Gerüstregionen (FR1, FR2, FR3 und FR4; *engl. framework regions*) flankiert sind. In der dreidimensionalen Anordnung, der Quartärstruktur, bilden die sechs hypervariablen Regionen der leichten und schweren Kette ( $V_L$  und  $V_H$ ) gemeinsam die Antigenbindungsstelle des Antikörpers aus, welche als Paratop bezeichnet wird.

Die Vielfältigkeit der Antikörperspezifität basiert auf der Kombination verschiedener Gensegmente (für die  $V_H$ -Domäne: V, D und J; für die  $V_L$ -Domäne: V und J), sowie auf der *de novo* Synthese der verknüpfenden Sequenzen. Des Weiteren erhöht die zufällige Zusammenlagerung der schweren und leichten Antikörperketten die enorme Sequenzvielfalt und somit Variabilität der Antigenspezifitäten auf

ca.  $5 \times 10^{13}$ . Diese theoretische Variabilität kann während der Affinitätsreifung aktiver B-Lymphozyten über Mutationen in den variablen Domänen weiter erhöht werden.

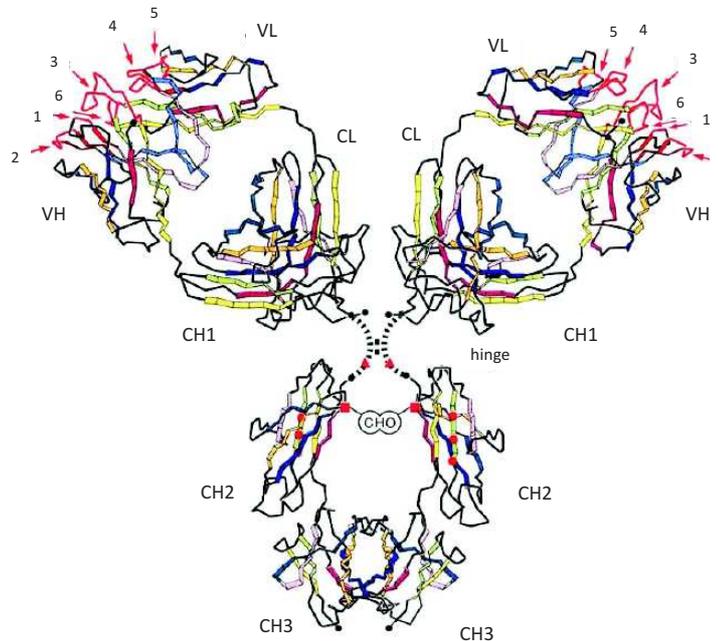


Abbildung 1.2: **Struktur eines Ig $\gamma$ -Antikörpers:** Das Molekül besteht aus zwei schweren und zwei leichten Ketten. Die schwere Kette (*engl. heavy chain, H*) setzt sich aus vier Domänen zusammen:  $V_H$ ,  $C_{H1}$ ,  $C_{H2}$  und  $C_{H3}$ . Die leichten Ketten (*engl. light chain, L*) bestehen jeweils aus zwei Proteinuntereinheiten:  $V_L$  und  $C_L$ . Die Zahlen 1 bis 6 weisen auf die hypervariablen Bereiche der Antigenbindungsstelle hin; modifiziert nach [Winter und Milstein, 1991].

Antikörper werden von differenzierten B-Lymphozyten, den Plasmazellen, produziert, wobei jeweils nur ein Antikörper mit spezieller Spezifität je Zelle generiert wird. Antikörper sind die sezernierte Form des B-Zell-Rezeptors. Beide unterscheiden sich am Carboxyterminus der schweren Ketten, wobei der B-Zell-Rezeptor vom Ig $\mu$ - bzw. Ig $\delta$ -Typ zur Verankerung in der Zellmembran eine hydrophobe Sequenz aufweist. Der sezernierte Antikörper enthält stattdessen eine hydrophile Sequenz. Der Ig $\mu$ -Antikörper liegt sezerniert als Pentamer vor und ist nach dem ersten Kontakt mit dem Pathogen bzw. der entarteten Tumorzelle für die Einleitung der humoralen Immunantwort verantwortlich. Antikörper werden aufgrund der schweren Ketten in fünf Klassen unterteilt, die sich in ihren physiologischen Funktionen unterscheiden. Neben dem sezernierten B-Zell-Rezeptor Ig $\mu$  sind die weiteren, im humanen Immunsystem vertretenen, Isotypen: Ig $\delta$ , Ig $\epsilon$ , Ig $\gamma$  und Ig $\alpha$ .

### 1.4.2 Effektorfunktionen eines therapeutischen Antikörpers des Ig $\gamma$ -Isotyps

Therapeutische Antikörper des Ig $\gamma$ -Isotyps können nach spezifischer Antigenbindung über direkte Wirkmechanismen (unabhängig vom Isotyp), sowie über indirekte, Fc $\gamma$ Rezeptor-vermittelte Effekte interagieren (vgl. Abbildung 1.3):

- direkt: NEUTRALISIERUNG: Bindung von Bakterientoxinen oder körpereigenen Wachstumsfaktoren, welche die jeweilige Interaktion mit den entsprechenden Rezeptoren verhindert
- direkt: IMMUNMODULATION/APOPTOSEINDUKTION: Bindung antagonistischer oder agonistischer Antikörper kann den Liganden blockieren (z.B. CD28) oder imitieren (z.B. CD95) und führt somit zur Inhibierung oder Stimulierung des Rezeptors. Bei diesen Effekten handelt es sich jedoch um keine physiologischen Funktionen, sondern ausschließlich um den gezielten Einsatz therapeutischer Antikörper.
- indirekt: ANTIKÖRPER-VERMITTELTE ZELLULÄRE PHAGOZYTOSE: Opsonierung verschiedener Mikroorganismen führt zur Phagozytose der markierten Pathogene durch Immunzellen, wie z.B. Makrophagen (ADCP, *engl. antibody dependent cellular phagocytosis*)
- indirekt: KOMPLEMENT-VERMITTELTE ZYTOTOXIZITÄT: Bindung des Komplementfaktors C1q an die C<sub>H</sub>2-Domäne eines Antikörpers führt zur Aktivierung der klassischen Komplementkaskade. Über Porenbildung (MAC, *engl. membrane attack complex*) wird somit die Zielzelle lysiert (CDC, *engl. complement dependent cytotoxicity*)
- indirekt: KOMPLEMENT-VERMITTELTE ZELLULÄRE ZYTOTOXIZITÄT: Bindung des während der Aktivierung der Komplementkaskade entstandenen Spaltproduktes C3b führt zur Phagozytose der Zielzelle durch Makrophagen oder zur Zelllyse durch Natürliche Killerzellen (CDCC, *engl. complement dependent cellular cytotoxicity*)
- indirekt: ANTIKÖRPER-VERMITTELTE ZELLULÄRE ZYTOTOXIZITÄT: Aktivierung von Fc $\gamma$ Rezeptor-positiven Immunzellen, v.a. Natürliche Killerzellen, welche mittels Degranulierung von Perforin und Granzymen zur Zielzellyse führen (ADCC, *engl. antibody dependent cellular cytotoxicity*)

Zur Vermittlung der indirekten Wirkmechanismen können Ig $\gamma$ -Antikörper über den Fc-Teil mit unterschiedlichen Fc $\gamma$ Rezeptoren (Fc $\gamma$ R) auf immunologischen Effektorzellen interagieren und diese multimerisieren. Je nach Expressionsprofil der Rezeptortypen auf den verschiedenen Immunzellen, sowie je nach Antikörperisotyp führt die Bindung zu differentieller intrazellulärer Signalweiterleitung. Diese erfolgt dabei über ITAM (*engl. immunoreceptor tyrosine-based activation motif*) oder im Falle eines inhibitorischen Rezeptors über ITIM (*engl. immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motif*). Es gibt drei Arten von Fc $\gamma$ R, welche die Fc-Teile der verschiedenen Ig $\gamma$ -Subklassen mit unterschiedlichen Affinitäten binden (hauptsächlich Ig $\gamma$ 1 und Ig $\gamma$ 3) [Nimmerjahn und Ravetch, 2008; Paul, 2003]:

- Fc $\gamma$ RI/CD64: Dieser einzig hoch-affine Rezeptor wird hauptsächlich auf Makrophagen und Neutrophilen exprimiert und kann somit über ADPC und CDCC zur Phagozytose der Zielzelle führen.

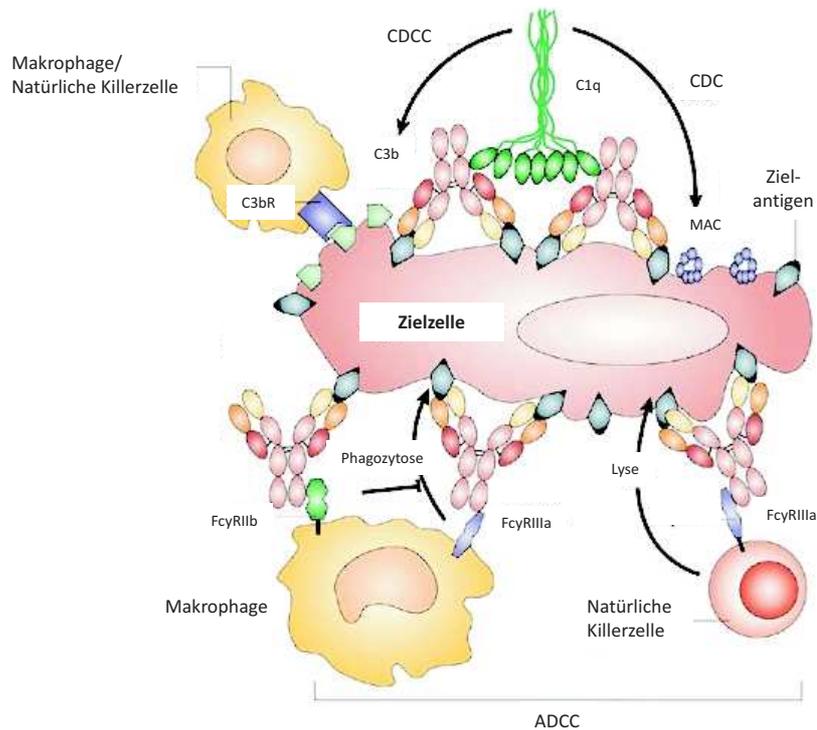


Abbildung 1.3: **Effektorfunktionen eines Ig $\gamma$ -Antikörpers:** Direkte und indirekte Antikörpervermittelte Wirkmechanismen zur Immunabwehr; modifiziert nach [Imai und Takaoka, 2006].

- $Fc\gamma RII/CD32$ : Dieses Molekül besteht im Gegensatz zu den anderen  $Fc\gamma R$  ausschließlich aus einer  $\alpha$ -Kette und gehört zu den niedrig- bis mäßig-affinen Rezeptoren. Es sind drei Untergruppen bekannt:  $Fc\gamma RIIA$  ist ein aktivierender Rezeptor z.B. auf Makrophagen;  $Fc\gamma RIIB$  ist der einzige inhibitorische Rezeptor und wird v.a. auf Makrophagen und Neutrophilen exprimiert. B-Zellen exprimieren ausschließlich diesen inhibitorischen Rezeptor auf der Zelloberfläche;  $Fc\gamma RIIC$  kann von NK-Zellen exprimiert werden.
- $Fc\gamma RIII/CD16$ : Es sind zwei Typen bekannt:  $Fc\gamma RIIIA$  wird v.a. auf NK-Zellen und Makrophagen exprimiert;  $Fc\gamma RIIIB$  wird als einziger  $Fc\gamma R$  über einen GPI-Anker (Glykosyl-Phosphatidyl-Inositol-Anker) auf der Zellmembran von Neutrophilen exprimiert und nicht über ITAM/ITIM aktiviert bzw. inhibiert.

Die meisten Effektorzellen weisen eine Koexpression aus verschiedenen aktivierenden  $Fc\gamma$ Rezeptoren und dem inhibitorischen  $Fc\gamma RIIB$  auf. Des Weiteren sind für die  $Fc\gamma R IIA$ ,  $IIB$  und  $IIIA$  Polymorphismen bekannt, welche die Affinitäten für die Fc-Fragmente zusätzlich isotypabhängig beeinflussen können. Da die NK-Zellen ausschließlich aktivierende  $Fc\gamma R$  auf der Membran tragen, gelten diese Immunzellen als Haupteffektoren der Antikörpervermittelten zellulären Zytotoxizität.

### 1.4.3 Etablierung therapeutischer Antikörper

#### 1.4.3.1 Antikörper der ersten Generation

Der therapeutische Einsatz monoklonaler Antikörper ist heutzutage ein fester Bestandteil der Immuntherapie. Dabei wird vor allem der Ig $\gamma$ 1-Isotyp aufgrund einer hohen Serumstabilität und der damit verbundenen langen Halbwertszeit angewendet. Grundlage hierfür ist die im Jahre 1975 durch Georges J.F. Köhler und César Milstein beschriebene Hybridomtechnologie. Aufgrund dieser wegweisenden Arbeiten zur Generierung von monoklonalen Mausantikörpern durch Fusion einer immortalisierten Zelllinie mit Milzzellen immunisierter Mäuse wurden die beiden Biologen im Jahr 1984 mit dem Nobelpreis ausgezeichnet [Kohler und Milstein, 1975].

Der erste mittels Hybridomtechnologie hergestellte Mausantikörper wurde bereits im Jahre 1986 zugelassen. Muromonab-CD3 ist ein Antikörper, welcher gegen das von T-Lymphozyten exprimierte Antigen CD3 gerichtet ist. Dieser wurde in Patienten zur Transplantatabstoßungsprävention eingesetzt. Allerdings haben Mausantikörper ein hohes immunogenes Potential. Als Fremdproteine werden sie von dem humanen Immunsystem erkannt und infolge dessen durch Bildung spezifischer anti-Maus-Antikörper (*engl. human anti-mouse antibodies, HAMA*) neutralisiert. Dies führte zu verkürzter Halbwertszeit, sowie verstärkter Immunogenität gegen den murinen Antikörper [Goodman et al., 1985]. Des Weiteren zeigen Antikörper der ersten Generation eine reduzierte Effektivität bezüglich Fc-vermittelter Effektorfunktionen, welche sich durch eine eingeschränkte Interaktion des murinen Antikörpers mit humanen Fc $\gamma$ -Rezeptoren erklären lässt.

#### 1.4.3.2 Antikörper der zweiten Generation

Die Weiterentwicklung therapeutischer Antikörper wurde durch die Etablierung der rekombinanten DNA-Technologie in den späten 1980er Jahren ermöglicht. Teile des murinen Antikörpers wurden gegen humane Äquivalente ausgetauscht, wodurch die Immunogenität deutlich reduziert und die Effektivität drastisch gesteigert werden konnte. Die Moleküle werden entsprechend dem humanem Anteil in murine, chimäre, humanisierte und humane Antikörper unterteilt (vgl. Abbildung 3.1.4.1).

Zur Chimärisierung werden lediglich die konstanten Regionen des Antikörpers ausgetauscht [Morrison et al., 1984]. Da die variablen Domänen nicht verändert werden, zeigen die Antikörper keine verminderte Affinität, allerdings eine deutliche Steigerung der Effektivität. Dies gewährleistet der humane Fc-Teil, welcher eine deutlich erhöhte Affinität zu den humanen Fc $\gamma$ -Rezeptoren der Effektorzellen aufweist. Zusätzlich ist die Immunogenität des Moleküls stark herabgesetzt, was wiederum eine längere Halbwertszeit im Serum ermöglicht. Als erstes chimäres Molekül wurde im Jahr 1997 der  $\alpha$ CD20-Antikörper Rituximab zur Behandlung von Patienten mit Non-Hodgkin-Lymphomen zugelassen.

Die Humanisierung von Antikörpern erfolgt weiterhin über den Austausch der *framework regions*. Dabei bleiben lediglich die für die Spezifität verantwortlichen hypervariablen Regionen (CDR) von murinem Ursprung [Jones et al., 1986]. Dieser Eingriff in die Antigenbindungsstelle kann jedoch potentiell zu einer verminderten Affinität des Antikörpers führen.

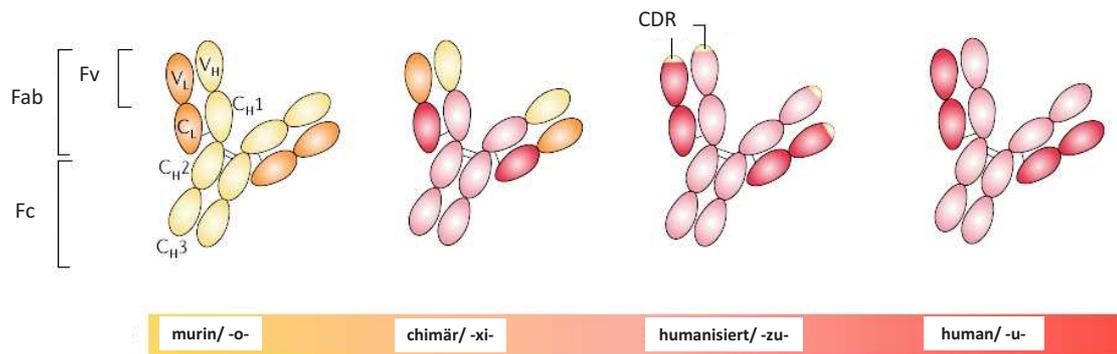


Abbildung 1.4: **Klassifizierung und Nomenklatur therapeutischer Antikörper bezüglich des humanen Anteils:** Mittels DNA-Technologie optimierte Antikörper werden je nach Restanteil des parentalen Mausantikörpers unterschiedlich klassifiziert. Der murine Antikörper ist in gelb dargestellt (Nomenklatur: -o-). Durch Austausch der konstanten Antikörperdomänen entsteht das chimäre Molekül (Nomenklatur: -xi-). Sind lediglich die hypervariablen Domänen des Antikörpers murin, spricht man von humanisierten Antikörpern (Nomenklatur: -zu-), der in rot dargestellte, humane Antikörper weist hingegen keine murinen Anteile auf (Nomenklatur: -u-). Übersicht der unterschiedlichen Domänen einer schweren ( $V_H$ ,  $C_H1$ ,  $C_H2$ ,  $C_H3$ ) und leichten ( $V_L$ ,  $C_L$ ) Antikörperkette. Fab: Fragment der Antigenbindung (*engl. antigen-binding fragment*); Fv: Fragment der variablen Region (*engl. variable fragment*); Fc: Fragment der hoch konservierten Region (*engl. fragment crystalline*); CDR: hypervariable Regionen (*engl. complementarity determining regions*); modifiziert nach [Imai und Takaoka, 2006]

Neben der Generierung chimärer und humanisierter Antikörper entstanden andere Technologien zur Herstellung von zu 100% humanen Antikörpern. Das *Phage Display* ist eine dieser Methoden, wobei aus großen Bibliotheken humaner variabler Antikörperdomänen spezifisch an das gewünschte Antigen bindende Kandidaten mittels Bakteriophagen *in vitro* identifiziert und isoliert werden können. Zur *in vivo*-Herstellung humaner Antikörper können transgene humanisierte Mäuse verwendet werden. Weitere Informationen bezüglich dieser beiden Methoden sind den Übersichtsartikeln [Geyer et al., 2012] und [Weiner, 2006] zu entnehmen.

### 1.4.3.3 Antikörper der dritten Generation

Zwar zählen alle bisher zugelassenen Antikörper zur ersten und vor allem zweiten Generation, verschiedene optimierte Antikörper und neuartige Formate werden jedoch bereits in klinischen Studien getestet. Antikörper dieser dritten Generation zeichnen sich durch die gezielte Verbesserung der Effektorfunktion aus. Dies kann über Konjugation an toxische Agenzien, über gentechnische Optimierung des Fc-Teils, sowie über die parallele Bindung einer zweiten Spezifität an immunstimulatorische Rezeptoren ermöglicht werden:

**Antikörperkonjugate** Antikörper können an diverse zytotoxische Agenzien gekoppelt werden. Dies ermöglicht durch selektive Bindung der Zielzellen die effektivere Applikation der toxischen Substanzen. Man unterscheidet dabei zwischen Radioisotopkonjugaten, Immunotoxin- und *Prodrug*-Konjugaten.

Durch Kopplung an Radioisotope sind die Antikörper in der Lage, die Strahlen-

therapie direkt gegen die gebundenen Zielzellen, sowie das umgebende Tumorgewebe zu richten. Die beiden  $\alpha$ CD20-Antikörper Tositumomab-I131 (Bexxar) und Ibritumomab tiuxetan (Zevalin) haben durch diesen Wirkmechanismus Marktzulassung erreicht.

Immunotoxine werden hingegen nach Bindung an die Tumorzelle internalisiert und anschließend die toxische Wirkung intrazellulär entfalten. Der an das Toxin Calicheamicin gekoppelte  $\alpha$ CD33-Antikörper Gemtuzumab ozogamicin (Mylotarg) war über 10 Jahre in den USA zur Behandlung der akuten myeloischen Leukämie (AML) zugelassen, wurde jedoch 2010 aufgrund von zu hohen Nebenwirkungen wieder vom Markt genommen. Diese Unverträglichkeiten lassen sich aufgrund der geringen Selektivität erklären, da nur ein kleiner Bruchteil (etwa 1%) des toxischen Antikörperkonjugates die Zielzelle erreicht. Im Februar 2013 wurde das Antikörperkonjugat Trastuzumab emtansine (T-DM1) zugelassen. Das humanisierte Molekül Trastuzumab (Herceptin) ist dabei an das Zytostatikum T-DM1 gekoppelt und wird zur Behandlung von Her2-positiven, metastasierenden Mammakarzinomen eingesetzt.

Die Konjugation an die inaktive Form eines Wirkstoffs, ein sogenanntes *Prodrug*, ist die potentiell spezifischste Variante der Antikörper-Wirkstoff-Konjugaten. Dabei kann der Wirkstoff erst nach Internalisierung des Antikörpers und entsprechender Metabolisierung zur Zielzellyse führen. Durch die Verwendung einer solchen Vorstufe werden für den Patienten geringere Nebenwirkungen erwartet.

**Fc-optimierte Antikörper** Eine weitere Möglichkeit zur Optimierung der Antikörper-Effektorfunktionen stellt die gentechnische Modifikation des konstanten Fc-Teils dar. Die Firma Xencor konnte über den definierten Austausch zweier Aminosäuren in den  $C_H2$ -Domänen (S239D und I332E, als SDIE-Modifikation bezeichnet) die Affinität für  $Fc\gamma R$  erhöhen. Diese Optimierung kann zu einer deutlichen Steigerung der ADCC führen [Lazar et al., 2006]. Durch weitere Arbeitsgruppen wurden ebenfalls Mutationen definiert, welche durch erhöhte Affinität für  $Fc\gamma R$  zur verbesserten ADCC-Aktivität führen können [Shields et al., 2001; Stavenhagen et al., 2007]. Über die verstärkte Affinität für das Komplementprotein C1q, welche ebenfalls mittels Substitution einzelner Aminosäuren erzielt wurde, konnte die CDC-Aktivität verschiedener Antikörper verstärkt werden [Moore et al., 2010].

Neben dieser Technologie der Aminosäuresubstitution kann eine entsprechende Verstärkung der Effektorfunktionen über die Modifikation der Glykosylierung des Fc-Teils erreicht werden. Dabei wurde gezeigt, dass z.B. das Fehlen von Fucose im Glykosylierungsmuster zur verstärkten Affinität an  $Fc\gamma R$  führt und somit die ADCC steigern kann [Shields et al., 2002].

Als zusätzliche Option zur verbesserten Wirkung therapeutischer  $Ig\gamma$ -Antikörper kann die Halbwertszeit im Serum verlängert werden. Dies konnte durch eine erhöhte Affinität für den u.a. auf Endothelzellen exprimierten neonatalen FcRezeptor (FcRn) und der damit verbundenen Rückgewinnung ins Blut in Cynomolgus nachgewiesen werden [Zalevsky et al., 2010].

**Bispezifische Antikörper** Ebenfalls zur dritten Generation zählen bispezifische Antikörper, welche über zwei unterschiedliche Antigenbindungsstellen verfügen. Neben Bindung des Tumor-assoziierten Antigens kann das Molekül simultan den Rezeptor einer Immunzelle erkennen und somit immunmodulierend wirken. Durch diese Quervernetzung der Tumor- und Effektorzelle war es erstmals möglich, T-Zellen über den TCR/CD3-Komplex als Effektoren in der Antikörpertherapie zu nutzen. Blinatumomab (mit den Spezifitäten für CD3 und CD19) gehört dabei gegenwärtig zu den viel versprechendsten, T-Zell rekrutierenden bispezifischen Antikörpern, welcher derzeit in Patienten mit akuter lymphatischer Leukämie klinisch erprobt wird [Baeuerle und Reinhardt, 2009]. Als weitere Spezifität auf Immunzellen ist die spezifische Bindung an den aktivierenden  $Fc\gamma RIII/CD16$  möglich, wobei die Quervernetzung der Tumor- und NK-Zelle die Lyse der malignen Zellen bewirken kann [Hartmann et al., 1997]. Neben der zusätzlichen Aktivierung von Effektorzellen können bispezifische Antikörper durch parallele Bindung zweier Tumor-assoziiertes Antigene die Spezifität für die malignen Zellen verstärken [Kugler et al., 2010].

Derzeit sind insgesamt 28 monoklonale Antikörper von der FDA (*engl. food and drug administration*) zur Behandlung von Krebserkrankungen, aber auch als Immunsuppressiva im Einsatz gegen Autoimmunerkrankungen, zugelassen [Reichert, 2012]. In Tabelle 1.2 sind die wichtigsten anti-Tumor-Antikörper bezüglich Wirkstoff- und Handelsname, Antikörpertyp, Antigen und Indikation aufgelistet.

Tabelle 1.1: Die wichtigsten anti-Tumor-Antikörper mit Marktzulassung: Angaben zu Wirkstoff- und Handelsname, Antikörpertyp, Antigen und Indikation

Wirkstoff (Handelsname)	Antikörpertyp	Antigen	Indikation
<b>Rituximab</b> (Rituxan)	chimär	CD20	maligne Lymphome
<b>Cetuximab</b> (Erbix)	chimär	EGFR	metastasierendes Kolorektal- karzinom, Kopf-Hals-Karzi- nom
<b>Trastuzumab</b> (Herceptin)	humanisiert	HER2	Mammakarzinom (HER2-po- sitiv)
<b>Bevacizumab</b> (Avastin)	humanisiert	VEGF	metastasierendes Kolorektal- karzinom, nicht-kleinzelliges Lungenkarzinom, Glioblastom, metastasierendes Nierenzell- karzinom, fortgeschrittenes Ovarialkarzinom
<b>Panitumumab</b> (Vectibix)	human	EGFR	metastasierendes Kolorektal- karzinom
<b>Ofatumumab</b> (Arzerra)	human	CD20	chronische lymphatische Leu- kämie (CLL)

## 1.5 Angiogenese

### 1.5.1 Tumor-induzierte Angiogenese

Das Aussprossen neuer Blutgefäße aus dem bereits bestehenden Gefäßsystem wird als Neoangiogenese bezeichnet. Die Gefäß-auskleidenden Endothelzellen reagieren hierbei auf verschiedene aktivierende, pro-angiogenetische und inhibierende, anti-angiogenetische Faktoren. Bei der Angiogenese handelt es sich um einen komplexen Prozess, welcher stark reguliert ist. Nach dem vaskulären Aufbau während der Embryonalentwicklung (teilweise auch als Vaskularisierung bezeichnet), tritt Angiogenese im gesunden adulten Organismus lediglich während der Wundheilung, dem Muskelaufbau und der Schwangerschaft auf [Folkman und Shing, 1992].

Unter pathologischen Bedingungen werden physiologische pro-angiogenetische Signalwege ausgenutzt, die zur verstärkten Angiogenese führen. Zu den durch chronische Blutgefäßbildung bedingten Krankheiten zählen u.a. die diabetische Retinopathie, die feuchte Form der altersbedingten Makuladegeneration, sowie das Wachstum benigner und maligner solider Tumoren, die über 90% aller Krebserkrankungen ausmachen [Miller et al., 1994; Moulton et al., 2003; Szabo et al., 1994]. Bereits in den 1940er-Jahren berichtete Glenn H. Algire erstmals von dem Phänomen der aktiven Gefäßneubildung durch den Wirt in Richtung der Neoplasien [ALGIRE et al., 1945; YOUNGNER und ALGIRE, 1949].

Stetiges Tumorwachstum erfordert eine ausreichende Sauerstoff- und Nährstoffversorgung, sowie die Stoffwechselabfallproduktentsorgung. Diese Aufgaben werden durch die versorgenden Blutgefäße gewährleistet und sind somit von zentraler Bedeutung. Es ist beschrieben, dass Tumoren ohne vaskuläre Versorgung eine maximale Größe von 1-2 mm<sup>3</sup> nicht überschreiten können [Folkman und Hanahan, 1991]. Diese Wachstumsgrenze entspricht der maximalen Distanz, welche Sauerstoff und Nährstoffe per Diffusion zurücklegen können. Oberhalb dieser Größe führt die fehlende Blutversorgung des Mikrotumors zu Sauerstoffunterversorgung (Hypoxie), welches die Gefäßneubildung stimuliert und somit ein weiteres Tumorwachstum ermöglicht. Während der Tumorangiogenese kommt es zur verstärkten Ausschüttung von pro-angiogenetischen Wachstumsfaktoren und zu einer Hemmung der Inhibitoren. Dies begünstigt die Entstehung Tumor-versorgender Gefäße. Die Fülle an pro-angiogenetischen Stimuli überwiegt und führt zur übermäßigen und unregulierten Ausbildung eines neuen aberranten Blutgefäßnetzwerkes [Nagy et al., 2010]. Im Vergleich zu normalen Blutgefäßen sind diese stark erweitert, nur wenige interzelluläre Verknüpfungen, sowie fehlende bzw. fehlerhafte Perizyten führen zu erhöhter Permeabilität, welche eine Metastasierung begünstigt.

Harold Dvorak beschreibt Tumoren aufgrund dieser übermäßigen, unregulierten Gefäßneubildung mit einer anschaulichen Metapher als Wunden, die nicht heilen [Dvorak, 1986].

Die wichtigsten beteiligten Faktoren der komplexen Tumor-induzierten Angiogenese sind in Abbildung 1.5 graphisch dargestellt. Die Initiierung erfolgt dabei aufgrund der Sekretion pro-angiogenetischer Faktoren durch die malignen Zellen. Hierzu zählen vor allem VEGF (*engl. vascular endothelial growth factor*), TGF-

$\beta 1$  (engl. tumor growth factor), PDGF (engl. platelet-derived growth factor) und bFGF (engl. basic fibroblast growth factor), welche durch Bindung an deren Rezeptoren die Endothelzellen stimulieren. Das aktivierte Endothel sekretiert daraufhin Matrix-Metalloproteinasen (MMP) in das umgebende Gewebe und bereitet somit durch Lyse der extrazellulären Matrix die Gefäßneubildung vor. Durch Proliferation und Migration der aktivierten Endothelzellen werden neue Blutgefäße ausgebildet. Die Stabilisierung der neuen Gefäße erfolgt durch die Rekrutierung glatter Muskelzellen und Perizyten, sowie den Neuaufbau der extrazellulären Matrix [Kerbel, 2008].

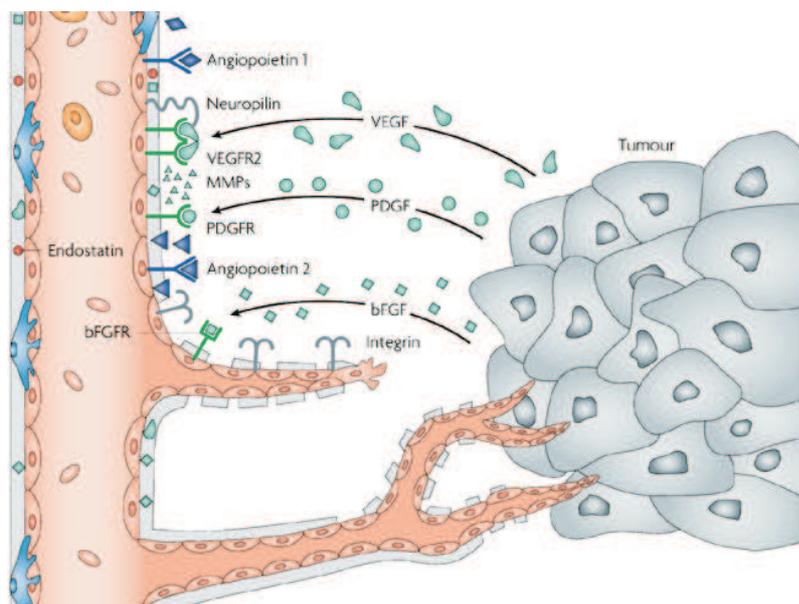


Abbildung 1.5: **Ablauf der Tumor-induzierten Angiogenese:** Der Tumor sekretiert zur Induktion der Angiogenese die pro-angiogenetischen Wachstumsfaktoren VEGF (vascular endothelial growth factor), PDGF (platelet-derived growth factor) und bFGF (basic fibroblast growth factor), welche an ihre Rezeptoren (VEGFR2, PDGFR und bFGFR) auf den Endothelzellen binden. Aktivierte Endothelzellen schütten Matrix-Metalloproteinasen (MMPs) zur Lyse der extrazellulären Matrix aus und bilden, nach Proliferation und Migration, neue Blutgefäße aus. Angiopoietin 1 als anti- und Angiopoietin 2 als pro-angiogenetischer Faktor konkurrieren um ihren Rezeptor Tie-2 und beeinflussen die Normalisierung bzw. Auflösung der stabilisierenden Zellen. Endostatin inhibiert als anti-angiogenetischer Faktor die Proliferation und Migration der Endothelzellen; modifiziert nach [Folkman, 2007]

### 1.5.2 Anti-vaskuläre Tumorthherapie

Judah Folkman prägte bereits 1971 den Begriff der Tumorangiogenese und stellte erstmals die Hypothese auf, Tumoren durch Zerstörung ihrer Blutgefäßversorgung bekämpfen zu können [Folkman, 1971].

Der anti-angiogenetische Therapieansatz weist viele Vorteile gegenüber einer konventionellen anti-Tumor-Therapie auf. Im Folgenden sind die wichtigsten Unterschiede aufgelistet:

- eine intakte Blutversorgung ist für den Tumor überlebensnotwendig

- die Therapie kann die Zerstörung existierender Blutgefäße, sowie Unterdrückung der Neubildung bewirken
- die Zerstörung eines einzelnen Blutgefäßes führt zum Absterben von tausenden malignen Zellen
- Unabhängigkeit von hoher genetischer Tumorinstabilität und heterogenem Expressionsmuster maligner Zellen
- anwendbar auf alle soliden Tumoren, unabhängig vom malignen Typ
- optimale Zugänglichkeit des Antikörpers über den Blutstrom, es ist keine Penetration des Therapeutikums ins Gewebe notwendig
- Angiogenese läuft im adulten Organismus nur bedingt ab, die gezielte Zerstörung aktivierter Endothelzellen ist daher weitaus spezifischer als konventionelle Chemotherapie

Angesichts dieser Vorzüge erscheint Folkman´s Hypothese, durch gezielte Zerstörung der versorgenden Blutgefäße das Tumorstadium zu inhibieren und infolgedessen die Metastasierung zu verhindern, außerordentlich attraktiv.

Es dauerte allerdings 30 Jahre, bis das erste anti-angiogenetische Medikament im Jahr 2004 die Marktzulassung erreichte. Bevacizumab, ein humanisierter monoklonaler Antikörper, zeigt über die spezifische Bindung an den löslichen Wachstumsfaktor VEGF eine anti-vaskuläre Wirkung. Durch diese Blockierung des pro-angiogenetischen Faktors, wird die Bindung an den Rezeptor VEGFR2 verhindert. Wie oben beschrieben, ist die VEGF-Sekretion einer der initialen Schritte in der Tumor-induzierten Angiogenese. Dessen Neutralisierung verhindert die VEGF-vermittelte Aktivierung der Endothelzellen und somit die Gefäßneubildung. Bevacizumab wird von der Pharmafirma Roche unter dem Handelsnamen Avastin vertrieben. Die Zulassung erfolgte nach klinischer Phase 3-Studie in Patienten mit fortgeschrittenem Kolorektalkarzinom. Hierbei führte eine chemotherapeutische Behandlung in Kombination mit Bevacizumab zu einer signifikanten Überlebensverlängerung, im direkten Vergleich zur alleinigen Chemotherapie [Gerber und Ferrara, 2005; Folkman, 2006].

Heute ist Bevacizumab in Europa (E) und/oder den Vereinigten Staaten (US) für weitere Indikationen zugelassen. Dazu zählen: metastasierendes nicht-kleinzelliges Bronchialkarzinom (E und US), Glioblastom (US), metastasierendem Nierenzellkarzinom (E und US), metastasierendes Mammakarzinom (E) und seit Dezember 2011 zusätzlich das fortgeschrittene Ovarialkarzinom (E). Mit der Ausnahme des metastasierenden Nierenzellkarzinoms werden die Patienten mit einer Kombination aus Bevacizumab und Chemotherapie behandelt.

Grundsätzlich ist das Ansprechen der Patienten auf das erste anti-vaskuläre Therapeutikum weniger beeindruckend als erwartet. Bei manchen Tumorerkrankungen führt die Behandlung zu keiner Veränderung des Krankheitsverlaufes. In einigen Fällen konnte hingegen eine deutliche Verbesserung bezüglich der Tumorstadiumsprogression,

sowie der Gesamtüberlebensrate nachgewiesen werden. Eine mögliche Erklärung, für das unterschiedliche Ansprechen auf eine anti-VEGF-Therapie könnten kürzlich publizierte Ergebnisse liefern, wonach bei einigen Krebsarten eine Korrelation zwischen der verstärkten Expression des VEGF-Rezeptors mit dem verminderten Ansprechen auf Bevacizumab nachgewiesen werden konnte. Diese erhöhte Expression des Proteins erfolgt aufgrund eines Gen-Polymorphismus (*engl. single nucleotide polymorphism*, SNP), welcher nun als möglicher Biomarker für eine anti-VEGF-Therapie diskutiert wird [Lambrechts et al., 2012].

Des Weiteren konnte für einige Patienten nach erster Antikörper-Gabe eine erfolgversprechende Inhibierung des Tumorstwachstums beobachtet werden, welche jedoch nach einiger Zeit verloren ging. Es wurde gezeigt, dass Bevacizumab nicht ausschließlich die Angiogenese inhibiert, sondern zusätzlich zu einer Normalisierung der Tumor-versorgenden Blutgefäße führen kann [Jain, 2001]. Dieser Effekt senkt über die verminderte Permeabilität der Gefäße das Metastasierungsrisiko deutlich. Allerdings scheint die Blockierung des VEGF-Signalwegs und somit das verminderte Tumorstwachstum mögliche Resistenzen auszulösen. Diese könnten jedoch die Chemotherapie selbst betreffen, welche das Ansprechen auf eine Bevacizumab-Behandlung nachgewiesen synergistisch verbessert. Der maligne Typ, sowie die entsprechende Auswahl des in Kombination gegebenen Chemotherapeutikums und die Dosis scheinen somit das Ansprechen auf eine anti-VEGF-Therapie über einen längeren Behandlungszeitraum signifikant zu beeinflussen. Die Ursachen der auftretenden Resistenz sind vielschichtig und Thema aktueller Diskussionen.

Nagy et al. konnten nach Einteilung der Tumorgefäße in sechs unterschiedliche Typen lediglich für zwei eine VEGF-Abhängigkeit nachweisen. Auf längere Sicht besteht der Tumor zunehmend aus Gefäßen, welche dem VEGF-unabhängigen Typ angehören [Nagy et al., 2010]. Diese Resultate können die auftretenden Resistenzen während einer Bevacizumab-Behandlung ebenfalls erklären.

Des Weiteren scheint es für den Tumor möglich, die Angiogenese auch über VEGF-unabhängige Signalkaskaden auszulösen und eine ausreichende Blutversorgung zu gewährleisten [Ferrara, 2010].

Trotz diesen beschriebenen Problemen, stellt Bevacizumab einen Fortschritt in der Krebsforschung dar. Der Antikörper konnte als erstes anti-vaskulär wirkenden Medikament das Potenzial eines solchen Therapiesatzes verdeutlichen und in Patienten mit verschiedenen soliden Tumoren zu einer signifikanten Verbesserung des Krankheitsverlaufes führen.

Bis heute attackieren die meisten zugelassenen, anti-angiogenetischen Therapeutika den VEGF-Signalweg. Neben der Neutralisierung des Liganden VEGF (Bevacizumab, Ziv-aflibercept) blockieren diverse, sogenannte *small molecules* als Tyrosinkinase-Inhibitoren (TKIs: Sorafenib, Sunitinib, Axitinib, Pazopanib und Vandetanib), jedoch relativ unspezifisch, die VEGF-Rezeptoren [Bhargava und Robinson, 2011]. Rapamycin reduziert bereits durch Blockierung des mTOR-Signalweges (*engl. mammalian target of rapamycin*) die Produktion des löslichen pro-angiogenetischen Faktors [Falcon et al., 2011].

Seit 2005 ist rekombinantes Endostatin als zweites Medikament zur anti-

vaskulären Therapie in China freigegeben. Endostatin kommt endogen im Körper vor und inhibiert als anti-angiogenetischer Faktor die Blutgefäßneubildung (vgl. Abbildung 1.5). Bisher gibt es jedoch keine Marktzulassung für Europa oder die Vereinigten Staaten.

Die wichtigsten, zugelassenen Medikamente mit anti-vaskulärer Wirkung sind in Tabelle 1.2 aufgelistet. Folgende Angaben wurden berücksichtigt: Wirkstoff- und Handelsname, Firma, Molekülklasse und Indikation.

Wie dargestellt, ist die Wirkungsweise dieser zur anti-angiogenetischen Therapie zugelassenen Medikamente hauptsächlich die Inhibierung der Blutgefäßneubildung durch Neutralisierung pro-angiogenetischer Wachstumsfaktoren bzw. eine relativ unspezifische Inhibierung der Tyrosinkinase-Aktivität ihrer Rezeptoren. Als neuer, effektiverer Therapieansatz wäre es denkbar, neben der Blockierung der Neoangiogenese zusätzlich die bereits existierenden Tumor-versorgenden Blutgefäße durch Lyse der Endothelzellen zu zerstören. Infolgedessen könnte die Einwanderung immunologischer Effektorzellen in den Tumor die Induktion einer spezifischen Immunantwort gegen die malignen Zellen begünstigen.

Für eine solche, innovative Therapieform ist die Spezifität für das Endothel der Tumor-versorgenden Gefäße von zentraler Bedeutung, da durch eine unerwünschte, unspezifische Zerstörung des gesunden Blutgefäßsystems erhebliche Nebenwirkungen ausgelöst werden könnten. Zudem handelt es sich bei dem Tumorgefäß-auskleidenden Endothel nicht um maligne Zellen, die Existenz eines Tumorendothel-spezifischen Antigens wird daher nicht erwartet. Allerdings zeigen aktivierte Tumorendothelzellen, wie bereits beschrieben, gegenüber ruhendem, normalem Endothel auf molekularer, morphologischer und funktionaler Ebene ein verändertes Phänotyp [Nagy et al., 2010]. Die aberranten Blutgefäße des Tumors weisen dabei aufgrund der verstärkten Proliferation u.a. ein verändertes Proteinexpressionsprofil auf.

Potentiell standen einige Kandidaten zur Auswahl. Die membranständigen Rezeptoren der löslichen pro-angiogenetischen Wachstumsfaktoren, wie VEGFR/VEGFR2 oder Tie-2, lagen dabei im besonderen Fokus. Die Auswahl des Zielantigens zur effektiven und nachhaltigen anti-vaskulären Tumorthherapie erfolgte in dieser Arbeit anhand folgender Kriterien:

- ein Oberflächenprotein auf Endothelzellen
- schwache Expression auf ruhendem Endothel
- starke Überexpression auf proliferierenden, aktivierten Endothelzellen (der Tumor-versorgenden Gefäße)

Die Suche nach dem idealen Zielantigen, welches die oben genannten Eigenschaften erfüllt und somit potentiell zur verbesserten, direkten anti-angiogenetischen Tumorthherapie eingesetzt werden kann, führte zu dem endothelialen Membranprotein Endoglin, auf welches in den nächsten Abschnitten näher eingegangen wird.

Tabelle 1.2: **Zugelassene Therapeutika mit anti-angiogenetischer Wirkung:** Angaben zu Wirkstoff- und Handelsname, sowie Firma, Molekülklasse und Indikation

Medikament (Handelsname, Firma)	Molekülklasse	Funktion	Indikation
<b>Bevacizumab</b> (Avastin, Roche)	humanisierter Antikörper	Neutralisierung VEGF	von metastasierendes Kolorektalkarzinom, nicht-kleinzelliges Lungenkarzinom, Glioblastom, metastasierendes Nierenzellkarzinom, fortgeschrittenes Ovarialkarzinom
<b>Ziv-afibercept</b> (Zaltrap, Sanofi)	rekombinantes Fusionsprotein	Neutralisierung VEGF und PGF	von metastasierendes Kolorektalkarzinom
<b>Sorafenib</b> (Nexavar, Bayer AG)	small molecule	Tyrosinkinase-Inhibitor	Nierenzellkarzinom
<b>Sunitinib</b> (Sutent, Pfizer)	small molecule	Tyrosinkinase-Inhibitor	gastrointestinaler Stromatumor (GIST), Nierenzellkarzinom
<b>Axitinib</b> (Inlyta, Pfizer)	small molecule	Tyrosinkinase-Inhibitor	Nierenzellkarzinom
<b>Pazopanib</b> (Votrient, GlaxoSmithKline)	small molecule	Tyrosinkinase-Inhibitor	Nierenzellkarzinom, Weichteilsarkom
<b>Vandetanib</b> (Caprelsa, AstraZeneca)	small molecule	Tyrosinkinase-Inhibitor	Schilddrüsenkarzinom
<b>Rapamycin</b> (Rapamune, Pfizer)	aus <i>Streptomyces hygroscopicus</i>	blockiert mTOR	Prophylaxe der Organabstoßung nach Transplantation
<b>Endostatin</b> (Endostar)	rekombinantes Endostatin	endogener Angiogeneseinhibitor	nicht-kleinzelliges Lungenkarzinom

## 1.6 Endoglin

### 1.6.1 Struktur des Membranproteins Endoglin

Das Oberflächenprotein Endoglin (*engl. cluster of differentiation number 105, CD105*) wurde erstmals 1985 von der Arbeitsgruppe um Michelle Letarte als Leukämie-assoziiertes Antigen beschrieben [Quackenbush und Letarte, 1985].

In Abbildung 1.6 ist der Aufbau des Proteins dargestellt. Das Typ1-Transmembranprotein wird als Disulfid-stabilisiertes Homodimer auf der Zelloberfläche exprimiert [Gougos und Letarte, 1988]. Es besteht aus 633 Aminosäuren und weist ein Molekulargewicht von ca. 180 kDa auf. Das Glykoprotein besitzt eine große extrazelluläre Domäne, eine hydrophobe Transmembrandomäne, sowie eine kleine cytoplasmatische Region. Dieser C-terminale Bereich weist eine Serin-Threoninreiche Sequenz auf, welche zur intrazellulären Signalweiterleitung phosphoryliert wird. Für den extrazellulären Anteil von Endoglin konnten drei definierte Domänen

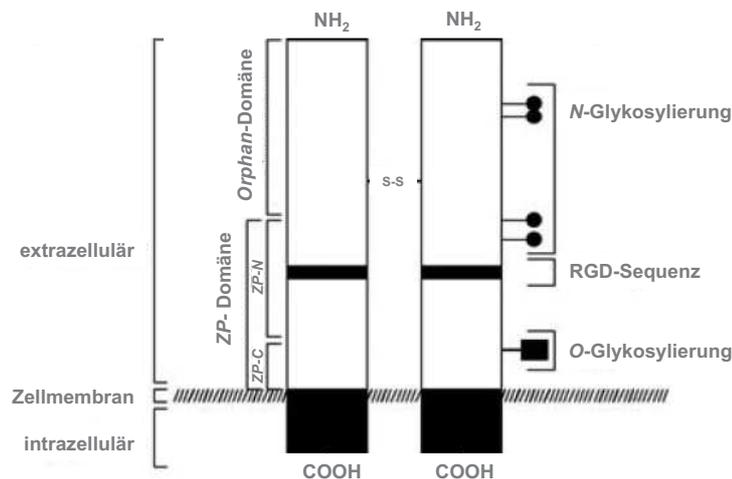


Abbildung 1.6: **Aufbau von Endoglin:** Einteilung in den extrazellulären und intrazellulären Bereich, sowie in die Transmembrandomäne. Das Disulfid-verknüpfte Homodimer weist eine RGD-Sequenz, sowie verschiedene *N*- und *O*-Glykosylierungen auf. Der extrazelluläre Bereich eines Monomers wird in drei Domänen *ZP-C*, *ZP-N* und *orphan* eingeteilt; *ZP*: *zona pellucida*; modifiziert nach [Garcia-Pozo et al., 2008]

je Monomer identifiziert werden [Llorca et al., 2007]. Zwei dieser Untereinheiten gehören zu einer charakteristischen *ZP*-Domäne (*ZP-N* und *ZP-C*), weshalb Endoglin in die Familie der *Zona pellucida*-Proteine (*ZP*) eingeordnet wird. Die beiden genannten Untereinheiten beinhalten nahe der Transmembrandomäne acht Cysteine, welche zwischen den verschiedenen Spezies, wie Mensch, Maus (72% Sequenzhomologie), Ratte, Hund und Schwein (72% Sequenzhomologie) hoch-konserviert sind. Es wird vermutet, dass die *ZP-C*-Domäne an der Bindung des TGF- $\beta$ -Liganden beteiligt ist [Lin et al., 2011]. Die dritte und größte Domäne von CD105 wird als *orphan* bezeichnet, für welche keine signifikanten Homologien zu anderen Proteinen nachgewiesen werden konnten.

Die Aminosäuresequenz von Endoglin enthält das Tripeptid Arginin-Glycin-Asparaginsäure (RGD), welches sich an einer exponierten Region der extrazellulären

Domäne befindet [Cheifetz et al., 1992]. Dabei handelt es sich um eine charakteristische Erkennungssequenz zur Adhäsion von Integrinen, welche für verschiedene Prozesse wie Hämostasis und Entzündungen wichtig ist. Kürzlich wurde beschrieben, dass der zelluläre Rezeptor  $\alpha 5\beta 1$ -Integrin des extrazellulären Matrixproteins Fibronectin mit Endoglin interagiert. Als potentielle Bindungsstelle wird hierbei diese charakteristische RGD-Region diskutiert [Tian et al., 2012]. Interessanterweise ist beschrieben, dass die RGD-Sequenz im Endoglinmolekül von Mäusen, Ratten, Schweinen und Hunden fehlt [St-Jacques et al., 1994; Ge und Butcher, 1994; Yamashita et al., 1994; Llorca et al., 2007].

Anhand einer Strukturvorhersage, sowie einer elektronenmikroskopischen Analyse, konnte die dreidimensionale, extrazelluläre Struktur (ca. 140 kDa) von Endoglin ermittelt werden [Llorca et al., 2007]. Dabei wurde gezeigt, dass die beiden Monomere antiparallel angeordnet sind und dabei eine Art Kappe bilden, welche an einer Seite geöffnet ist. In Abbildung 1.7 ist die hypothetische, dreidimensionale Struktur von Endoglin dargestellt.

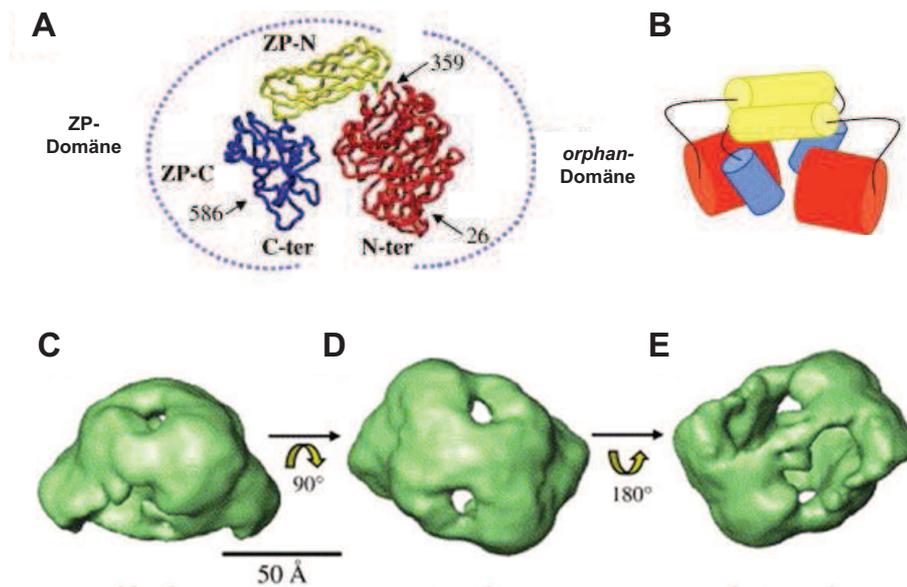


Abbildung 1.7: **Räumliche Anordnung des Homodimers Endoglin:** Vorhersage der dreidimensionalen (3D), extrazellulären Proteinstruktur von Endoglin. **A:** Darstellung der drei Domänen eines Monomers: *orphan*-Domäne (rot, Glu26-Ile359), *ZP-N*- und *ZP-C*-Domäne (gelb und blau, Gln360-Gly586) **B:** Schematische Anordnung von Endoglin als Homodimer **C:** Seitenansicht der 3D-Struktur von Endoglin **D:** Aufsicht der 3D-Struktur von Endoglin **E:** Untersicht der 3D-Struktur von Endoglin; modifiziert nach [Llorca et al., 2007]

Das für humanes Endoglin codierende Gen ist auf Chromosom 9q34 lokalisiert. Es ist 40 kb groß und in 14 Exons angeordnet [Fernandez-Ruiz et al., 1993; McAllister et al., 1995]. Der Promoter von CD105 hat eine Länge von 2,6 kb [Rius et al., 1998]. Durch alternatives Spleißen entstehen zwei Isoformen des Proteins, S-Endoglin (*engl. short*, kurze Form) und L-Endoglin (*engl. long*, lange Form), welche sich ausschließlich in Länge und Aminosäuresequenz des cytoplasmatischen Teils unterscheiden

[Bellon et al., 1993]. Die längere Variante L-Endoglin wird jedoch hauptsächlich auf Endothelzellen exprimiert [Perez-Gomez et al., 2005].

### 1.6.2 Expression von Endoglin

Die Hauptaufgabe von Endoglin ist die Beteiligung an der Herz- und Gefäßentwicklung, sowie an Reparatur- und Entzündungsprozessen wie z.B. während der Wundheilung [Torsney et al., 2002]. Dabei wird Endoglin hauptsächlich auf Endothelzellen exprimiert, wobei es auf proliferierendem, aktiviertem Gefäßendothel deutlich hochreguliert wird. Während der humanen Embryonalentwicklung wird CD105 auf dem Endothel der Blutgefäße ausschließlich zwischen der vierten und achten Schwangerschaftswoche verstärkt exprimiert. Zwischen der vierten und dreizehnten Schwangerschaftswoche wurde eine verstärkte Expression von CD105 während der Entwicklung des Herzens auf dem Endokardium beschrieben [Qu et al., 1998].

Diese wichtige Beteiligung von Endoglin an der Angiogenese bzw. vaskulären Entwicklung konnte zusätzlich im Mausmodell bestätigt werden. Die Deletion beider Endoglin-Gene führte *in utero*, also bereits während der frühen Embryonalentwicklung (Tag 10,5), aufgrund von krankhaften Blutgefäßfehlbildungen im Mutterleib zum Tode [Li et al., 1999; Bourdeau et al., 1999].

Auf den aktivierten Blutgefäßen solider Tumoren und teilweise ebenso auf deren Stroma konnte die Überexpression von CD105 in zahlreichen Studien, unter Verwendung diverser  $\alpha$ Endoglin-Antikörper, bestätigt werden [Gougos und Letarte, 1988; Burrows et al., 1995; Miller et al., 1999; Sanchez-Elsner et al., 2002]. Dabei beschränkt sich die Überexpression auf die intra- und peritumoralen Gefäße, auf dem entsprechenden normalen, ruhenden Endothel wurde hingegen nur eine marginale Expression detektiert [Wang et al., 1995]. Dabei konnte eine deutliche Korrelation zwischen der Endoglinexpression auf den Endothelzellen, sowie dem Marker für Zellproliferation Ki-67 nachgewiesen werden [Miller et al., 1999].

Endoglin ist ebenfalls auf Synzytiotrophoblasten in der Plazenta stark exprimiert [Gougos et al., 1992]. Eine schwache Expression von CD105 wurde v.a. auf Fibroblasten, Makrophagen und hämatopoetischen Vorläuferzellen des Knochenmarks nachgewiesen [Cho et al., 2001; Rokhlin et al., 1995; Lastres et al., 1992]. Weiterhin wird eine schwache Expression des Proteins auf den glatten Muskelzellen der Blutgefäße, sowie auf Proerythroblasten beschrieben [Adam et al., 1998; Buhring et al., 1991]. Auf frisch-isolierten Monozyten, Granulozyten, Erythrozyten, sowie B- und T-Zellen des Blutes wurde kein Endoglin detektiert [Quackenbush und Letarte, 1985; Haruta und Seon, 1986].

Endoglin ist auf Prä-B- und Prä-T-Leukämiezellen (47% bei AML, 82% bei B-ALL und 7% bei T-ALL) exprimiert, jedoch nicht auf reifen B- und T-Zellen [Rokhlin et al., 1995; Fonsatti et al., 2001].

Als Stimuli zur verstärkten Endoglinexpression wurde der Einfluss von TGF- $\beta$ , sowie auftretender Sauerstoffmangel (Hypoxie) im Gewebe beschrieben [Rius et al., 1998; Sanchez-Elsner et al., 2002]. Dabei konnte *in vitro* bereits 16 Stunden nach dem Sauerstoffmangel die maximale Antigendichte erreicht werden. Neben der Induktion der Angiogenese aufgrund mangelnder Versorgung wird als zusätzlicher Mechanismus von CD105 die anti-apoptotische Wirkung auf das hypoxische Gewebe

beschrieben [Li et al., 2003]. Weiterhin konnte als weiterer Stimulus zur verstärkten Endoglin-Expression die Bestrahlung identifiziert werden [Wang et al., 1995].

### 1.6.3 Regulierung der Angiogenese durch Endoglin

Der Rezeptorkomplex TGF- $\beta$  (*engl. transforming growth factor*) reguliert verschiedenste biologische Prozesse, welche an der Ontogenese beteiligt sind. Dabei nimmt TGF- $\beta$  Einfluss auf die Zellproliferation, Migration, Differenzierung, sowie auf die Produktion der extrazellulären Matrix [Piek et al., 1999; Massague et al., 2000]. Somit ist TGF- $\beta$  ebenfalls in der Entwicklung des Blutgefäßsystems involviert und kann das Wachstum von Endothelzellen stimulieren oder inhibieren.

Die Regulierung der Endothelzellen erfolgt dabei über den akzessorischen TGF- $\beta$  Rezeptor Endoglin. Dieser bindet verschiedene Mitglieder der TGF- $\beta$ -Superfamilie, wie hauptsächlich TGF- $\beta$ 1 und TGF- $\beta$ 3, sowie Activin-A, BMP-2, BMP-7 und BMP-9 (*engl. bone morphogenic protein, BMP*) [David et al., 2007]. Allerdings erfolgt diese Ligandenbindung ausschließlich in Anwesenheit der TGF- $\beta$ -Rezeptoren [Cheifetz et al., 1992; Barbara et al., 1999; Letamendia et al., 1998].

Verschiedene Studien zeigten, dass TGF- $\beta$  in Endothelzellen zwei intrazelluläre Smad-Signalwege aktivieren kann. Dazu zählt einerseits die Signalweiterleitung über die ALK5-Smad2/3-Kaskade und andererseits der Signalweg über ALK1-Smad1/5/8 (*engl. activin receptor-like kinase, ALK*). Es ist beschrieben, dass der Rezeptor ALK1 hauptsächlich auf Endothelzellen exprimiert ist, ALK5 ist hingegen ubiquitär exprimiert [Massague, 1998].

Es wird vermutet, dass die Anwesenheit von Endoglin nach Bindung eines Liganden die Signalweiterleitung über den TGF- $\beta$ -Rezeptor ALK1 begünstigt. Dabei erfolgt die Weiterleitung über die Phosphorylierung einer speziellen Untergruppe an Smad-Proteinen bis in den Nukleus und reguliert somit die Transkription pro-angiogenetischer Gene. Die Abwesenheit von Endoglin soll hingegen zur verstärkten Signaltransduktion über den TGF- $\beta$ -Rezeptor ALK5 führen, wodurch das Zellwachstum unterdrückt wird [Lebrin et al., 2004; Koleva et al., 2006; Guerrero-Esteo et al., 2002; Lastres et al., 1996; Blanco et al., 2005]. In diesem Kontext wird ebenfalls eine durch Endoglin initiierte Heterodimerisierung von ALK1 und ALK5 diskutiert.

Das komplexe Zusammenspiel der verschiedenen TGF- $\beta$ -Rezeptoren und -Liganden zur Regulierung der Angiogenese, sowie die detaillierte Rolle von Endoglin, ist jedoch noch größtenteils unklar.

Neben Endoglin wird ein weiterer TGF- $\beta$ -Rezeptor, als Betaglycan bezeichnet, beschrieben, welcher eine signifikante Sequenzhomologie von 71% aufweist. Allerdings ist dieses Protein nicht auf Endothelzellen exprimiert [Cheifetz et al., 1992].

Kürzlich wurde eine Beteiligung von Endoglin bei Integrin-abhängigen Signalwegen beschrieben. Dabei scheint CD105 mit dem zellulären Rezeptor  $\alpha$ 5 $\beta$ 1-Integrin des extrazellulären Matrixproteins Fibronectin zu interagieren. Diese Komplexbildung kann die Phosphorylierung der Endoglin-abhängigen ALK1-Smad1/5/8-Signalkaskade verstärken und somit zusätzlich die pro-angiogenetischen Stimuli regulieren [Tian et al., 2012].

Die hypothetische Rolle von Endoglin in der TGF- $\beta$ -Signaltransduktion zur Regulierung der Angiogenese ist in Abbildung 1.8 schematisch dargestellt.

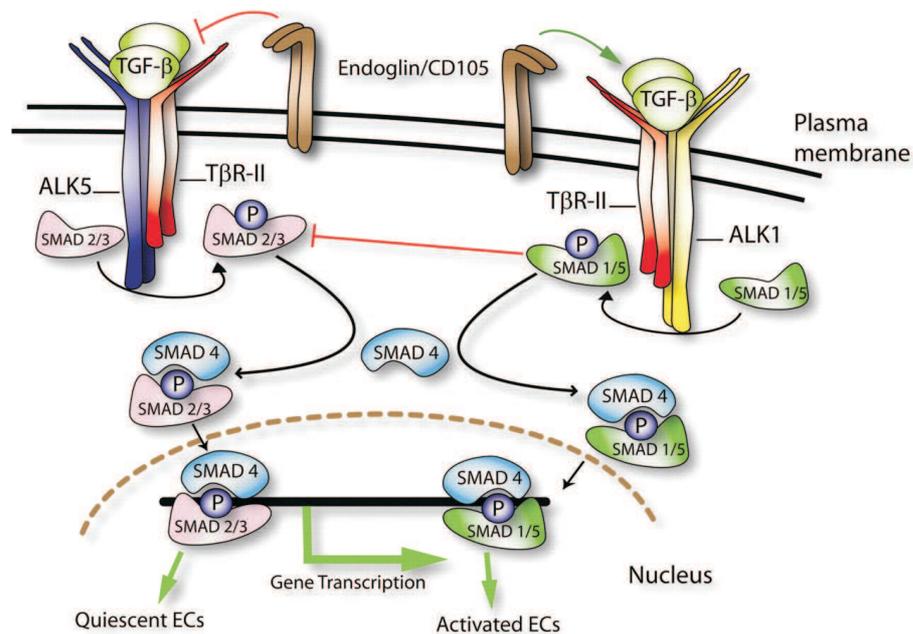


Abbildung 1.8: **Endoglin als akzessorischer Rezeptor der TGF- $\beta$ -Superfamilie:** Modulation der intrazellulären Signalweiterleitung durch Endoglin. Der ALK1-Smad1/5-Signalweg führt zur Transkription pro-angiogener Gene. Der ALK5-Smad2/3-Signalweg verursacht einen anti-mitogenen Stimuli; modifiziert nach [Fonsatti et al., 2010]

#### 1.6.4 Hereditäre hämorrhagische Teleangiektasie Typ1

Die hohe Bedeutung von Endoglin während der Angiogenese wird im Falle einer Mutation des CD105-Gens besonders deutlich. Mutationen, v.a. in der extrazellulären Domäne des Proteins, können zur Entstehung einer autosomal-dominanten Erbkrankheit des Blutgefäßsystems führen, welche als hereditäre hämorrhagische Teleangiektasie Typ1 (HHT; MIM# 187300) bzw. Morbus Rendu-Osler-Weber bezeichnet wird [McAllister et al., 1994]. Betroffene Patienten sind heterozygot, wohingegen homozygote Mutationen letal verlaufen. Die weltweite Inzidenz der Krankheit beträgt 1:8000, die Mortalitätsrate liegt bei circa 10%. Frauen und Männer sind gleichermaßen betroffen. In mehr als 90% der Fälle stellt die rezidivierende Epistaxis das klinische Erstsymptom dar. Neben der Nase sind v.a. die Haut, die Lunge, das Hirn, die Leber, sowie der Gastrointestinaltrakt von auftretenden Blutungen und arterio-venösen Malformationen betroffen.

Zusätzlich ist eine zweite Form der Erbkrankheit beschrieben, die hereditäre hämorrhagische Teleangiektasie Typ2, welche durch eine Mutation des Endoglin-assoziierten TGF- $\beta$  Rezeptors ALK1 charakterisiert ist und zur Ausbildung des gleichen Krankheitsbildes führt [Sadick et al., 2006].

Aktuell wird der Einsatz von Bevacizumab zur Behandlung von Patienten mit der Erkrankung erprobt. Der Antikörper führt dabei intravenös oder auch in Kombination mit einer intranasalen Applikation zur deutlichen Verbesserung der Symptomatik, v.a. bezogen auf die schwere, immer wiederkehrende Epistaxis [Brinkerhoff et al., 2012; Lupu et al., 2013].

### 1.6.5 Endoglin-abhängige Krebsprognose

**Lösliche Variante von Endoglin** Ein weiterer Mitspieler in der Endoglin-abhängigen Regulierung der Angiogenese scheint die im Blut zirkulierende Variante des Proteins zu sein. Dieses lösliche Endoglin (*engl. soluble*, sENG) wurde bereits 1994 erstmals beschrieben [Wang et al., 1994b]. Durch proteolytische Abspaltung des membran-gebunden Endoglins durch die Matrix-Metalloproteinase MMP-14 steigt die Serumkonzentration von sENG an [Hawinkels et al., 2010].

Da das zirkulierende Endoglin Bindestellen für unterschiedlichste Liganden der TGF- $\beta$ -Superfamilie besitzt, wird vermutet, dass es als eine Art Scavenger für zirkulierende Liganden fungiert. Diese Neutralisierung verhindert die Liganden-Rezeptor-Interaktion und reguliert bzw. inhibiert somit die Angiogenese. Diese Regulierung scheint von der Co-Expression des membran-gebundenen Endoglins, sowie der Matrix-Metalloproteinase MMP-14 abhängig zu sein. Durch proteolytische Abspaltung sinkt die Endoglinexpression auf den Endothelzellen, wohingegen die Konzentration der anti-angiogenetischen, löslichen Variante ansteigt. Dieser Ablauf bringt das Endothel wieder in den Ruhezustand [Hawinkels et al., 2010].

Es ist bekannt, dass die Konzentration der löslichen Endoglin-Variante im Blut deutlich mit der Pathogenese verschiedener vaskulärer Erkrankungen verknüpft ist. Neben der Sklerodermie und Präeklampsie wurde zirkulierendes Endoglin auch in Seren von Krebspatienten signifikant erhöht nachgewiesen [Wipff et al., 2008; Venkatesha et al., 2006]. Dieser Anstieg korreliert mit schlechter Prognose, sowie erhöhtem Metastasierisiko in Patienten mit Prostata-, Mamma- [Li et al., 2000; Furstenberger et al., 2006] und Colonkarzinom [Mysliwiec et al., 2008; Takahashi et al., 2001b]. Dabei waren die Serumkonzentrationen bei Metastase-positiven Krebserkrankungen nochmals deutlich erhöht, im Vergleich zu den Seren Metastase-freier Patienten. Weiterhin konnte durch eine chemotherapeutische Behandlung eine suppressive Wirkung auf die Menge an zirkulierendem Endoglin nachgewiesen werden. Als Richtwerte wurden in gesunden Spendern Serumkonzentrationen löslichen Endoglins von  $41,0 \pm 15,0$  ng/mL und in Krebspatienten von  $51,4 \pm 59,7$  ng/mL detektiert [Takahashi et al., 2001b].

Erhöhte Konzentrationen des zirkulierenden Endoglins wurden ebenfalls in Leukämiepatienten festgestellt [Calabro et al., 2003], allerdings konnte eine entsprechende Korrelation für Patienten mit Gastrointestinal- [Mysliwiec et al., 2009], Ösophageal- [Bellone et al., 2007] und Ovarialkarzinom [Odegaard et al., 2008] nicht bestätigt werden.

Insgesamt sind die Abhängigkeiten zwischen zirkulierendem Endoglin, Tumorstadium, verstärktem Metastasierungsrisiko und einer schlechten Prognose jedoch noch nicht ausreichend verstanden.

**Membran-gebundene Variante von Endoglin** Eine weitere Möglichkeit zur Beurteilung der Tumorstadium und des Metastasierungsrisikos erfolgt über die Dichte der Kapillargefäße (*engl. microvessel density*, MVD). Die Untersuchung der Kapillardichte zur Quantifizierung Tumor-versorgender Gefäße wird bereits seit 1991 durchgeführt [Weidner et al., 1991]. Unter Verwendung pan-endothelialer

Marker, wie CD31, CD34 und von Willebrand's Faktor ist dies eine gängige Methode zur Beurteilung der Tumorentwicklung geworden [Srivastava et al., 1988; Weidner et al., 1991; Weidner et al., 1992; Tanigawa et al., 1997]. In verschiedenen Studien konnte Endoglin, im Vergleich zu den vorher genannten, als spezifischerer und sensitiverer Marker für die Neoangiogenese bzw. Tumorprogression beschrieben werden. Im Gegensatz zu den herkömmlichen pan-endothelialen Markern wird Endoglin hauptsächlich auf proliferierendem, aktiviertem Endothel exprimiert [Wang et al., 1994a; Tanaka et al., 2001; Charpin et al., 2004]. Aus diesem Grund wird Endoglin heute häufig als spezifischer Angiogenese-Marker aufgefasst.

Die beschriebenen Daten zur membran-gebundenen oder zirkulierenden Variante von Endoglin, verdeutlichen die Relevanz des Proteins für die Tumorangiogenese und bestätigen somit die Wahl dieses Zielantigens für eine potentielle anti-vaskuläre Tumorthherapie.

### 1.6.6 $\alpha$ Endoglin-Antikörper im Tiermodell

Die Inhibierung der Angiogenese und somit Unterdrückung des Tumorwachstums durch  $\alpha$ Endoglin-Antikörper *in vivo*, konnte bereits in zahlreichen Studien bestätigt werden.

Dieser Effekt wurde einerseits in immunkompetenten Mäusen, sowie in verschiedenen SCID-Mausmodellen (*engl. severe combined immunodeficiency*, SCID) unter Verwendung des mit Maus-Endoglin kreuzreaktivem Klon SN6j gezeigt. Dabei wurde der Antikörper unkonjugiert, sowie an Toxin- oder Radioisotop-gekoppelt eingesetzt [Seon et al., 1997; Tabata et al., 1999; Matsuno et al., 1999; Takahashi et al., 2001a; Tsujie et al., 2006; Tsujie et al., 2008; Uneda et al., 2009].

Neben diversen Maus-Studien wurde die Immunogenität, Pharmakokinetik und Toxizität eines chimären  $\alpha$ Endoglin-Antikörpers ( $\chi$ SN6j) in Cynomolgus-Affen (*Macaca fascicularis*) untersucht. Dabei konnten Antikörperkonzentrationen von bis zu 10 mg/kg ohne signifikante Nebenwirkungen appliziert werden [Shiozaki et al., 2006].

### 1.6.7 $\alpha$ Endoglin-Antikörper in klinischen Studien

Der Klon  $\chi$ SN6j ist ein chimärer, nicht-optimierter  $\alpha$ Endoglin-Antikörper aus dem Labor von Ben K. Seon (Roswell Park Cancer Institute, New York, USA). Dieser wird zur Zeit unter dem Namen TRC105 von der Firma TRACON Pharmaceuticals (San Diego, USA) in verschiedenen klinischen Studien getestet.

Die erste klinische Phase I-Studie (NCT00582985) wurde bereits mit vielversprechenden Ergebnissen abgeschlossen. Insgesamt wurden 50 Patienten mit fortgeschrittenen und/oder metastasierenden Tumorerkrankungen (v.a. Colon-, Prostata-, Nieren- und Lungenkarzinom) mit ansteigenden Konzentrationen von TRC105 behandelt. Die maximale Verträglichkeit wurde mit 10 mg/kg wöchentlich erreicht. Neben den erwarteten Nebenwirkungen wie Anämie, Teleangiektasien, sowie Entzündungsreaktionen an der Einstichstelle, traten keine schwerwiegenden, lebensbedrohlichen Blutungen auf. Bei 47% der behandelten Patienten, konnte mindestens ein stabiler Verlauf nachgewiesen werden [Rosen et al., 2012].

Zur Zeit wird TRC105 in zwölf weiteren klinischen Studien zur Behandlung von Patienten mit Glioblastom, Nierenzell-, Prostata-, Blasen-, Ovarial- und Leberkarzinom getestet. Dabei wird der Antikörper als Monotherapeutikum oder in Kombination mit einem Chemotherapeutikum, sowie mit den VEGF-Inhibitoren Bevacizumab, Axitinib und Sorafenib eingesetzt.

**Endoglin als Zielantigen zur potentiellen anti-vaskulären Tumorthera-**  
**pie** Endoglin gilt derzeit als spezifischster Marker der Tumorangio-  
genese. Zusammenfassend identifizieren die in der Literatur beschriebene starke Überexpression auf Endothelzellen verschiedener solider Tumoren im Vergleich zu normalen Blutgefäßen, sowie ein deutlicher Antikörper-vermittelter anti-Tumor-Effekt in verschiedenen Mausmodellen dieses Membranproteins als potentielles vaskuläres Zielantigen. Die gute Verträglichkeit und erste therapeutische Effekte des chimären  $\alpha$ Endoglin-Antikörpers TRC105 in Cynomolgus-Affen und klinischen Studien unterstützen diese Auffassung.

## 1.7 Ziel der Arbeit

Ziel dieser Arbeit war die Generierung und Optimierung neuer Antikörper zur verbesserten, direkten anti-angiogenetischen Tumorthera-  
pie. Die gezielte, effektive Lyse der Blutgefäße des Tumors, sowie die damit verbundene Öffnung der Endothelzellschicht und Einwanderung körpereigener Immunzellen, sollten dabei einerseits zum Zusammenbruch der Tumorversorgung und zusätzlich zur Induktion einer spezifischen Immunantwort gegen die malignen Zellen führen.

Die initiale Charakterisierung des vielversprechenden Zielantigens Endoglin bezüglich Expression und Spezifität war für einen solchen verbesserten, direkten Therapieansatz von zentraler Bedeutung. Anschließend sollte mittels Hybridomtechnologie eine Auswahl an Tumorendothel-spezifischen Antikörpern generiert werden. Nach Abschätzung kritischer, potentiell den Therapieerfolg beeinflussender Parameter, wie v.a. der Tumorendothelspezifität, aber auch weiterer Antigen-spezifischer Untersuchungen, sollten die viel versprechendsten Kandidaten zur besseren Interaktion mit dem humanen Immunsystem chimärisiert und zusätzlich SDIEM-modifiziert werden. Durch diese Optimierung des Fc-Teils sollte eine gesteigerte Antikörper-vermittelte zelluläre Zytotoxizität erreicht werden, welche die Effizienz des angestrebten verbesserten, weil direkten, anti-vaskulären Therapieansatz zusätzlich steigern könnte.

Zusätzlich sollten im Rahmen dieser Arbeit weitere membranständige Zielantigene zur potentiellen anti-angiogenetischen Tumorthera-  
pie identifiziert werden, wobei ein besonderes Augenmerk auf die Tumorendothelspezifität gelegt werden sollte.

# Kapitel 2

## Material und Methoden

### Inhaltsangabe

---

<b>2.1</b>	<b>Material</b>	<b>31</b>
2.1.1	Geräte	31
2.1.2	Glas- und Plastikwaren	32
2.1.3	Chemikalien und Reagenzien	33
2.1.4	Zellkulturmedien und -zusätze	35
2.1.5	Enzyme	36
2.1.6	Größenmarker für die Gelelektrophorese	36
2.1.7	Gebrauchsfertige Lösungen und Kits	36
2.1.8	Puffer- und Medienzusammensetzung	37
2.1.9	Bakterienstämme	40
2.1.10	Mausstämme	40
2.1.11	Gewebe	40
2.1.12	Zelllinien, Transfektanten und Hybridome	40
2.1.13	Oligonukleotide	42
2.1.14	Antikörper	43
2.1.15	Plasmide	47
2.1.16	Software	47
<b>2.2</b>	<b>Zellbiologische Methoden</b>	<b>48</b>
2.2.1	Passagieren von Zellen	48
2.2.2	Bestimmung der Lebend-Zellzahl	48
2.2.3	Kryokonservierung von Zellen	48
2.2.4	Stabile Transfektion von eukaryotischen Zellen	48
2.2.5	Subklonierung	49
2.2.6	Isolierung von peripheren mononukleären Zellen des Blutes	49
2.2.7	Gewinnung von humanem Serum aus Vollblut	50
<b>2.3</b>	<b>Generierung monoklonaler Antikörper</b>	<b>50</b>

---

2.3.1	Immunisierung von Mäusen . . . . .	50
2.3.2	Chemische Zellfusion und Selektion . . . . .	50
2.3.3	Kultivierung von Antikörper-produzierenden Zellen . . . . .	51
2.3.4	Reinigung monoklonaler und rekombinanter Antikörper mittels Affinitätschromatographie an Protein A . . . . .	52
2.3.5	Dialyse proteinhaltiger Lösungen . . . . .	52
2.3.6	Konzentrationsbestimmung von Antikörperlösungen . . . . .	52
<b>2.4</b>	<b>Molekularbiologische Methoden . . . . .</b>	<b>52</b>
2.4.1	Isolierung von Nukleinsäuren . . . . .	52
2.4.2	cDNA-Synthese . . . . .	53
2.4.3	Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) . . . . .	53
2.4.4	Ligation von DNA-Enden . . . . .	54
2.4.5	Gelelektrophoretische Auftrennung von DNA-Fragmenten	55
2.4.6	Elution von DNA aus Agarosegelen . . . . .	55
2.4.7	Herstellung chemisch-kompetenter Bakterien . . . . .	56
2.4.8	Transformation . . . . .	56
2.4.9	Animpfen von Klonen und Anlegen von Bakterienkulturen	57
2.4.10	Präparation von Plasmid-DNA . . . . .	57
2.4.11	Verdau mit Restriktionsendonukleasen . . . . .	57
2.4.12	Reinigung von Nukleinsäuren durch Phenolextraktion . . . . .	58
2.4.13	Klonierung von Antigen-exprimierenden Zelllinien . . . . .	58
2.4.14	Sequenzierung . . . . .	59
<b>2.5</b>	<b>Analytische Methoden . . . . .</b>	<b>59</b>
2.5.1	Immunhistochemische Färbung von Kryoschnitten . . . . .	59
2.5.1.1	Anfertigung von Kryoschnitten . . . . .	59
2.5.1.2	Färbung der Kryoschnitte . . . . .	59
2.5.2	Durchflusszytometrie . . . . .	60
2.5.3	Bindung an lösliches Endoglin . . . . .	61
2.5.4	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese . . . . .	62
2.5.5	PNGase F-Verdau zur Identifizierung von posttranslationalen Glykosylierungen . . . . .	62
2.5.6	Analytische Gelfiltration . . . . .	63
2.5.7	Bestimmung der ADCC bzw. CDC mittels <sup>51</sup> Cr-Freisetzungstest . . . . .	63
2.5.8	Bestimmung der ADCC mittels Impedanzmessung . . . . .	64

---

## 2.1 Material

### 2.1.1 Geräte

GERÄT	BEZUGSQUELLE
Autoklav Sauter	SteriTech, Nussloch
ÄKTApurifier	GE Healthcare, München
Brutschrank CB210	Binder, Tuttlingen
Brutschrank Heraeus B6200	Thermo Electron, Waltham, USA
Durchlicht-Mikroskop Axiovert 25	Zeiss, Jena
Einkanal Durchfluss-UV-Monitor UV-1	GE Healthcare, München
Electrophoresis Power	GE Healthcare, München
Supply EPS600, EPS3500	
Elektroporationsgerät Gene Pulser II	BioRad, München
ELISA-Plattenlesegerät Spectra Max 340	Molecular Devices, München
Fluoreszenzmikroskop Axioplan 2	Zeiss, Jena
Heizrührer MR 2002	Heidolph Instruments, Schwabach
Kryostat CM3000	Leica Microsystems, Wetzlar
Kühl-/Gefrierschrank	Liebherr, Ochsenhausen
Mehrkanalpipette Discovery, 12-Kanal	Abimed, Langenfeld
Mehrkanalpipette Finnpipette, 8-Kanal	VWR, Darmstadt
Multipette Plus	Eppendorf, Hamburg
Nanodrop 1000 Spectrophotometer	Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen
Peristaltikpumpe P-1	GE Healthcare, München
pH-Messgerät SevenMulti	Mettler Todelo, Gießen
pH-Messgerät WTW pH523	WTW, Weilheim
Photometer Ultrospec 3000	GE Healthcare, München
Pipettensatz Discovery	Abimed, Langenfeld
Pipettierhilfe Pipetboy acu	Integra Biosciences, Chur, CH
Schüttler Multitron	Infors, Bottmingen, CH
Sterilbank NSF49	CleanAir, Lausanne, CH
Sterilbank Tecnoflow	Integra Biosciences, Chur, CH
Szintillationsmessgerät MicroBeta Counter 1450 Plus	Perkin Elmer, Rodgau
Thermocycler PTC-100 und PTC-200	MJ-Research, St. Bruno, CDN
Trockenschrank Heraeus ET	Thermo Electron, Waltham, USA
UV-Tisch FLX-20M	Vilber Lourmat, Eberhardzell
Vakuumpumpe	Vacuubrand, Wertheim
VortexMixer	Neolab, Heidelberg
Waagen (Fein- und Tischwaage)	Sartorius, Göttingen
Wasserbad Typ304R	Köttermann Laborat., Hönigsen
Wippe Duomax 1030	Heidolph Instruments, Schwabach
xCELLigence RTCA SP	Roche, Mannheim

## 2.1. MATERIAL

---

GERÄT	BEZUGSQUELLE
Zell-Harvester ICH-110-96	Inotech, Dottikon, CH
Zell-Inkubator Heraeus B6200	Thermo Electron, Waltham, USA
ZENTRIFUGEN:	
Centrifuge 5417C	Eppendorf, Hamburg
Heraeus Megafuge 1.0 und 1.0R	Thermo Electron, Waltham, USA
Sorvall RC 5C Plus	Thermo Electron, Waltham, USA

### 2.1.2 Glas- und Plastikwaren

WARE	BEZUGSQUELLE
Bechergläser, Glas	Schott, Mainz
Bechergläser, Plastik	Vitlab, Großostheim
Bottle-top Filter (0,22 $\mu\text{m}$ Porengröße)	Millipore, Schwalbach
Cellophan-Folie Saran	Roth, Karlsruhe
Combitips	Eppendorf, Hamburg
Dako-Pen	Dako, Hamburg
Deckgläser 24 x 50 mm	R.Langenbrinck, Teningen
Dialysierschläuche Visking	Roth, Karlsruhe
Einmalpipetten Plastik	Becton-Dickinson,
1 mL, 2 mL, 5 mL, 10 mL, 25 mL	Heidelberg
Einmalpipetten Plastik 50 mL	Corning, Kaiserslautern
Einmalspritzen Plastik	Becton-Dickinson,
	Heidelberg
Elektroporationsküvetten 4mm	Peqlab, Erlangen
E-Plate 96 für xCELLigence RTCA SP	Roche, Mannheim
Erlenmeyerkolben Simax 500 mL, 1 L	Bohemia Crystal, Selb
FACS-Röhrchen 0,5 mL	Sarstedt, Nümbrecht
FACS-Röhrchen 5 mL	Becton-Dickinson,
	Heidelberg
Feststoffszintillationsplatte	Packard BioScience, Dreieich
Feuchte Kammer	Roth, Karlsruhe
Filtermatten Melti Lex A	Perkin Elmer, Rodgau
Finntips 50-1500 $\mu\text{L}$	VWR, Darmstadt
Glasflaschen 250 mL, 500 mL, 1 L, 2 L	Schott, Mainz
Isopropanolkühler	Thermo Scientific,
	Langenselbold
Kryoröhrchen 2 mL	Greiner Bio-One,
	Frickenhausen
Kryobox	Merck, Darmstadt
Maxisorb 96 well ELISA Platte	Thermo Scientific,
	Langenselbold
Messzylinder Plastik: 100 mL,	Vitlab, Großostheim
250 mL, 500 mL, 1 L, 2 L	

WARE	BEZUGSQUELLE
Mikroplatte 96-well round bottom, non-sterile	Corning, Kaiserslautern
Mikroplatte lid, non-sterile	Corning, Kaiserslautern
Neubauer Zell-Zählkammer	Brand, Wertheim
Nylonsieb, 70 $\mu\text{m}$	Becton-Dickinson, Heidelberg
Objektträger SuperFrost <sup>®</sup> Plus	R.Langenbrinck, Teningen
Pasteurpipetten, long size	WU, Mainz
PCR-softtubes 0,5 mL	Biozym, Oldendorf
Petrischalen 35 mm	Greiner Bio-One, Frickenhausen
Pinsel	Roth, Karlsruhe
Pipettenspitzen 10 $\mu\text{L}$	Biozym, Oldendorf
Pipettenspitzen 20 $\mu\text{L}$ , 200 $\mu\text{L}$ , 1000 $\mu\text{L}$	Greiner Bio-One, Frickenhausen
Pipettenspitzen, gestopft: 10 $\mu\text{L}$ , 20 $\mu\text{L}$ , 100 $\mu\text{L}$ , 200 $\mu\text{L}$ , 1000 $\mu\text{L}$	Biozym, Oldendorf
Pipettenspitzen Finntip Multistepper	VWR, Darmstadt
PP-Röhrchen 50 mL	Greiner Bio-One, Frickenhausen
PS-Röhrchen Falcon 15 mL	Becton-Dickinson, Heidelberg
Präzisions-Küvette Suprasil halbmikro	Hellma, Basel, CH
Reaktionsgefäße 0,5 mL, 1,5 mL, 2 mL	Eppendorf, Hamburg
Skalpell	Braun, Tuttlingen
Spritzen Sub-Q 1 mL	Becton-Dickinson, Heidelberg
Spritzenfilter Millex-GV, Millex-GP 0,22 $\mu\text{m}$	Millipore, Schwalbach
Zellkulturflaschen 50 mL, 250 mL, 550 mL	Greiner Bio-One, Frickenhausen
Zellkulturflasche triple flask	Nunc, Wiesbaden
Zellkulturplatte 6-well flat bottom	Becton-Dickinson, Heidelberg
Zellkulturplatte 12-well	Corning, Kaiserslautern
Zellkulturplatten 24-well, 48-well	Greiner Bio-One, Frickenhausen
Zellkulturplatten 96-well flat/round bottom	Greiner Bio-One, Frickenhausen
Zentrifugenbecher 500 mL	Nalgene, Hereford, UK

### 2.1.3 Chemikalien und Reagenzien

REAGENZ	BEZUGSQUELLE
Aceton	Merck, Darmstadt

## 2.1. MATERIAL

---

REAGENZ	BEZUGSQUELLE
Agarose	Lonza, Basel, CH
Ampicillin	Roth, Karlsruhe
Ampuwa <sup>®</sup> -Wasser	Fresenius Kabi, Bad Homburg
Antibody Diluent	Zytomed Systems, Berlin
Bacto-Agar	Becton-Dickinson, Heidelberg
Bacto-Hefeextrakt	Becton-Dickinson, Heidelberg
Bacto-Trypton	Becton-Dickinson, Heidelberg
$\beta$ -Mercaptoethanol 14,3 M	Roth, Karlsruhe
BSA (Fraktion V)	Roth, Karlsruhe
Bromphenolblau	Serva, Heidelberg
Chloramphenicol	Sigma, Steinheim
Chloroform	Merck, Darmstadt
DAB (3,3'-Diaminobenzidin)	Zytomed Systems, Berlin
Desoxyribonucleotid-Triphosphate (dNTPs)	Peqlab, Erlangen
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Merck, Darmstadt
Dithiothreitol (DTT)	Sigma, Steinheim
Dulbecco's Phosphate buffered saline (DPBS)	Lonza, Basel, CH
Entellan <sup>®</sup> Neu	Merck, Darmstadt
Essigsäure	Merck, Darmstadt
Ethanol, vergällt (96%)	Merck, Darmstadt
Ethanol, zur Analyse (100%)	Merck, Darmstadt
Ethidiumbromid (EtBr)	Roth, Karlsruhe
Ethylen-Diamin-Tetraacetat (EDTA)	Sigma, Steinheim
FACS-Clean, FACS-Flow, FACS-Rinse	Becton-Dickinson, Heidelberg
Formaldehyd	Sigma, Steinheim
Glucose	Sigma, Steinheim
Glycerin	Roth, Karlsruhe
Glycin	Sigma, Steinheim
Hämatoxylinlösung nach Gill II	Roth, Karlsruhe
Isoamylalkohol	Fluka, Buchs
Isopropanol	Merck, Darmstadt
Kanamycin	Roth, Karlsruhe
Lymphocyte Separation Medium LSM 1077	PAA Laboratories, Pasching, A
Magnesiumchlorid	Merck, Darmstadt
Methanol	Merck, Darmstadt
Mineralöl	Sigma, Steinheim
Natriumacetat	Serva, Heidelberg
Natriumacetat (wasserfrei)	Merck, Darmstadt

REAGENZ	BEZUGSQUELLE
Natriumazid	Merck, Darmstadt
Natriumchlorid	Merck, Darmstadt
Natriumchromat ( $^{51}\text{Cr}$ , 5 mCi/mL)	Hartmann Analytic, Braunschweig
Orange G	Sigma, Steinheim
Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25:24:1)	Roth, Karlsruhe
Propidiumiodid (PI)	Sigma, Steinheim
Rekombinantes Protein A, Agarose-immobilisiert, Sepharose Fast Flow	GE Healthcare, München
RNase Zap	Ambion, Darmstadt
TissueTek <sup>®</sup> , Gefriereinbettmedium	Leica Microsystems, Wetzlar
Triton X-100	Sigma, Steinheim
Trizma Base (Tris-Base)	Sigma, Steinheim
Trizma Hydrochlorid (Tris-HCl)	Sigma, Steinheim
Trypanblau 0,4%	Sigma, Steinheim
Tween 20	Sigma, Steinheim
Türk'sche Lösung	Sigma, Steinheim
Wasserstoffperoxid ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ), 30%	Roth, Karlsruhe
Xylol	Roth, Karlsruhe

#### 2.1.4 Zellkulturmedien und -zusätze

REAGENZ	BEZUGSQUELLE
8-Azaguanine	Sigma, Steinheim
CDM4PERMab (chemisch definiert)	Thermo Scientific HyClone, South Logan, USA
Endothelial Cell Growth Medium 2 FCS (fötale Kälberserum)	Promo Cell, Heidelberg PAA Laboratories, Pasching, A
Genitacin-Sulfat (G418)	Biochrom, Berlin
HAT (Hypoxanthin/Aminopterin/Thymidin)	Sigma, Steinheim
HT (Hypoxanthin/Thymidin)	Sigma, Steinheim
Hybridoma Cloning Supplement (HCS)	PAA Laboratories, Pasching, A
Hygromycin B	Roche, Mannheim
IMDM mit 25 mM HEPES und L-Glutamin	Lonza, Basel, CH
MEM-NEAA, non-essential amino acids	PAA Laboratories, Pasching, A
Natriumpyruvat	PAA Laboratories, Pasching, A
Penicillin/Streptomycin	PAA Laboratories, Pasching, A
Polyethylene glycol 1500 (PEG1500)	Roche, Mannheim

## 2.1. MATERIAL

---

REAGENZ	BEZUGSQUELLE
RPMI-1640 mit 25 mM HEPES und L-Glutamin	Lonza, Basel, CH

### 2.1.5 Enzyme

ENZYM	BEZUGSQUELLE
PNGase F	New England Biolabs, Frankfurt
Restriktionsenzyme, diverse	New England Biolabs, Frankfurt
T4-DNA-Ligase	Roche, Mannheim
T4-DNA-Ligase	Fermentas, St. Leon-Rot

### 2.1.6 Größenmarker für die Gelelektrophorese

GRÖSSENMARKER	BEZUGSQUELLE
1 kb und 100 bp Marker	New England Biolabs, Frankfurt
Marker SeeBlue <sup>®</sup> Pre-Stained	Invitrogen, Darmstadt

### 2.1.7 Gebrauchsfertige Lösungen und Kits

KIT	BEZUGSQUELLE
Dako Pen	Dako, Glostrup, DK
EndoFree <sup>®</sup> Plasmid Maxi Kit	Qiagen, Hilden
Fertiggel für SDS-PAGE: Mini-PROTEAN <sup>®</sup>	Biorad, München
TGX <sup>™</sup> precast gel, Any kD <sup>™</sup>	
Flow cytometry compensation beads	Invitrogen, Darmstadt
Iso-Gold <sup>™</sup> Rapid Mouse	BioAssay Works, Ijamsville, USA
Monoclonal Isotyping Kit	Biorad, München
Laemmli Sample Buffer	Biorad, München
Tris/Glycin/SDS Buffer	Biorad, München
LongRange 2Step RT-PCR	Qiagen, Hilden
Lynx Rapid RPE Antibody Conjugation Kit	AbD Serotec, Düsseldorf
OneTaq <sup>™</sup> DNA Polymerase	New England Biolabs, Frankfurt
pGEM <sup>®</sup> -T Easy Vector System	Promega, Mannheim
pPCR-Script <sup>™</sup> Amp Cloning Kit	Stratagene, Heidelberg
QIAGEN <sup>®</sup> LongRange 2Step RT-PCR Kit	Qiagen, Hilden
QIAGEN <sup>®</sup> Plasmid Maxi Kit	Qiagen, Hilden
QIAprep <sup>®</sup> Spin Miniprep Kit	Qiagen, Hilden

KIT	BEZUGSQUELLE
QIAquick <sup>®</sup> Gel Extraction Kit	Qiagen, Hilden
Qifikit	Dako, Glostrup, DK
RNasin <sup>®</sup> Ribonuclease Inhibitor	Promega, Mannheim
RNeasy <sup>®</sup> Mini Kit	Qiagen, Hilden
Taq Polymerase with Buffer-E	Genaxxon Bioscience, Ulm
TMB Microwell Peroxidase	KPL, Gaithersburg, USA
Substrate System	
Vent <sup>®</sup> DNA Polymerase	New England Biolabs, Frankfurt
ZytoChemPlus	Zytomed Systems, Berlin
anti-mouse/rabbit (HRP-) Polymer	

### 2.1.8 Puffer- und Medienzusammensetzung

#### Molekularbiologie

dNTP-Stocklösung [je 10 mM]	dATP, dCTP, dGTP, dTTP in H <sub>2</sub> O (bidest.)
DNA-Ladepuffer Bromphenolblau (6x)	30% Glycerin 0,25% Bromphenolblau (BPB) 10 mM Tris-Base 1 mM EDTA in H <sub>2</sub> O (bidest.), pH 7,6
Orange G-Lösung (10x)	36 mg/mL Orange G in H <sub>2</sub> O (bidest.)
DNA-Ladepuffer Orange G (6x)	10% DNA-Ladepuffer Orange G (10x) 30% Glycerol 60% TAE (1x)
EtBr- Stocklösung [10 mg/mL]	EtBr in H <sub>2</sub> O (bidest.)
LB-Medium	10 g Bacto-Trypton 5 g Bacto-Hefeextrakt 5 g NaCl ad 1 L H <sub>2</sub> O (bidest.)
LB-Amp-Platten/ LB-Kanamycin-Platten/ LB-Chloramphenicol-Platten	1 L LB-Medium 15 g Bacto-Agar 100 µg/mL Ampicillin bzw. 50 µg/mL Kanamycin bzw. 34 µg/mL Chloramphenicol
SOBAG-Platten	1 L LB-Medium

## 2.1. MATERIAL

---

	15 g Bacto-Agar 56 mL 2 M Glucoselösung 10 mL 1 M MgCl <sub>2</sub> -Lösung 100 µg/µL Ampicillin
Natriumacetat-Lösung [3 M]	Natriumacetat in H <sub>2</sub> O (bidest.), pH 5,2
RLN-Puffer	50 mM Tris-HCl pH8, RNase-frei 140 mM NaCl, RNase-frei 1,5 mM MgCl <sub>2</sub> , RNase-frei 0,5% Nonident P40, RNase-frei 1000 U/mL RNasin 1 mM Dithiothreitol
TAE-Puffer (50x)	2 M Tris-Base 1 M Essigsäure 50 mM EDTA in H <sub>2</sub> O (bidest.), pH 8,5
TE-Puffer	10 mM Tris-Base 1 mM EDTA in H <sub>2</sub> O (bidest.)
Tfb I	30 mM Kaliumacetat 50 mM MnCl <sub>2</sub> 100 mM KCl 10 mM CaCl <sub>2</sub> 15% w/v Glycerol pH 5,8 (mit 0,2 M Essigsäure einstellen) sterilfiltriert
Tfb II	10 mM MOPS, pH 7 75 mM CaCl <sub>2</sub> 10 mM KCl 15% w/v Glycerol sterilfiltriert
<b>Zellbiologie</b>	
Einfrüermedium	90% FCS (bei 56°C für 30 min hitzeinaktiviert) 10% DMSO

IMDM- bzw. RPMI-1640-Vollmedium	IMDM bzw. RPMI-1640 10% FCS (hitzeinaktiviert) 100 U/mL Penicillin 100 µg/mL Streptomycin 1% Natriumpyruvat 1% MEM-NEAA 50 µM β-Mercaptoethanol
CDM4PERMab-Vollmedium	CDM4PERMab 4 mM L-Glutamin 100 U/mL Penicillin 100 µg/mL Streptomycin
Trypanblau	0,1% Trypanblau in DPBS

### Chromatographische Verfahren

DPBS-Azid	0,01% Natriumazid in DPBS
0,05 M Citrat (+ 0,15 M NaCl)-Puffer, pH 2,4; pH 4,2	0,025 M Tri-Natriumcitrat-dihydrat 0,025 M Citronensäure (wasserfrei) 0,15 M Natriumchlorid in H <sub>2</sub> O (bidest.) sterilfiltriert
0,1 M Phosphatpuffer, pH 8	0,07 M di-Natriumhydrogenphosphat 0,03 M Natriumdihydrogenphosphat in H <sub>2</sub> O (bidest.) sterilfiltriert
1 M Tris-Puffer, pH9	1 M Trizma-Base in H <sub>2</sub> O (bidest.) sterilfiltriert

### SDS-PAGE

Coomassie Blue-Lösung	2,5 g Coomassie Brilliant Blue R-250 450 mL Methanol 100 mL Essigsäure auf 1 L mit H <sub>2</sub> O (bidest.)
Entfärbelösung	450 mL Methanol 100 mL Essigsäure auf 1 L mit H <sub>2</sub> O (bidest.)

### 2.1.9 Bakterienstämme

*E. coli* DH5 $\alpha$ , MBI Fermentas, St. Leon Rot

Genotyp: F<sup>-</sup>( $\Phi$ 80d $\Delta$ (lacZ)M15)recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17(r <sub>$\kappa$</sub> <sup>-</sup>m <sub>$\kappa$</sub> <sup>+</sup> supE44 relA1 deoR  $\Delta$ (lacZYA-argF)U169

### 2.1.10 Mausstämme

MAUSSTAMM	GESCHLECHT UND ALTER	BEZUGSQUELLE
BALB/c	weiblich, 6-8 Wochen	Charles River, Wilmington, USA
NZB/W F1	weiblich, 10-12 Wochen	Charles River, Wilmington, USA

### 2.1.11 Gewebe

GEWEBE	BEZUGSQUELLE
humane Kryoschnitte von 14 verschiedenen Tumoren und entsprechenden Normalgeweben auf einem Objektträger ( <i>engl. human frozen tissue array</i> )	Capital Biosciences, Rockville, USA; BioChain, San Francisco, USA; Biocat, Heidelberg
Kryoschnitte: Pankreas (benigne und maligne)	Biocat, Heidelberg
Nierenzellkarzinom ( <i>engl. renal cell carcinoma, RCC</i> ) mit entsprechendem benignem Gewebe	Urologie, Universitätsklinikum Tübingen (Projektnummer des Ethikantrags: 446/2008BO2)
Kryoschnitte: normales Nierengewebe (IC-26)	Capital Biosciences, Rockville, USA

### 2.1.12 Zelllinien, Transfektanten und Hybridome

ZELLINIE	BESCHREIBUNG	BEZUGSQUELLE
CHO	<i>chinese hamster ovary</i> , 14-CHO-S	Celonic, Jülich
NALM-16	humane prä-B-Zell-ALL	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ), Braunschweig
Sp2/0-Ag14	murine Myelomzelllinie	American Tissue Culture Collection (ATCC), Manassas, USA
HUVEC	<i>human umbilical vein endothelial cells</i>	PromoCell, Heidelberg
B16	Maus-Myelomzelllinie, mENG <sup>+</sup>	Judy Johnson, München

TRANSFEKTANTE	BEZUGSQUELLE
FZD1 <sup>+</sup> -HEK293	Dr. Hans-Jörg Bühring, Tübingen
FZD2 <sup>+</sup> -HEK293	Dr. Hans-Jörg Bühring, Tübingen
FZD4 <sup>+</sup> -HEK293	Dr. Hans-Jörg Bühring, Tübingen
FZD5 <sup>+</sup> -HEK293	Dr. Hans-Jörg Bühring, Tübingen
FZD6 <sup>+</sup> -HEK293	Dr. Hans-Jörg Bühring, Tübingen
FZD7 <sup>+</sup> -HEK293	Dr. Hans-Jörg Bühring, Tübingen
FZD9 <sup>+</sup> -HEK293	Dr. Hans-Jörg Bühring, Tübingen
FZD10 <sup>+</sup> -HEK293	Dr. Hans-Jörg Bühring, Tübingen
FZD9 <sup>+</sup> -CHO	aus dieser Arbeit
FZD9 <sup>+</sup> -Sp2/0-Ag14	aus dieser Arbeit
ENG <sup>+</sup> -Sp2/0-Ag14	aus dieser Arbeit

HYBRIDOM	BESCHREIBUNG	BEZUGSQUELLE
mK-ro2	$\alpha$ Endoglin-Antikörper, mIg $\gamma$ 1	aus dieser Arbeit
mK-ro4	$\alpha$ Endoglin-Antikörper, mIg $\mu$	aus dieser Arbeit
mK-ro5	$\alpha$ Endoglin-Antikörper, mIg $\mu$	aus dieser Arbeit
mK-ro6	$\alpha$ Endoglin-Antikörper, mIg $\mu$	aus dieser Arbeit
mK-ro7	$\alpha$ Endoglin-Antikörper, mIg $\mu$	aus dieser Arbeit
mK-ro8	$\alpha$ Endoglin-Antikörper, mIg $\gamma$ 1/ <i>kappa</i>	aus dieser Arbeit
mK-ro9	$\alpha$ Endoglin-Antikörper, mIg $\gamma$ 2a	aus dieser Arbeit
mK-ro10	$\alpha$ Endoglin-Antikörper, mIg $\gamma$ 2a/ <i>kappa</i>	aus dieser Arbeit
mK-ro11	$\alpha$ Endoglin-Antikörper, mIg $\gamma$ 2a	aus dieser Arbeit
mK-ro12	$\alpha$ Endoglin-Antikörper, mIg $\gamma$ 2a	aus dieser Arbeit
mK-ro13	$\alpha$ Endoglin-Antikörper, mIg $\gamma$ 2a	aus dieser Arbeit
mK-ro14	$\alpha$ Endoglin-Antikörper, mIg $\mu$	aus dieser Arbeit
mK-ro15	$\alpha$ Endoglin-Antikörper, mIg $\mu$	aus dieser Arbeit
mK-ro16	$\alpha$ Endoglin-Antikörper, mIg $\mu$	aus dieser Arbeit
mK-ro17	$\alpha$ Endoglin-Antikörper, mIg $\mu$	aus dieser Arbeit
mK-ro18	$\alpha$ Endoglin-Antikörper, mIg $\mu$	aus dieser Arbeit
mK-ro19	$\alpha$ Endoglin-Antikörper, mIg $\gamma$ 1	aus dieser Arbeit
mK-ro20	$\alpha$ Endoglin-Antikörper, mIg $\gamma$ 2a	aus dieser Arbeit
mK-ro21	$\alpha$ Endoglin-Antikörper, mIg $\gamma$ 2a/ <i>kappa</i>	aus dieser Arbeit
mK-ro22	$\alpha$ Endoglin-Antikörper, mIg $\gamma$ 2a	aus dieser Arbeit
mK-ro23	$\alpha$ Endoglin-Antikörper, mIg $\gamma$ 2b/ <i>kappa</i>	aus dieser Arbeit
K-zd1	$\alpha$ Frizzled9-Antikörper, mIg $\mu$	aus dieser Arbeit
W3C4E11	$\alpha$ Frizzled9-Antikörper, mIg $\mu$ / <i>kappa</i>	Dr. Hans-Jörg Bühring, Tübingen

### 2.1.13 Oligonukleotide

Alle Oligonukleotide wurden von der Firma Biomers (Ulm) synthetisiert.

OLIGONUKLEOTID	SEQUENZ
ENG-For-HindIII	5'-taagcttatggaccgcggcacgctccctctggctgttgc-3'
ENG-Hin1	5'-tgcattccaggccctgggaatccc-3'
ENG-Hin2	5'-gtgaaggtggaactgagctgcgca-3'
ENG-Hin3	5'-cttggtgccatttgaagtgcac-3'
ENG-Hin4	5'-ggggcagcagagctttgtgc-3'
ENG-Rev-XbaI	5'-tctagactatgccatgctgctggtggagcagggggtgctctggg-3'
M13-hin	5'-gtaaaacgacggccagt-3'
M13-rev	5'-aacagctatgacctg-3'
AatII-universal-hin	5'-atagacgtccactctgtctttctcttcacaggtgtccttc-3'
heavy-universal-rev-EcoRI	5'-tgaattcgtaatcgatttagaatgggagaaggtaggactcac-3'
k-for-1	5'-cctgttgaagctcttgacaatggg-3'
c-k-back	5'-acttctaccccaaagacatcaatgtcaag-3'
CG2-hin	5'-ccatctgtctatccactggcc-3'
CG2-rev	5'-cctcatgtaacacagagcagg-3'
2a-for	5'-gaggacagggcttgattgtggccctctgggct-3'
2a-rev	5'-catgcaaatgccagcacctaaccttgggtg-3'
2b-Seq4	5'-cccggacagggccacatggtcttc-3'
2b-rev	5'-caaggagtgtcacaatgccagctcctaacc-3'
he-li-forward	5'-tccatgggtctttctgcagtcaggatccatg-3'
m-light-rev	5'-ctatagaatagggcctcattaactc-3'
m-heavy-rev	5'-ctatatgtccttcaccaatcttctgtccacc-3'
m-heavy-rev2	5'-gggtgtgcacaccgctggacagagatccag-3'
FZD9BamHI-fw	5'-aggatccgccacctggccgtggcgcctctgcggggggcgctgc-3'

OLIGONUKLEOTID	SEQUENZ
FZD9SEQ1	5'-caacttcggctggccggac-3'
FZD9SEQ2	5'-ccttccatgtgctacaacg-3'
FZD9SEQ3	5'-gcgctcacgggcttcgtgctg-3'
FZD9SEQ4	5'-gagctccaagactttccagac-3'
FZD9XbaI-rev	5'-ttctagattactagaggtgtgtggggttctccaaagag-3'
pGEM-backbone-rev	5'-cgacctacaccgaactgagatacctac-3'
9Not1fw	5'-ccttcgggccacagagcagccatgcgcagcggccgcccggaggcc-3'
9Kpn1rev	5'-gcaggtaccactgcccccgcgcccgggccaggtctccggg-3'
9Kpn1mut1fw	5'-cagtggtagctgcgagaaccccgagaagttccagtacgtggagaagag-3'
9Bsr1fw	5'-cctgtacacggtgcccgccacctgcgtcatcgtttgctatg-3'
9Bsr1mut2rev	5'-ggcgggcaccgtgtacaggatggagaagacccgatcttgacctgagcttctcc-3'
9Sac1mut3rev	5'-tggaaagtcttgagctccacaccagacgccgctggtgatccccacc-3'
Fzd9-StuI-mut4-fw	5'-gccaaggcctgccgcgccccgggagctacggacg-3'

Die degenerierten Primer zur Amplifikation der variablen Domänen von schweren und leichten Antikörperketten wurden von Dr. Ludger Große-Hovest (Tübingen) entwickelt. Es wurden sieben Primerpools (PP K1 bis PP K7) für die VJ-Region und neun Primerpools (PP H1-1 bis PP H8) für die VDJ-Region verwendet.

### 2.1.14 Antikörper

ANTIKÖRPER	BESCHREIBUNG	BEZUGSQUELLE
mIg $\mu$ -IT	Isotypkontrolle, Klon: 11E10	Southern Biotech, Birmingham, USA
mIg $\gamma$ 1-IT	Isotypkontrolle, Klon: B-Z1	Gen-Probe, San Diego, USA
mIg $\gamma$ 2a-IT	Isotypkontrolle, Klon: B-Z2a	Gen-Probe, San Diego, USA

ANTIKÖRPER	BESCHREIBUNG	BEZUGSQUELLE
mIg $\gamma$ 2b-IT	Isotypkontrolle, Klon: NCG2B.01	Dianova, Hamburg
RANK-Fc	Isotypkontrolle, chimär, Ig $\gamma$ 1-Fusionsprotein	Dr. Ludger Große-Hovest, Tübingen
stuff2	Isotypkontrolle, lösliches Fc-Fragment mit SD-IEM-Modifikation	Dr. Ludger Große-Hovest, Tübingen
rIg $\gamma$ 2a-IT-PE	PE-konjugierte Isotypkontrolle, Ratte-anti-Maus, Klon: oBR2a	eBioscience, Frankfurt
MJ7/18-PE	PE-konjugierter Ratte-anti-mENG-Antikörper	eBioscience, Frankfurt
SN6	$\alpha$ Endoglin-Antikörper, mIg $\gamma$ 1 [Haruta und Seon, 1986]	Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, USA
MEM-05	$\alpha$ CD31-Antikörper, mIg $\gamma$ 1	ImmunoTools, Friesoythe
2D1	AmCyan-gekoppelter $\alpha$ CD45-Antikörper	Becton Dickinson, Heidelberg
WM59	PE-Cy7-gekoppelter $\alpha$ CD31-Antikörper	BioLegend, London, UK
581	APC-Cy7-gekoppelter $\alpha$ CD34-Antikörper	BioLegend, London, UK
W3C4E11	$\alpha$ Frizzled9-Antikörper, mIg $\mu$ / <i>kappa</i>	Dr. Hans-Jörg Bühring, Tübingen
mK-ro2	$\alpha$ Endoglin-Antikörper, mIg $\gamma$ 1	aus dieser Arbeit
mK-ro4	$\alpha$ Endoglin-Antikörper, mIg $\mu$	aus dieser Arbeit
mK-ro5	$\alpha$ Endoglin-Antikörper, mIg $\mu$	aus dieser Arbeit
mK-ro6	$\alpha$ Endoglin-Antikörper, mIg $\mu$	aus dieser Arbeit
mK-ro7	$\alpha$ Endoglin-Antikörper, mIg $\mu$	aus dieser Arbeit
mK-ro8	$\alpha$ Endoglin-Antikörper, mIg $\gamma$ 1/ <i>kappa</i>	aus dieser Arbeit
mK-ro9	$\alpha$ Endoglin-Antikörper, mIg $\gamma$ 2a	aus dieser Arbeit
mK-ro10	$\alpha$ Endoglin-Antikörper, mIg $\gamma$ 2a/ <i>kappa</i>	aus dieser Arbeit
mK-ro11	$\alpha$ Endoglin-Antikörper, mIg $\gamma$ 2a	aus dieser Arbeit

ANTIKÖRPER	BESCHREIBUNG	BEZUGSQUELLE
mK-ro12	$\alpha$ Endoglin-Antikörper, mIg $\gamma$ 2a	aus dieser Arbeit
mK-ro13	$\alpha$ Endoglin-Antikörper, mIg $\gamma$ 2a	aus dieser Arbeit
mK-ro14	$\alpha$ Endoglin-Antikörper, mIg $\mu$	aus dieser Arbeit
mK-ro15	$\alpha$ Endoglin-Antikörper, mIg $\mu$	aus dieser Arbeit
mK-ro16	$\alpha$ Endoglin-Antikörper, mIg $\mu$	aus dieser Arbeit
mK-ro17	$\alpha$ Endoglin-Antikörper, mIg $\mu$	aus dieser Arbeit
mK-ro18	$\alpha$ Endoglin-Antikörper, mIg $\mu$	aus dieser Arbeit
mK-ro19	$\alpha$ Endoglin-Antikörper, mIg $\gamma$ 1	aus dieser Arbeit
mK-ro20	$\alpha$ Endoglin-Antikörper, mIg $\gamma$ 2a	aus dieser Arbeit
mK-ro21	$\alpha$ Endoglin-Antikörper, mIg $\gamma$ 2a/ <i>kappa</i>	aus dieser Arbeit
mK-ro22	$\alpha$ Endoglin-Antikörper, mIg $\gamma$ 2a	aus dieser Arbeit
mK-ro23	$\alpha$ Endoglin-Antikörper, mIg $\gamma$ 2b/ <i>kappa</i>	aus dieser Arbeit
K-zd1	$\alpha$ Frizzled9-Antikörper, mIg $\mu$	aus dieser Arbeit
$\chi$ K-ro8	chim. $\alpha$ Endoglin-Antikörper, Ig $\gamma$ 1	aus dieser Arbeit
$\chi$ K-ro8SDIEM	chim. $\alpha$ Endoglin-Antikörper mit SDIEM-Modifikation, Ig $\gamma$ 1	aus dieser Arbeit
$\chi$ K-ro10	chim. $\alpha$ Endoglin-Antikörper, Ig $\gamma$ 1	aus dieser Arbeit
$\chi$ K-ro10SDIEM	chim. $\alpha$ Endoglin-Antikörper mit SDIEM-Modifikation, Ig $\gamma$ 1	aus dieser Arbeit
$\chi$ K-ro22	chim. $\alpha$ Endoglin-Antikörper, Ig $\gamma$ 1	aus dieser Arbeit
$\chi$ K-ro22SDIEM	chim. $\alpha$ Endoglin-Antikörper mit SDIEM-Modifikation, Ig $\gamma$ 1	aus dieser Arbeit
$\chi$ K-ro23	chim. $\alpha$ Endoglin-Antikörper, Ig $\gamma$ 1	aus dieser Arbeit
$\chi$ K-ro23SDIEM	chim. $\alpha$ Endoglin-Antikörper mit SDIEM-Modifikation, Ig $\gamma$ 1	aus dieser Arbeit

ANTIKÖRPER	BESCHREIBUNG	BEZUGSQUELLE
$\chi$ SN6j	chim. $\alpha$ Endoglin-Antikörper, entspricht TRC105, VJ kloniert nach [Seon et al., 2011], Ig $\gamma$ 1	aus dieser Arbeit
$\chi$ SN6jSDIEM	chim. $\alpha$ Endoglin-Antikörper mit SDIEM-Modifikation, VJ kloniert nach [Seon et al., 2011], Ig $\gamma$ 1	aus dieser Arbeit
$\chi$ 4G8SDIEM	chim. $\alpha$ CD135-Antikörper mit SDIEM-Modifikation; Ig $\gamma$ 1	Dipl.-Biol. Martin Hofmann, Diplomarbeit 2009, Tübingen
Ziege-anti-Maus-Biotin	Biotin-gekoppelter polyklonaler Sekundärantikörper gegen Ig $\gamma$ , Fc-Fragment spezifisch	Jackson ImmunoResearch, Suffolk, UK
Ziege-anti-Maus-PE	RPE-konjugierter polyklonaler Sekundärantikörper gegen Ig $\gamma$ 1, Ig $\gamma$ 2a, Ig $\gamma$ 2 und Ig $\gamma$ 3	Jackson ImmunoResearch, Suffolk, UK
Ziege-anti-Maus-PE	RPE-konjugierter polyklonaler Sekundärantikörper gegen Ig $\gamma$ und Ig $\mu$ (H+L)	Jackson ImmunoResearch, Suffolk, UK
Ziege-anti-Maus-APC	APC-konjugierter polyklonaler Sekundärantikörper gegen Ig $\gamma$ und Ig $\mu$ (H+L)	Jackson ImmunoResearch, Suffolk, UK
Ziege-anti-Human-APC	APC-konjugierter polyklonaler Sekundärantikörper gegen Ig $\gamma$ , Fc-Fragment spezifisch	Jackson ImmunoResearch, Suffolk, UK

### 2.1.15 Plasmide

PLASMID	BEZUGSQUELLE
pGEM <sup>®</sup> -T Easy	Promega, Mannheim
pPCR-Script <sup>™</sup> AmpSK(+)-Cloning-Vector	Stratagene, Heidelberg
pcDNA3	Invitrogen, Karlsruhe
pDIAMixedFc	Dr. Ludger Große-Hovest, Tübingen
pDIA-mu-cL	Dr. Ludger Große-Hovest, Tübingen
Expressionsvektor der chimären, schweren Kette ( $\chi$ CD19-Ig $\gamma$ 1)	Dr. Ludger Große-Hovest, Tübingen
Expressionsvektor der optimierten, schweren Kette ( $\chi$ BV10-SDIEM)	Dr. Ludger Große-Hovest, Tübingen
Expressionsvektor der leichten Kette (BV10-light)	Dr. Ludger Große-Hovest, Tübingen

### 2.1.16 Software

SOFTWARE	BEZUGSQUELLE
Axio Vision	Zeiss, Jena
CellQuest Pro	Beckton Dickinson, Heidelberg
FlowJo	Treestar Inc., Ashland, USA
GATC Viewer	GATC Biotech AG, Konstanz
HUSAR Online Bioinformatics Lab	DKFZ, Heidelberg
Photoshop 6.0	Adobe, München
RTCA Software 1.2	Roche, Mannheim
Sigma Plot V7.0	SPSS, München
UNICORN Control	GE Healthcare, München

## 2.2 Zellbiologische Methoden

Alle Zelllinien wurden, soweit nicht anders angegeben, in einem CO<sub>2</sub>-Brutschrank unter Standardbedingungen (5% CO<sub>2</sub>, 37°C, 90% Luftfeuchtigkeit) kultiviert.

### 2.2.1 Passagieren von Zellen

Die Zellen wurden durch seitliches Klopfen der Kulturflasche abgelöst und anschließend, je nach Zelldichte, mit einem entsprechendem Volumen von frischem Vollmedium versetzt.

### 2.2.2 Bestimmung der Lebend-Zellzahl

Um die Anzahl lebender Zellen in einer Suspension zu bestimmen, wurde eine 1:2 oder 1:10 Verdünnung mit einer 0,1% Trypanblau-Lösung hergestellt und mittels Neubauer-Zählkammer ausgezählt. Trypanblau färbt selektiv tote Zellen blau an, da deren Membranintegrität gestört ist. Lebende Zellen bleiben unter dem Lichtmikroskop ungefärbt. Nach Auszählen der Großquadrate wurde die Lebend-Zellzahl (in Zellen/mL Suspension) aus der mittleren Anzahl ungefärbter Zellen pro Großquadrat, dem Volumenfaktor der Kammer ( $10^4$ ), sowie dem Verdünnungsfaktor berechnet.

Um die Zellzahl einer Milzzellsuspension zu bestimmen wurde Türk'sche Lösung verwendet, welche zur Lyse der Erythrozyten führt. Nach Herstellung einer 1:10 Verdünnung konnte die Lebend-Zellzahl wie oben beschrieben ermittelt werden.

### 2.2.3 Kryokonservierung von Zellen

Um Zellen kurz- oder längerfristig aufzubewahren wurden  $2-10 \times 10^6$  Zellen gerntet, in 1 mL 4°C-kaltem Einfriermedium resuspendiert und in ein Kryoröhrchen überführt. Mittels Isopropanolkühler konnte die Zellsuspension mit einer definierten Absenkung der Temperatur von 1°C/min auf -80°C eingefroren werden. Zur längerfristigen Lagerung wurden die Kryoröhrchen in flüssigen Stickstoff überführt (-196°C).

Um kryokonservierte Zellen wieder in Kultur zu nehmen, wurde das Röhrchen bei RT angetaut und die Zellsuspension in 1 mL 4°C-kaltem Vollmedium aufgenommen. Um das für die Zellen toxische DMSO des Einfriermediums zu entfernen, wurde die Zellsuspension für 10 min bei 250 xg zentrifugiert und in frischem Vollmedium in Zellkulturflaschen ausgesät.

### 2.2.4 Stabile Transfektion von eukaryotischen Zellen

Zur Transfektion eukaryotischer Zellen wurden die entsprechenden Expressionsvektoren zuvor präparativ linearisiert. Die DNA konnte anschließend mittels einer Phenol/Chloroform-Extraktion gereinigt und nach einer Fällung bei -80°C in H<sub>2</sub>O

(bidest.) aufgenommen werden (siehe auch 2.4.12).

Es wurden  $2 \times 10^7$  hochviabile Sp2/0-Ag14 Zellen zur Transfektion verwendet. Diese wurden geerntet und dreimal in 4°C-kaltem IMDM-Medium gewaschen (Zentrifugation: 10 min bei  $250 \times g$ ). Nach dem letzten Waschschrift wurde das Zellpellet in 300  $\mu\text{L}$  4°C-kaltem IMDM-Medium aufgenommen.

Im Falle einer Transfektion zur Generierung Antikörper-sekretierender Transfektanten, wurde die linearisierte DNA mit einem Überschuss des Expressionsvektors der leichten Kette im Verhältnis zur schweren Kette vorher vereinigt. Dies war notwendig, da der Selektionsmarker ausschließlich auf dem Plasmid der schweren Kette vorhanden ist. Es wurden je 10-20  $\mu\text{L}$  linearisierte DNA für die Transfektion eingesetzt.

Die Zellsuspension wurde für 10 min in einer 4°C-vorgekühlten Elektroporationsküvette mit der linearisierten DNA inkubiert. Anschließend konnte die Elektroporation bei 230 V und 975  $\mu\text{F}$  durchgeführt werden. Die Zellen wurden sofort nach der Elektroporation in 37°C-warmes IMDM-Vollmedium überführt und pur bzw. in Verdünnungen von 1:2 bis 1:128 in einer 96-well Flachbodenplatte mit 50  $\mu\text{L}$ /well ausplattiert. Zur Selektion auf transfizierte Klone wurde nach 24 h jedes well mit dem Antibiotikum G418 (Endkonzentration 1 mg/mL) versetzt. Nach 8-10 Tagen konnten die Platten auf proliferierende Einzelklone lichtmikroskopisch untersucht werden.

### 2.2.5 Subklonierung

Um sicher zu stellen, dass es sich bei den verwendeten Zelllinien, Transfektanten bzw. Hybridomen um Einzelklone handelt, wurden diese gegebenenfalls subkloniert. Hierfür wurden die Zellen in einer theoretischen Zelldichte von 0,3 Zellen/well in einer 96well-Flachbodenplatte ausplattiert. Nach ca. 7 Tagen konnten die Einzelklone lichtmikroskopisch identifiziert und expandiert werden.

### 2.2.6 Isolierung von peripheren mononukleären Zellen des Blutes

Periphere mononukleäre Zellen des Blutes (*engl. peripheral blood mononuclear cells, PBMC*) wurden aus Vollblut gesunder Spender mittels Dichtegradientenzentrifugation isoliert. Hierfür wurde das heparinisierte Vollblut im Verhältnis 1:2 in 37°C-warmem DPBS verdünnt. Anschließend wurden je 12 mL vorgelegte Biocoll™ Separation Solution (Ficoll-Lösung 1,077 g/mL) vorsichtig mit je 30 mL des Blut-DPBS-Gemisches überschichtet. Es folgte ein Zentrifugationsschritt mit  $560 \times g$  für 30 min (ohne Bremse). Hierbei sedimentieren Erythrozyten und Granulozyten aufgrund ihres größeren spezifischen Gewichts. Die mononukleären Zellen (Lymphozyten, Thrombozyten und Monozyten) sammeln sich in der Interphase. Um Ficoll-Reste und Verunreinigungen durch Erythrozyten und Thrombozyten zu entfernen wurden die Zellen anschließend zweimal in 50 mL 37°C-warmem DPBS gewaschen

(10 min bei 300 x *g* und 10 min bei 200 x *g*). Die isolierten PBMC wurden gezählt und in entsprechendes Volumen RPMI-Vollmedium aufgenommen.

### 2.2.7 Gewinnung von humanem Serum aus Vollblut

Zur Gewinnung von humanem Serum wurde gesunden Spendern Vollblut in S-Monovetten<sup>®</sup> entnommen und diese für 1 h bei RT inkubiert. In den S-Monovetten<sup>®</sup> ist die gerinnungsfördernde Substanz Kaolin auf Kunststoffgranulat aufgebracht, welches auf Grund seiner spezifischen Dichte beim Zentrifugieren eine Trennschicht zwischen Serum und Blutkuchen bildet. Das vollständig koagulierte Blut wurde anschließend bei 4°C und 1000 x *g* für 10 min abzentrifugiert. Der Zentrifugationsschritt wurde wiederholt, das Serum vorsichtig abgenommen und bis zur weiteren Verwendung bei 4°C gelagert.

## 2.3 Generierung monoklonaler Antikörper mittels Hybridomtechnik

Zur Generierung von monoklonalen Hybridomen nach Köhler und Milstein [Köhler und Milstein, 1975] wurden verschiedene Mausstämme verwendet. Alle durchgeführten Tierexperimente standen im Einklang mit dem Tierschutzrecht und den Tierschutzbedingungen des Landes Baden-Württemberg. Die Tieranzeigen nach §10a waren zuvor vom Regierungspräsidium Tübingen genehmigt worden.

### 2.3.1 Immunisierung von Mäusen

Zur Immunisierung von Mäusen wurde eine transfizierte Sp2/0-Ag14 Zelllinie verwendet, welche das gewünschte Antigen auf der Zellmembran exprimiert. Zur Erstimmunisierung wurden  $5 \times 10^6$  Zellen in 200  $\mu\text{L}$  DPBS zusammen mit dem Adjuvants CpG (Ligand für TLR9, *engl. toll-like receptor 9*) intraperitoneal appliziert. Über einen Zeitraum von maximal 70 Tagen folgten drei bis vier weitere Immunisierungsschritte. 3 bis 4 Tage vor der Fusion wurden erneut  $5 \times 10^6$  Zellen in 200  $\mu\text{L}$  PBS, sowie CpG intraperitoneal appliziert.

### 2.3.2 Chemische Zellfusion und Selektion

Folgende Medien wurden zur chemischen Zellfusion verwendet:

- Medium 1*: IMDM-Vollmedium, jedoch mit 5% FCS, mit 8-Azaguanin
- Medium 2*: IMDM-Vollmedium, jedoch mit 5% FCS
- Medium 3*: IMDM-Vollmedium, jedoch ohne FCS
- Medium 4*: IMDM-Vollmedium, jedoch mit 20% FCS und 10 mL HCS
- Medium 5*: *Medium 4*, supplementiert mit doppelter HAT-Konzentration
- Medium 6*: *Medium 4*, supplementiert mit HT

Die verwendete Sp2/0-Ag14 Myelomazelllinie trägt eine Mutation, die zu einer Defizienz des Enzyms HGPRT führt. Zur Aufrechterhaltung dieses für die

spätere Selektion wichtigen Defektes wurden die Zellen in *Medium 1* kultiviert. Sieben Tage vor der Fusion wurden die Zellen in *Medium 2* transferiert und expandiert.

Zur chemischen Zellfusion wurden Sp2/0-Ag14 Zellen dreimal in 37°C-warmem *Medium 3* gewaschen (Zentrifugation: 200 x *g* für 10 min) und bei 37°C inkubiert. Zur Gewinnung der Milzzellen wurde die Maus mittels letaler Kohlendioxidinhalation getötet. Nach Entnahme der Milz wurde diese durch ein handelsübliches Teesieb in 10 mL 37°C-warmes *Medium 3* gedrückt und die Zellzahl der vereinzelt Milzzellen bestimmt. Pro Fusionsansatz wurden  $2 \times 10^7$  Milzzellen mit  $5 \times 10^6$  Sp2/0-Ag14 Myelomazellen (Verhältnis 5:1) gemischt und bei 200 x *g* für 10 min pelletiert. Der Überstand konnte mit Hilfe einer Vakuumpumpe vollständig abgenommen werden. Anschließend wurde das Zellpellet durch Klopfen gelöst und nach Zugabe von 1 mL 37°C-warmem Polyethylenglykol (PEG1500) für 1 min inkubiert. Das PEG1500 führt durch Bindung des Wassers zu engem Zell-Zell-Kontakt und somit zur spontanen Fusion einzelner Zellen. Es folgte eine Verdünnung des für die Zellen toxischen PEG1500 durch Zugabe von je 100  $\mu\text{L}$  37°C-warmem *Medium 4* in immer kürzeren Zeitabständen (alle 20 sek für 1 min; alle 15 sek für 1 min; alle 10 sek für 1 min; alle 5 sek für 30 sek). Die Zellsuspension wurde schließlich in 30 mL *Medium 4* aufgenommen und für 1 h bei 37°C inkubiert. Nach einem Zentrifugationsschritt von 10 min bei 200 x *g* wurde das Zellpellet in 20 mL 37°C-warmem *Medium 4* resuspendiert. Um die Scherkräfte zu minimieren, wurde die Zellsuspension mittels Finnpipette mit besonders großer Spitzenöffnung in zwei 96-well Flachbodenplatten mit je 100  $\mu\text{L}$ /well ausplattiert. Die Platten wurden über Nacht bei 37°C gelagert.

Am nächsten Tag wurden zur Selektion der Hybridome 100  $\mu\text{L}$ /well *Medium 5* zugegeben und die Platten für mindestens zehn Tage in einem CO<sub>2</sub>-Brutschrank inkubiert.

### 2.3.3 Kultivierung von Antikörper-produzierenden Zellen

Die Kultivierung der Antikörper-produzierenden Hybridome erfolgte nach positiver FACS Analyse in *Medium 6*. Zur weiteren Expansion wurden 3-Bodenflaschen angeimpft. Die Ernte des Zellkulturüberstandes erfolgte nach circa zehn Tagen bei einer Zellviabilität von nur noch 20%.

Im Falle von Transfektanten, welche rekombinante Antikörper in den Überstand sezernieren, wurden die Zellen anfänglich unter Selektionsdruck mit 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  G418 expandiert und ebenfalls nach zehn Tagen bei einer Zellviabilität von nur noch circa 20% geerntet.

Hierfür wurde die Zellsuspension für 15 min bei 6000 x *g* und 4°C pelletiert. Der Zellkulturüberstand wurde auf einen pH-Wert von 8 eingestellt und mit 0,02% NaN<sub>3</sub> versetzt. Anschließend konnte der Überstand mittels eines Bottle-top Filters (Porengröße: 0,22  $\mu\text{m}$ ) sterilfiltriert und bis zur Verwendung bei 4°C gelagert werden.

### 2.3.4 Reinigung monoklonaler und rekombinanter Antikörper mittels Affinitätschromatographie an Protein A

Die Aufreinigung monoklonaler und rekombinanter Antikörper erfolgte mittels Affinitätschromatographie an Protein A. Dabei handelt es sich um einen Zellwandbestandteil aus *Staphylococcus aureus* mit unterschiedlicher Bindungsaffinität an den F<sub>c</sub>-Teil von Immunglobulinen verschiedener Spezies und Igγ-Subtypen. Die in 0,02% NaN<sub>3</sub>-DPBS gelagerte Protein A-Säule wurde vor Gebrauch mit 0,1 M Phosphatpuffer (pH 8) äquilibriert. Anschließend konnte der zentrifugierte und gefilterte Zellkulturüberstand mit einer Flussgeschwindigkeit von maximal 50 mL/h auf die Säule aufgetragen werden. Es folgte das Waschen der Säule mit 0,1 M Phosphatpuffer (pH 8), welches ebenso wie die stufenweise Elution mit 0,1 M Citratpuffer (pH 4,2 und pH 2,4) unter Verwendung eines Durchflussspektrophotometers und Messung der Absorption bei 280 nm überwacht wurde.

### 2.3.5 Dialyse proteinhaltiger Lösungen

Zur Entsalzung und Umpufferung folgte im Anschluss an die Reinigung der Antikörperlösungen mittels Affinitätschromatographie die Dialyse. Hierfür wurden Dialyseschläuche mit einer Porengröße von 25 Å (entspricht einer Ausschlussgröße von 12-14 kDa) verwendet. Die Dialyse des Eluats (ca. 5 mL) erfolgte unter ständigem Rühren gegen 1 L DPBS bei 4°C über Nacht.

### 2.3.6 Konzentrationsbestimmung von Antikörperlösungen

Die Konzentration von Antikörperlösungen wurde durch Messung der Absorption im UV-Spektrophotometer NANODROP 1000 bei 280 nm bestimmt. In diesem Bereich ist die Absorption hauptsächlich durch Tyrosin und Tryptophan und zu einem geringen Anteil durch Phenylalanin und Disulfid-Brücken bedingt. Der für Antikörper spezifische Extinktionskoeffizient liegt für eine Konzentration von 1 mg/mL bei 1,4. Die Durchführung der Messung erfolgte nach Herstellerangaben. Im Anschluss wurde das Eluat sterilfiltriert (Porengröße von 0,22 µm) und bei 4°C gelagert.

## 2.4 Molekularbiologische Methoden

### 2.4.1 Isolierung von Nukleinsäuren

**Isolierung von genomischer Desoxyribonukleinsäure (DNA)** Zur Isolierung genomischer DNA wurden 10<sup>7</sup> hochviable Zellen zweimal in DPBS gewaschen und für 1 h bei -80°C inkubiert. Anschließend wurde das Zellpellet in 500 µL TE-Puffer resuspendiert und erneut für 1 h bei -80°C eingefroren. Nach Zugabe von 500 µL Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol (25:24:1) wurde das Lysat stark geschüttelt und zur Trennung der Phasen für 1 min bei 17900 x g zentrifugiert. Dabei befand sich die DNA in der oberen wässrigen Phase, welche in ein neues Reaktionsgefäß überführt wurde. Der Arbeitsschritt wurde wiederholt und anschließend mit 500 µL eines 1:1-Gemisches aus Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol und Chloroform

vermischt. Nach Überführen der wässrigen Phase in ein neues Reaktionsgefäß wurde diese mit 500  $\mu\text{L}$  eines 24:1-Gemisches aus Chloroform und Isoamylalkohol versetzt. Die anschließende Präzipitierung der Nukleinsäuren aus der wässrigen Phase erfolgte mit je 0,1 Volumen einer 3 M Natriumacetat-Lösung und 2,5 Volumen eiskaltem 100% Ethanol für 1 h bei  $-80^{\circ}\text{C}$ . Nach der Fällung wurden die Nukleinsäuren bei  $17900 \times g$  für 20 min und  $4^{\circ}\text{C}$  zentrifugiert und das Pellet zweimal in 100% Ethanol gewaschen. Anschließend konnte das getrocknete Pellet in  $\text{H}_2\text{O}$  (bidest.) aufgenommen werden.

### **Isolierung zytoplasmatischer Ribonukleinsäure (RNA) aus Hybridomen**

Zur Isolierung der zytoplasmatischen RNA wurden  $10^7$  hochviabile Hybridomzellen zweimal in DPBS gewaschen und für 5 min bei  $200 \times g$  zentrifugiert. Zur Öffnung der Zellmembran wurde das Zellpellet mit 175  $\mu\text{L}$  Lyse-Puffer RLN versetzt und für 5 min auf Eis inkubiert. Das Lysat wurde für 2 min bei  $300 \times g$  zentrifugiert und mit Hilfe des RNeasy<sup>®</sup> Mini Kit nach Herstellerangaben weiter bearbeitet. Die isolierte RNA wurde in 40  $\mu\text{L}$  RNase-freiem Wasser aufgenommen und konnte sofort zur cDNA-Synthese eingesetzt werden.

#### **2.4.2 cDNA-Synthese**

Die cDNA-Synthese erfolgte mit der LongRange 2Step RT-PCR für 90 min bei  $42^{\circ}\text{C}$ :

11,8 $\mu\text{L}$	RNA
45 $\mu\text{L}$	LongRange RT Buffer
2 $\mu\text{L}$	dNTP mix (je 10 mM)
1 $\mu\text{L}$	Oligo-dT (20 $\mu\text{M}$ )
0,2 $\mu\text{L}$	LongRange RNase Inhibitor (4U/ $\mu\text{L}$ )
1 $\mu\text{L}$	LongRange Reverse Transkriptase

Zur Inaktivierung des Enzyms folgte eine fünf-minütige Inkubation bei  $85^{\circ}\text{C}$ . Die cDNA wurde bis zur weiteren Verwendung bei  $-20^{\circ}\text{C}$  aufbewahrt.

#### **2.4.3 Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)**

Die Polymerase-Ketten Reaktion (*engl. polymerase-chain reaction*, PCR) ist mittlerweile eine etablierte Methode zur Amplifikation von DNA-Fragmenten mittels spezifischer Primer. In dieser Arbeit wurde die PCR hauptsächlich zur Klonierung von chimären und SDIEM-modifizierten Antikörpern verwendet.

Das Standard-Protokoll einer PCR besteht aus drei Schritten: Im Denaturierungsschritt bei  $94^{\circ}\text{C}$  trennen sich die DNA-Einzelstränge voneinander. Dies erlaubt die Hybridisierung der Oligonukleotidprimer an die DNA-Einzelstränge. Die Temperatur dieses Annealingschritts ist abhängig vom GC-Gehalt der Oligonukleotidprimer, sowie von deren Sequenz. Im anschließenden Elongationsschritt verlängert die Polymerase die Primer zur doppelsträngigen DNA. Die Temperatur ist hierbei abhängig von der verwendeten Polymerase. Typischerweise wird eine Taq-Polymerase (isoliert aus dem hitzestabilen Bakterienstamm *Thermus aquaticus*)

zur Amplifikation von DNA-Fragmenten eingesetzt, wobei das Temperaturoptimum bei 72°C liegt. Je PCR werden circa 30 Zyklen durchgeführt. Die PCR wurde neben der Amplifikation ebenfalls zum Anfügen von Restriktionsschnittstellen durch spezifische Primer verwendet. Heutzutage sind verschiedene Polymerasen auf dem Markt. Durch Verwendung der Vent-Polymerase (isoliert aus dem hitzestabilen Bakterienstamm *Thermococcus litoralis*), konnten durch die integrierte *proof-reading*-Aktivität Mutationen vermieden werden.

Standardmäßig wurde folgender 100  $\mu\text{L}$ -Ansatz zur Amplifikation von DNA-Fragmenten verwendet:

1 $\mu\text{L}$	template
1 $\mu\text{L}$	Primer A (10 mM)
1 $\mu\text{L}$	Primer B (10 mM)
4 $\mu\text{L}$	dNTPs (je 10 mM)
10 $\mu\text{L}$	Thermo-POL buffer
81,6 $\mu\text{L}$	ddH <sub>2</sub> O
1 $\mu\text{L}$	Vent-POL (Hot Start)

Um eine Verdunstung der Probe zu verhindern, wurden die PCR-Ansätze mit 100  $\mu\text{L}$  Mineralöl überschichtet.

Im Anschluss an die Amplifikation wurden die PCR-Ansätze aufgereinigt. Hierfür wurde die Probe mit 3-facher Menge PB-Buffer (Qiagen, Hilden) vermischt und auf eine QIAquick Spin Column aufgetragen. Diese wurde für 1 min bei 17900 x *g* zentrifugiert und anschließend wurde der Durchbruch verworfen. Nach dem Waschen der Säule mit 750  $\mu\text{L}$  PE-Buffer (Qiagen, Hilden) konnte die DNA mit 40  $\mu\text{L}$  Ampuwa-Wasser eluiert werden.

### 2.4.4 Ligation von DNA-Enden

Die Ligation von DNA-Fragmenten mit kompatiblen DNA-Enden erfolgte unter Verwendung der T4 DNA Ligase, wobei das molare Verhältnis von Insert- zu Vektor-DNA ca. 3:1 betrug. Die Reaktionsansätze wurden anschließend zur Transformation in chemisch kompetente Bakterien eingesetzt.

**Blunt end-Ligation in pPCR-Script<sup>TM</sup>AmpSK(+)-Cloning-Vector** PCR-Amplikons, welche unter Verwendung der Vent<sup>®</sup>-Polymerase synthetisiert wurden, besitzen durch die 3'-5'-Exonuklease-Aktivität keine Nukleotidüberhänge an den 3'-Enden. Diese konnten stumpfendig in den geöffneten Zwischenvektor pPCR-Script<sup>TM</sup>AmpSK(+)-Cloning-Vector kloniert werden.

Die Ligationsreaktion wurde in einem 10  $\mu\text{L}$  Ansatz durchgeführt:

1 $\mu\text{L}$	pPCR-Script <sup>TM</sup> AmpSK(+)-Vektor, geöffnet [10 ng/ $\mu\text{L}$ ]
5 $\mu\text{L}$	DNA-Lösung aus Gelextraktion
1 $\mu\text{L}$	10x Puffer
1 $\mu\text{L}$	rATP [10 mM/ $\mu\text{L}$ ]
1 $\mu\text{L}$	<i>Srf</i> I [5 U/ $\mu\text{L}$ ]
1 $\mu\text{L}$	T4-DNA-Ligase [4 U/ $\mu\text{L}$ ]

Nach Religation des Vektors, ohne Integration des gewünschten DNA-Fragmentes, entsteht eine für das zugeführte Restriktionsenzym *SrfI* palindromische Erkennungssequenz. Die Anwesenheit des Enzyms führt somit zur erneuten Öffnung des Vektors, wodurch die Effizienz der *blunt-end*-Ligation deutlich gesteigert werden kann. Die Reaktion wurde über Nacht bei 16°C inkubiert.

**T/A-Klonierung in pGEM<sup>®</sup>-T Easy** PCR-Amplikons, welche unter Verwendung der Taq-Polymerase synthetisiert wurden, konnten durch den generierten 3'-A-Überhang in den Zwischenvektor pGEM<sup>®</sup>-T Easy-Vektor kloniert werden.

Die Ligationsreaktion wurde in einem 10  $\mu$ L Ansatz durchgeführt:

1 $\mu$ L	pGEM <sup>®</sup> -T Easy [50 ng/ $\mu$ L]
3 $\mu$ L	DNA-Lösung aus Gelextraktion
5 $\mu$ L	2x Rapid Ligation Buffer (mit ATP)
1 $\mu$ L	T4 DNA-Ligase

Die Reaktion wurde für 1 h bei RT inkubiert.

**Ligation in Expressionsvektoren** Die Ligation eines DNA-Fragmentes in einen Expressionsvektor erfolgte standardmäßig in einem 20  $\mu$ L Ansatz. Die Reaktion enthielt neben der Insert- und Vektor-DNA 2  $\mu$ L 10x Ligase-Puffer und 1  $\mu$ L T4-DNA-Ligase. Der Ligationsansatz wurde über Nacht bei 16°C inkubiert.

### 2.4.5 Gelelektrophoretische Auftrennung von DNA-Fragmenten

Die analytische und präparative Auftrennung von DNA-Fragmenten erfolgte im Agarosegel in einem elektrischen Feld. Hierbei wird die negativ-geladene DNA von der Anode angezogen und passiert je nach Größe in unterschiedlicher Geschwindigkeit die Agarosematrix. Die elektrophoretische Auftrennung erfolgte in 1-2% (w/v) Agarosegelen in 1x TAE-Puffer (Laufpuffer) mit ca. 0,4-0,7  $\mu$ g/mL Ethidiumbromid. Abhängig von der Größe der zu erwartenden DNA-Fragmente wurden die Proben in den Ladepuffern Bromphenolblau oder Orange G verdünnt. Als Größenmarker wurden 1 kb- bzw. 100 bp DNA-Leitern verwendet. Die elektrophoretische Auftrennung erfolgte bei analytischen 50 mL-Gelen bei 140 V, bei präparativen 100 mL-Gelen wurde eine Spannung von 100 V angelegt. Die DNA-Banden konnten anschließend durch das im Agarosegel enthaltene Ethidiumbromid, welches in die DNA interkaliert, mittels UV-Licht bei 312 nm sichtbar gemacht werden.

### 2.4.6 Elution von DNA aus Agarosegelen

Zur Isolierung von DNA-Fragmenten aus präparativen Agarosegelen wurden die Banden mit einem sauberen Skalpell unter möglichst kurzer UV-Bestrahlung ausgeschnitten. Das Elutionsverfahren der DNA aus der Agarosematrix wurde entsprechend der Größe des Fragmentes ausgewählt.

**Elution kleiner DNA-Fragmente (bis 10 kb)** Die Elution erfolgte mittels QIAquick<sup>®</sup> Gel Extraction Kit nach Herstellerangaben.

**Elution großer DNA-Fragmente (ab 10 kb)** Die Elution erfolgte mittels Elektroelution unter Verwendung des BioTrap-Kits bei einer Spannung von 80 V über Nacht. Zur Ankonzentrierung und Umpufferung der DNA-Fragmente wurden Centricons mit einer Ausschlussgröße von 10 kDa nach Herstellerangaben verwendet.

### 2.4.7 Herstellung chemisch-kompetenter Bakterien

Für die Herstellung von chemokompetenten Bakterien zur Transformation wurde eine LB-Agar-Platte mit einem Glycerolstock des *E.coli*-Stammes DH5 $\alpha$  ausgestrichen und über Nacht bei 37°C inkubiert. Mit einer einzelnen Bakterienkolonie konnte eine Übernachtskultur mit 5 mL LB-Medium angeimpft und im Horizontalschüttler bei 250 rpm und 37°C inkubiert werden. Mit 50  $\mu$ L dieser Übernachtskultur wurden 5 mL LB-Medium angeimpft und für 1-2 h bei 37°C auf einem Horizontalschüttler (250 rpm) kultiviert. Anschließend wurde die Bakteriensuspension mit LB-Medium auf 100 mL aufgefüllt und bis zu einer optischen Dichte OD<sub>550</sub> von 0,2-0,3 (logarithmische Wachstumsphase) bei 37°C und 250 rpm inkubiert. Im Anschluss wurde die Kultur bei 1560 x *g* und 4°C für 10 min abzentrifugiert. Von nun an erfolgten alle Arbeitsschritte auf Eis. Das Bakterienpellet wurde in 20 mL kaltem TfbI-Puffer resuspendiert und nach einer 20-minütigen Inkubation auf Eis bei 700 x *g* und 4°C für 5 min abzentrifugiert. Das Pellet wurde anschließend in 4 mL TfbII-Puffer resuspendiert und zügig in 150  $\mu$ L-Aliquots bei -80°C eingefroren.

### 2.4.8 Transformation

Zur Transformation wurden chemokompetente Bakterien auf Eis aufgetaut und je 70  $\mu$ L der Bakteriensuspension mit 20  $\mu$ L des Ligationsansatzes für 45 min auf Eis inkubiert. Die Aufnahme der DNA in die Bakterien erfolgte mittels Hitzeschock im 42°C-Wasserbad für 1 min. Anschließend wurde der Ansatz mit 400  $\mu$ L LB-Medium bei 37°C auf einem Horizontalschüttler (250 rpm) für 1 h inkubiert. Zur Selektion von Bakterienzellen mit aufgenommener Plasmid-DNA wurde die Bakteriensuspension in verschiedenen Verdünnungen auf Ampicillin-haltigen LB-Agar-Platten ausplattiert und bei 37°C über Nacht inkubiert.

Bei Klonierungen in pPCR-Script<sup>TM</sup> AmpSK(+)-Cloning-Vector wurde die Blau-Weiß-Selektion angewandt. Hierfür wurden LB-Amp-Platten verwendet, welche zuvor mit 20  $\mu$ L IPTG und 20  $\mu$ L X-Gal-Lösung behandelt wurden. Hierbei können weiße Klone mit erfolgreicher Insertion von blauen Klonen mit leeren Vektoren unterschieden werden.

### 2.4.9 Animpfen von Klonen und Anlegen von Bakterienkulturen

Einzelne Klone wurden mit einer sterilen Pipettenspitze von der Transformationsplatte auf eine neue LB-Platte mit entsprechendem Antibiotikum übertragen. Anschließend wurde mit derselben Pipettenspitze eine Bakterienkultur mit 5 mL LB-Medium und entsprechendem Antibiotikum angeimpft. Diese Kulturen wurden bei 37°C im Horizontalschüttler (250 rpm) über Nacht inkubiert.

Um größere Mengen an Expressionsvektoren herzustellen wurden 200 mL-Kulturen angelegt. Hierfür wurde wie oben beschrieben eine 5 mL-Kultur als Vorkultur angeimpft und für 6 h bei 37°C und 250 rpm inkubiert. Mit 200  $\mu$ L dieser Vorkultur wurden 200 mL LB-Medium mit 100  $\mu$ g/mL Ampicillin angeimpft und bei 37°C und 220 rpm über Nacht geschüttelt. Parallel wurden Stockkulturen mit 800  $\mu$ L der Vorkultur und 200  $\mu$ L sterilem Glycerin angelegt und bei -80°C gelagert.

### 2.4.10 Präparation von Plasmid-DNA

Die Isolierung von Plasmid-DNA gliedert sich in Anzucht und Lyse der Bakterien sowie die anschließende Reinigung der freigesetzten DNA auf. Abhängig von der Menge der benötigten Plasmid-DNA erfolgte die Präparation mittels QIAprep<sup>®</sup> Spin Miniprep Kit bzw. QIAGEN<sup>®</sup> Plasmid Maxi Kit. Beide Verfahren beruhen auf dem Prinzip der alkalischen Lyse der Bakterienzellen mit anschließender Neutralisation und wurde nach Herstellerangaben durchgeführt.

### 2.4.11 Verdau mit Restriktionsendonukleasen

**Analytischer Verdau** Unter Verwendung des analytischen Verdau konnte untersucht werden, ob die gewünschten Restriktionsschnittstellen der isolierten Plasmide des Bakterienklons vorhanden und intakt waren. Alle analytischen Reaktionen wurden in 10  $\mu$ L-Ansätzen für 30 min bei optimaler Temperatur der verwendeten Restriktionsendonukleasen inkubiert:

1 $\mu$ L	Plasmid-DNA
1 $\mu$ L	10x Reaktionspuffer
10 U	Restriktionsendonuklease
ad 10 $\mu$ L	H <sub>2</sub> O (bidest.)

Der Ansatz wurde anschließend mittels Gelelektrophorese im Agarosegel aufgetrennt und analysiert.

**Präparativer Verdau** Um größere Plasmidmengen zu verdauen, wurden präparative Ansätze mit je einem Endvolumen von 50  $\mu$ L verwendet. Diese wurden mit Mineralöl überschichtet und bei einer für die verwendeten Restriktionsendonukleasen optimalen Temperatur über Nacht inkubiert:

10-15 $\mu\text{L}$	Plasmid-DNA
5 $\mu\text{L}$	10x Reaktionspuffer
0,5 $\mu\text{L}$	100x BSA (wenn benötigt)
10 U	Restriktionsendonuklease
ad 50 $\mu\text{L}$	H <sub>2</sub> O (bidest.)

Anschließend wurden die Ansätze vereinigt und mittels präparativer Gelelektrophorese aufgetrennt. Nach Elution der DNA aus dem Agarosegel wurde die Nukleinsäure mittels Phenolextraktion gereinigt.

### 2.4.12 Reinigung von Nukleinsäuren durch Phenolextraktion

Die zur Transfektion von eukaryotischen Zellen verwendete linearisierte Plasmid-DNA wurde durch Phenolextraktion von hydrophoben Verunreinigungen und Proteinen befreit. Die wäßrige Nukleinsäurelösung wurde hierfür mit 1 Volumenanteil einer Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol-Lösung (25/24/1) versetzt. Nach ausgiebigem Schütteln und Abzentrifugieren wurde die obere DNA-haltige wäßrige Lösung in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Um alle Phenolreste zu entfernen, folgte eine zweimalige Extraktion mit je 1 Volumenanteil Chloroform. Zur Fällung der DNA wurde die Lösung mit 0,1 Volumen 3 M Natriumacetat-Lösung und 2,5 Volumen eiskaltem 100% Ethanol versetzt und mindestens für 60 min bei -80°C inkubiert. Nach einem Zentrifugationsschritt bei 9400 x *g* und 4°C für 60 min wurde der Überstand verworfen und das Pellet in H<sub>2</sub>O (bidest.) gelöst. Die DNA wurde bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert.

### 2.4.13 Klonierung von Antigen-exprimierenden Zelllinien

**Endoglin-exprimierende Zelllinie** Zur Generierung einer Endoglin-exprimierenden Zelllinie wurde der I.M.A.G.E. clone (#3843174) von der Firma imaGenes GmbH bezogen. Das humane Endoglin-Gen konnte anschließend mit spezifischen Primern (ENG-Rev-XbaI; ENG-For-HindII) amplifiziert und zusätzlich mit entsprechenden Schnittstellen versehen werden. Das PCR-Produkt wurde in den geöffneten Expressionsvektor pcDNA3 ligiert und in *E.coli* DH5 $\alpha$  transformiert. Nach Verifizierung der Sequenz (Primer: ENG-Hin1, ENG-Hin2, ENG-Hin3, ENG-Hin4) wurde eine Maxi-Präparation der Plasmide durchgeführt, welche nach Linearisierung mit der Restriktionsendonuklease AhdI zur Transfektion von Sp2/0-Ag14 Zellen verwendet wurde.

**FZD9-exprimierende Zelllinie** Zur Generierung einer Frizzled9-exprimierenden Zelllinien wurde der I.M.A.G.E. clone (#4791657) von der Firma imaGenes GmbH bezogen. Das humane frizzled9-Gen konnte anschließend mit spezifischen Primern (FZD9BamHI-fw, FZD9XbaI-rev) amplifiziert und zusätzlich mit entsprechenden Schnittstellen versehen werden. Mittels verschiedener Primer (9Not1fw, 9Kpn1rev, 9Kpn1mut1fw, 9BsrG1fw, 9BsrG1mut2rev, 9Sac1mut3rev, Fzd9-StuI-mut4-fw) wurden sechs im Gen enthaltene Mutationen beseitigt. Anschließend konnte das PCR-Produkt in den geöffneten Expressionsvektor pcDNA3 ligiert und in *E.coli*

DH5 $\alpha$  transformiert werden. Nach Verifizierung der Sequenz (Primer: FZD9SEQ1, FZD9SEQ2, FZD9SEQ3, FZD9SEQ4) wurde eine Maxi-Präparation der Plasmide durchgeführt, welche nach Linearisierung mit der Restriktionsendonuklease *AhdI* zur Transfektion von Sp2/0-Ag14 Zellen verwendet wurde.

#### 2.4.14 Sequenzierung

Zur Verifizierung der DNA-Sequenz wurden die Zwischen- und Expressionsvektoren von der Firma Microsynth AG (Balgach, CH) mittels spezifischer Primer sequenziert. Hierfür wurden die Proben nach Herstellerangaben vorbereitet und verschickt.

## 2.5 Analytische Methoden

### 2.5.1 Immunhistochemische Färbung von Kryoschnitten

Zur Untersuchung der Antigen-Expression und insbesondere der nativ exprimierten Bindungsmotive der Antikörper *in situ* wurde die Methode der immunhistochemischen Färbung von Kryoschnitten im Labor etabliert.

#### 2.5.1.1 Anfertigung von Kryoschnitten

Das Gewebe wurde aus der Urologie des Universitätsklinikums Tübingen bezogen oder kommerziell erworben. Die Proben wurden bis zur Anfertigung der Kryoschnitte bei  $-80^{\circ}\text{C}$  gelagert.

Das Gewebe konnte mit Hilfe des Gefriereinbettmediums TissueTek<sup>®</sup> auf dem Probenhalter des Kryotoms fixiert werden. Anschließend wurden die Schnitte bei  $-20^{\circ}\text{C}$  in einer Dicke von  $10\ \mu\text{m}$  angefertigt und auf SuperFrost<sup>®</sup>Plus Objektträgern aufgebracht. Nach Trocknung der Präparate über Nacht bei RT wurden diese bei  $-80^{\circ}\text{C}$  gelagert.

#### 2.5.1.2 Färbung der Kryoschnitte

Zwischen den einzelnen Arbeitsschritten wurden die Gewebeschnitte dreimal jeweils für 5 min in DPBS gewaschen.

Zur Färbung der Kryoschnitte wurden diese bei RT aufgetaut und anschließend für 10 min in eiskaltem Aceton chemisch fixiert. Nach dem Waschen erfolgte die Blockierung der endogenen Peroxidase des Gewebes durch eine 10-minütige Inkubation in einer 1%  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Lösung (in Methanol, v/v). Im Anschluss an einen weiteren Waschschrift wurden die Gefrierschnitte für 30 min mit dem Primärantikörper (in *Antibody Diluent* verdünnt) in einer feuchten Kammer inkubiert. Anschließend wurde die Lösung abgekippt und die Schnitte erneut gewaschen.

Im Falle von chimären Primärantikörpern mit SDIEM-optimierten Fc-Teil wurde ein zusätzlicher Färbeschrift durchgeführt bei dem die Schnitte mit dem Maus-Antikörper 9E10 (in *Antibody Diluent* verdünnt), welcher gegen das *c-myc*-Epitop des optimierten Primärantikörpers gerichtet ist, für 30 min in einer feuchten

Kammer inkubiert und anschließend gewaschen.

Zur Detektion des murinen F<sub>c</sub>-Teils der Primär- oder Sekundärantikörper wurden die Präparate für 30 min in einer feuchten Kammer mit dem Meerrettich-Peroxidase-Polymer *ZytoChem Plus* (engl. *horse radish peroxidase (HRP) polymer*) inkubiert. Dieses besteht aus einem linearen Proteinskelett, an das mehrere Moleküle der Meerrettich-Peroxidase, sowie anti-Maus Ig $\gamma$  F(ab)<sub>2</sub>-Fragmente gekoppelt sind. Nach Abkippen der Lösung wurden die Schnitte erneut gewaschen. Zur Visualisierung der Antigen-Antikörper-Komplexe wurden die Schnitte mit einer nach Herstellerangaben frisch angesetzten 3,3-Diaminobenzidin(DAB)-Lösung für 10 sek bis 10 min angefärbt. DAB wird durch die Meerrettich-Peroxidase umgesetzt und färbt die antikörper-markierten Strukturen braun an. Die Enzymreaktion wurde durch H<sub>2</sub>O (bidest.) abgestoppt. Zur Färbung der Zellkerne wurden die Präparate anschließend für ca. 2 sek mit Hämatoxylin gegengefärbt und sofort für 10 min unter Leitungswasser gebläut. Zur langfristigen Konservierung wurde den Schnitten in einer aufsteigenden Ethanolreihe (50%, 70%, 96%, 100%, 100%; Inkubation für je 2 min) Wasser entzogen. Es folgte eine zweifache Behandlung mit Xylol für jeweils 5 min. Anschließend wurden die Gewebeschnitte in Entellan Neu<sup>®</sup> unter einem Deckglas eingebettet. Nach Aushärtung des Mediums konnten die Präparate lichtmikroskopisch ausgewertet werden.

### 2.5.2 Durchflusszytometrie

Die Durchflusszytometrie wurde zum quantitativen Nachweis der Antigenexpression auf Zellen, sowie zur Untersuchung der Affinität und Bindungseigenschaften von Antikörpern verwendet. Des Weiteren können Zellen bezüglich ihrer Größe und Granularität phänotypisch charakterisiert werden. Zur Detektion der Oberflächenantigene wurden entweder Fluorochrom-markierte Primärantikörper verwendet. Alternativ wurden die gebundenen, unkonjugierten Antikörper mittels Fluorochromgekoppelter Sekundärantikörper detektiert.

**Analyse von antikörper-haltigen Zellkulturüberständen** Zellen, die das gewünschte Antigen auf ihrer Oberfläche exprimierten wurden geerntet, die Lebendzellzahl bestimmt und in FACS-Puffer (1% FCS und 0,01% NaN<sub>3</sub> in DPBS) aufgenommen. Pro Messpunkt wurden 2x 10<sup>5</sup> Zellen eingesetzt, welche in eine 96well-Rundbodenplatte ausplattiert und bei 400 x g für 3 min pelletiert wurden. Das Zellpellet wurde in 50  $\mu$ L des antikörper-haltigen Zellkulturüberstandes (pur oder 1:10 in FACS-Puffer verdünnt) resuspendiert und für 30 min bei 4°C im Dunkeln inkubiert. Es folgten zwei Waschschrte mit je 150  $\mu$ L FACS-Puffer (400 x g für 3 min). Anschließend wurden die pelletierten Zellen in 50  $\mu$ L des Sekundärantikörpers resuspendiert, welcher zuvor nach Herstellerangaben in FACS-Puffer verdünnt wurde. Nach einer Inkubation von 30 min bei 4°C im Dunkeln folgten erneut zwei Waschschrte mit je 150  $\mu$ L FACS-Puffer (400 x g für 3 min). Die Zellen wurden anschließend in 150  $\mu$ L FACS-Puffer aufgenommen und konnten am FACSCalibur unter Verwendung der CellQuestPro-Software analysiert werden.

**Analyse aufgereinigter Antikörper** Um die Bindungseigenschaften von aufgereinigten Antikörpern mittels Durchflusszytometrie zu untersuchen, wurden diese in verschiedenen Konzentrationen (in FACS-Puffer verdünnt) mit den Zellen inkubiert. Die Durchführung der Färbeschritte erfolgte wie bei den oben beschriebenen Analysen von antikörper-haltigen Zellkulturüberständen.

### **Analyse von CD45<sup>-</sup>CD31<sup>+</sup>CD34<sup>+</sup>-Endothelzellen aus Primärgewebe**

Zur durchflusszytometrischen Analyse von CD45<sup>-</sup>CD31<sup>+</sup>CD34<sup>+</sup>-Endothelzellen wurden Proben aus chirurgisch entnommenen Nierenzellkarzinomen und benignes Nierengewebe aus der Urologie des Universitätsklinikums Tübingen bezogen. Das Gewebe wurde direkt nach Entnahme von Dipl.-Biochemiker Heiko Schuster mittels enzymatischer Dissoziation aufgeschlossen. Dabei wurden die Proben zunächst mit dem Skalpell in etwa 0,5 cm<sup>3</sup> große Stücke zerteilt und anschließend in 10 mL einer Enzymlösung [300 U/mL Collagenase IV (Gibco, Darmstadt), 5 U/mL Dispase (Gibco, Darmstadt), 10 µg/mL DNase I (Roche, Mannheim), gelöst in RPMI 1640 mit 10 % FCS] überführt. Nach einer Inkubation von 3 h bei 37°C und 180 rpm auf dem Horizontalschüttler, wurde die Suspension mittels Filtration über ein 70 µm-Nylonsieb von verbliebenen Geweberesten befreit. Die Einzelzellsuspension wurde nach zweifachem Waschen mit 4°C-kaltem PBS (Zentrifugation: 250 x *g* für 10 min) direkt zur Färbung eingesetzt oder kryokonserviert bei -80°C [Schuster, 2013].

Alle Färbeschritte wurden auf Eis durchgeführt. Zwischen den einzelnen Schritten wurden die Zellen zweimal mit 150 µL kaltem PFEA (2% hitze-inaktiviertes FCS, 2 mM EDTA, 0,01%NaN<sub>3</sub> in DPBS) gewaschen (Zentrifugation für 5 min bei 250 x *g* und 4°C). Pro Messpunkt wurden 1x 10<sup>6</sup> Zellen des enzymatisch aufgeschlossenen Nierengewebes in 100 µL PFEA eingesetzt. Zur Differenzierung von lebenden und toten Zellen wurde die Zellsuspension für 20 min mit dem Reaktivfarbstoff Violet Live/Dead (Invitrogen, Darmstadt) in DPBS inkubiert. Nach einem Waschschrift wurden die Zellen für 30 min mit 5 µg des unkonjugierten, zu untersuchenden Antikörpers inkubiert. Im Falle von chimären SDIEM-modifizierten Antikörpers folgte nach einem Waschschrift eine weitere Inkubation von 30 min mit dem *αc-myc*-Antikörper 9E10. Zur Detektion des Maus-Fc-Teils wurden die Ansätze nach einem erneuten Waschschrift für 30 min mit dem an RPE-gekoppelten Sekundärreagenz Ziege anti-Maus gefärbt. Nach dem Waschen konnten die Oberflächenproteine CD31, CD34 und CD45 mittels spezifischer, Fluorochrom-gekoppelter Antikörper in einem 30-minütigen Färbeschritt detektiert werden. Nach dieser letzten Inkubation wurden die Zellen erneut gewaschen und nach Aufnahme in 100 µL PFEA durchflusszytometrisch analysiert. Die Auswertung erfolgte mit der Software FlowJo.

### **2.5.3 Bindung an lösliches Endoglin**

Die Bindung der Antikörper an lösliches Endoglin wurde mittels ELISA (*engl. Enzyme-linked-immunosorbent assay*) bestimmt. Hierfür wurde eine Maxisorb 96 well ELISA Platte über Nacht bei 4°C mit 0,5 µg/mL rekombinantem humanem löslichem Endoglin (Hycultec, Beutelsbach) beschichtet. Am nächsten Tag wurde

die Lösung abgekippt und die wells mit je 100  $\mu\text{L}$  Blockierlösung (DPBS + 10% Rinder-Serumalbumin) für 1 h bei RT inkubiert. Anschließend wurde dreimal gewaschen (Waschpuffer: DPBS + 0,05% Tween-20) und die Antikörper in verschiedenen Konzentrationen (in Waschpuffer verdünnt) für 1 h bei 37°C inkubiert. Nach einem vierfachen Waschschrift wurden die wells mit 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  des biotinylierten Detektionsantikörpers (Ziege-anti-Maus-Biotin), pro well in 50  $\mu\text{L}$  Waschpuffer (mit 5% BSA), für 1 h bei RT inkubiert. Im Anschluss wurde die Platte erneut viermal gewaschen und mit 50  $\mu\text{L}/\text{well}$  Streptavidin-HRP (1:5000 in Waschpuffer mit 2,5% BSA) für 30 min inkubiert. Nach erneutem fünffachem Waschen wurden die wells mit 100  $\mu\text{L}$  der TMB-Substratmischung versetzt und bei RT inkubiert. Nach ausreichender Inkubationszeit wurde die Farbreaktion mit 50  $\mu\text{L}/\text{well}$  1 M Phosphorsäure abgestoppt. Die Bestimmung der optischen Dichte erfolgte mittels Mikrotiterplattenmessgerät bei 450 nm.

### 2.5.4 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Zur Untersuchung der Reinheit, sowie des apparenten Molekulargewichts der Antikörper, bzw. der schweren und leichten Ketten, wurden die Immunglobuline mittels SDS-PAGE (*engl. sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis*) analysiert. Die vorherige Denaturierung des Proteins durch Aufkochen, sowie das im Gel enthaltene Detergenz SDS führen zur Linearisierung des Proteins. Somit kommt es zu einer Auftrennung nach Kettenlänge, welche proportional zur Molekülmasse ist.

Zur Analyse wurden 2  $\mu\text{g}$  des Antikörpers 1:2 mit dem Ladepuffer *Laemmli Sample Buffer* versetzt. Zur Generierung eines nicht-reduzierenden Ansatzes wurde der Ladepuffer pur verwendet. Zur Bestimmung des Molekulargewichts unter reduzierenden Bedingungen wurde der Ladepuffer 1:20 mit  $\beta$ -Mercaptoethanol versetzt. Anschließend wurden die Proben für 5 min bei 96°C aufgekocht. Das maximale Probenvolumen von 30  $\mu\text{L}$  konnte nun auf das Fertiggel *Mini-PROTEAN<sup>®</sup> TGX precast gel* aufgetragen werden. Als Laufpuffer diente der *Tris/Glycin/SDS Buffer* der Firma Biorad. Zur späteren Bestimmung der Bandengröße wurde der Marker *SeeBlue<sup>®</sup> Pre-Stained* der Firma Invitrogen mitgeführt. Die Gelelektrophorese erfolgte bei 120 V für circa 45 min.

Die Detektion der Proteinbanden erfolgte mittels Färbung in einer Coomassie Blue-Lösung für 1 h auf dem Schüttler. Anschließend wurde das Gel zweimal für je 30 min in einer Entfärbelösung auf dem Schüttler inkubiert. Die vollständige Entfärbung des Gels erfolgte in ddH<sub>2</sub>O über Nacht.

### 2.5.5 PNGase F-Verdau zur Identifizierung von posttranslationalen Glykosylierungen

Zur Entfernung der Verzuckerung von Antikörpern wurden die N-Glycane der Proteine mittels PNGase F (*engl. Peptid-N-Glycosidase F*, aus *Flavobacterium meningosepticum*) enzymatisch abgespalten.

Hierfür wurden 2  $\mu\text{g}$  Antikörper in 20  $\mu\text{L}$  PBS mit 1/10 Volumen Denaturierungspuffer versetzt und für 10 min bei 96°C inkubiert. Anschließend wurden der

Probe je 1/10 Volumen G7-Puffer und NP40 zugegeben. Danach wurde der Ansatz mit 250 U PNGase F für 1 h bei 37°C inkubiert. Als Kontrolle wurde eine entsprechende Probe des zu analysierenden Proteins mit den gleichen Puffern ohne Zugabe des Enzyms mitgeführt. Für die SDS-PAGE wurden die Ansätze mit dem Ladepuffer *Laemmli Sample Buffer* (1:20 mit  $\beta$ -Mercaptoethanol versetzt) für 5 min bei 96°C aufgekocht und anschließend auf das Gel aufgetragen.

### 2.5.6 Analytische Gelfiltration

Zur Untersuchung der Reinheit, sowie des spezifischen Molekulargewichts der Antikörper, wurden diese mittels Größenausschluss-Chromatographie (*engl. size-exclusion chromatography, SEC*) analysiert.

Unter Verwendung des ÄKTApurifiers wurden max. 10  $\mu\text{g}$  des Proteins in 50  $\mu\text{L}$  DPBS auf eine Superdex 200 10/300 GL Gelfiltrationssäule aufgetragen. Die Probe wurde im Laufpuffer DPBS mit einer Flussrate von 40  $\mu\text{L}/\text{min}$  über die Säule gegeben. Die Messung der optischen Dichte erfolgte bei 220nm und 280nm. Die Auswertung des Molekulargewichtes konnte anschließend mittels UNICORN control anhand einer Eichgerade unter Verwendung von Proteinen definierter Größe erfolgen (siehe Tabelle 2.16).

Tabelle 2.16: Auflistung der Eichproteine für die analytische Gelfiltration

Eichprotein	Größe [kDa]
Dextranblau	2000
Ferritin	440
Aldolase	158
Albumin	67
Ovalbumin	43
Chymotrypsinogen A	25
Ribonuclease A	13,7

### 2.5.7 Bestimmung der ADCC bzw. der CDC mittels $^{51}\text{Cr}$ -Freisetzungstest

Die Untersuchung der Antikörper-vermittelten zellulären Zytotoxizität auf ENG<sup>+</sup>-NALM-16 Zellen erfolgte mittels  $^{51}\text{Cr}$ -Freisetzungstest. Hierbei nehmen die Zielzellen unter Verwendung von  $^{51}\text{Cr}$ -Natriumchromat ( $\text{Na}_2\text{CrO}_4$ ) das radioaktiv-markierte  $^{51}\text{Cr}^{6+}$  auf, welches im Zytoplasma zu  $^{51}\text{Cr}^{3+}$  reduziert wird und an Aminosäuren bindet. Viable Zellen geben das im Zytoplasma gebundene, reduzierte  $^{51}\text{Cr}^{3+}$  nur sehr langsam ab. Die freigesetzte Menge an radioaktiv-markiertem  $^{51}\text{Cr}^{3+}$  im Zellkulturüberstand steht demnach, unter Berücksichtigung der spontanen  $^{51}\text{Cr}$ -Freisetzung, in linearer Abhängigkeit zur Zellyse und ist somit ein Maß der zellulären Zytotoxizität.

Zur radioaktiven Markierung der Zielzellen wurden  $1 \times 10^6$  NALM-16 Zellen mit  $150 \mu\text{Ci Na}_2\text{CrO}_4$  in 1 mL RPMI-Vollmedium für 1 h bei  $37^\circ\text{C}$  inkubiert. Anschließend wurden 11 mL RPMI-Vollmedium zu der Zellsuspension zugegeben und erneut für 1 h bei  $37^\circ\text{C}$  inkubiert. Um nicht aufgenommenes  $^{51}\text{Cr}$  zu entfernen, wurden die Zellen dreimal mit 12 mL RPMI-Vollmedium gewaschen (Zentrifugation:  $300 \times g$  für 5 min). Anschließend konnten mittels Multipette pro well  $5 \times 10^3$  radioaktiv-markierte NALM-16 Zellen in  $50 \mu\text{L}$  RPMI-Vollmedium in einer 96well-Rundbodenplatte ausgesät werden. Zur Bestimmung der Antikörper-vermittelten zellulären Zytotoxizität wurden pro well  $2,5 \times 10^5$  PBMC gesunder Spender in  $100 \mu\text{L}$  IMDM-Vollmedium mittels Multipette pipettiert (Verhältnis Effektor- zu Zielzellen 50:1). Anschließend wurde der Antikörper in unterschiedlichen Konzentrationen mittels Multipette in  $50 \mu\text{L}$  RPMI-Vollmedium pro well zugegeben. Die Ansätze wurden in einem Endvolumen von  $200 \mu\text{L}$  in Triplikaten getestet. Zur Bestimmung der 100%-Zellyse wurden die Zielzellen in einem Triplikat mit Triton X-100 mit einer Endkonzentration von 1% versetzt. Die Inkubation des Versuchsansatzes erfolgte bei  $37^\circ\text{C}$ , 5%  $\text{CO}_2$  und einer Luftfeuchte von 90% in einem  $\text{CO}_2$ -Brutschrank. Nach 4 h wurden mittels Mehrkanalpipette  $50 \mu\text{L}$ /well des Zellkulturüberstandes abgenommen und auf eine Feststoffszintillationsplatte transferiert. Die Feststoffszintillationsplatte wurde für 1 h im Trockenschrank bei  $53^\circ\text{C}$  oder über Nacht bei RT vollständig getrocknet. Die Messung des radioaktiv-markierten  $^{51}\text{Cr}$  erfolgte im Szintillationsmessgerät MicroBeta Counter 1450 Plus in cpm (*engl. counts per minute*). Zur Berechnung der spezifischen Zellyse wurde folgende Formel angewendet:

$$\% \text{ spezifische Lyse} = \frac{\text{cpm}_{\text{Probe}} - \text{cpm}_{\text{Spontanfreisetzung}}}{\text{cpm}_{\text{maximale Freisetzung}} - \text{cpm}_{\text{Spontanfreisetzung}}} * 100$$

Zur Untersuchung der Komplement-abhängigen Zytotoxizität (*engl. complement-dependent cytotoxicity, CDC*) wurden die Antikörperverdünnungen in humanem Serum gesunder Spender in  $100 \mu\text{L}$  hergestellt (Endkonzentration des Serums 1:2). Die PBMC wurden in diesem Versuchsansatz durch  $50 \mu\text{L}$  RPMI-Vollmedium ersetzt. Alle übrigen Arbeitsschritte wurden analog durchgeführt.

## 2.5.8 Bestimmung der Antikörper-vermittelten zellulären Zytotoxizität mittels Impedanzmessung

Die Untersuchung der Antikörper-vermittelten zellulären Zytotoxizität (*engl. antibody-dependent cellular cytotoxicity, ADCC*) auf den primären, adhärennten Endothelzellen HUVEC (*engl. human umbilical vein endothelial cells*) erfolgte mittels xCELLigence RTCA SP. Dieses System ermöglicht es, durch Messung der Impedanz in definierten Zeitabständen, Aussagen über die momentane Dichte des Monolayers der adhärennten Zellen treffen zu können. Das Absterben der Zellen steht dabei in direkter Abhängigkeit mit der sinkenden Impedanz.

Alle Arbeitsschritte wurden mit  $37^\circ\text{C}$ -vorgewärmten IMDM-Vollmedium, sowie mit einer auf  $37^\circ\text{C}$ -temperierten *E-Plate 96* durchgeführt. Die Bestimmung des Hintergrundes der *E-Plate 96* erfolgte durch Messung von  $50 \mu\text{L}$  IMDM-Vollmedium pro well. Anschließend wurden die geernteten HUVECs mit  $2 \times 10^5$  Zellen in  $50 \mu\text{L}$  IMDM-Vollmedium mittels Multipette auf der Platte ausgesät. Das Absetzen bzw.

Adhärenzen der Zellen erfolgte über 18 h und konnte durch Messung der Impedanz im Abstand von 15 min auf dem Monitor kontrolliert werden. Nachdem sich die adhärennten Zellen abgesetzt hatten, welches durch die konstante Impedanz zu erkennen war, konnten pro well  $1 \times 10^6$  PBMC gesunder Spender in 50  $\mu\text{L}$  IMDM-Vollmedium mittels Multipette pipettiert werden (Verhältnis Effektor- zu Zielzellen 50:1). Anschließend wurde der Antikörper in unterschiedlichen Konzentrationen in 50  $\mu\text{L}$  IMDM-Vollmedium pro well zugegeben. Die Ansätze wurden in Triplikaten getestet. Zur Bestimmung der 100%-Zellyse wurden die Zielzellen in einem Triplikat mit Triton X-100 in einer Endkonzentration von 1% versetzt. Die Messung der vorgewärmten Platte erfolgte über 24 h im Abstand von 10 min. Anschließend konnten die generierten Messwerte mit Hilfe der RTCA Software 1.2 ausgewertet werden. Die spezifische Zellyse errechnete sich nach folgender Formel:

$$\% \text{ spezifische Lyse} = \frac{\text{Impedanz}_{\text{Probe}} - \text{Impedanz}_{\text{Zielzelle}}}{\text{Impedanz}_{\text{maximale Zellyse}} - \text{Impedanz}_{\text{Zielzelle}}} * 100$$

# Kapitel 3

## Ergebnisse

### Inhaltsangabe

---

<b>3.1</b>	<b>Endoglin als vaskuläres Zielantigen . . . . .</b>	<b>69</b>
3.1.1	Immunhistologische Analyse der Endoglinexpression . . .	69
3.1.2	Generierung von $\alpha$ Endoglin-Antikörpern mittels Hybridomtechnik . . . . .	74
3.1.3	Funktionelle Evaluierung der generierten $\alpha$ Endoglin-Antikörper . . . . .	77
3.1.3.1	Kreuzreaktivität der neuen Antikörper mit Maus-Endoglin . . . . .	78
3.1.3.2	Antikörper zeigen deutliche Unterschiede im Titrationsverhalten . . . . .	79
3.1.3.3	Antikörper erzielen keine Verdrängung des Liganden TGF- $\beta$ 1 . . . . .	80
3.1.3.4	Bindung der neuen Antikörper an lösliches Endoglin . . . . .	81
3.1.3.5	Antigen-Modulation durch Bindung der $\alpha$ Endoglin-Antikörper . . . . .	82
3.1.3.6	Untersuchung der Spezifität für Tumorendothel .	83
3.1.3.7	Schwache Bindung an gesunde, hämatopoetische Vorläuferzellen . . . . .	88
3.1.3.8	Selektion von vier Antikörpern zur Chimärisierung	90
3.1.3.9	Gegenseitige Verdrängung ausgewählter $\alpha$ Endoglin-Antikörper . . . . .	91
3.1.4	Chimärisierung und SDIEM-Optimierung der $\alpha$ Endoglin-Antikörper . . . . .	92
3.1.4.1	Klonierung der $\alpha$ Endoglin-Antikörper . . . . .	92
3.1.4.2	Bestimmung der Reinheit und Homogenität . . .	94
3.1.5	Vergleich der chimärisierten $\alpha$ Endoglin-Antikörper mit dem Referenzmolekül TRC105 . . . . .	99

---

3.1.5.1	Vergleich des Titrationsverhaltens . . . . .	99
3.1.5.2	Chimärisierte $\alpha$ Endoglin-Antikörper binden ein anderes Epitop als TRC105 . . . . .	100
3.1.5.3	Vergleich der Tumorendothelspezifität der chi- märisierten $\alpha$ Endoglin-Antikörper mit TRC105 .	101
3.1.5.4	Keine Komplement-vermittelte Zytotoxizität . .	107
3.1.5.5	Deutliche Steigerung der ADCC durch SDIEM- optimierten Antikörper . . . . .	108
3.1.5.6	ADCC der optimierten $\alpha$ Endoglin-Antikörper auf primären Endothelzellen . . . . .	111
3.1.5.7	Immunhistologische Analyse des $\chi$ K-ro8SDIEM auf malignem Pankreasgewebe . . . . .	112
<b>3.2</b>	<b>Identifizierung neuer vaskulärer Zielantigene . . . . .</b>	<b>114</b>
3.2.1	W3C4E11 zeigt ein gefäß-typisches immunhistologisches Färbemuster . . . . .	114
3.2.2	Generierung von FZD9-exprimierenden Zelllinien . . . . .	115
3.2.3	Generierung FZD9-spezifischer Antikörper . . . . .	115
3.2.4	Vergleich beider Antikörper K-zd1 und W3C4E11 . . . . .	116
3.2.5	Chimärisierung des mIg $\mu$ -Antikörpers W3C4E11 . . . . .	117

---

## 3.1 Endoglin als vaskuläres Zielantigen

### 3.1.1 Immunhistologische Analyse der Endoglinexpression

Die immunhistochemische Charakterisierung stellt die Basis zur Bewertung insbesondere der Spezifität eines potentiellen Zielantigens zur Tumorthherapie dar. Im Folgenden werden Daten zur immunhistologischen Charakterisierung von Endoglin vorgestellt. Besonderes Augenmerk wurde dabei auf das vaskuläre Färbemuster, sowie die Überexpression auf Tumorendothel im Vergleich zu gesunden Blutgefäßen gelegt. Diese Untersuchungen wurden zum Vergleich der Spezifitäten von vier verschiedenen  $\alpha$ Endoglin-Antikörpern durchgeführt.

Hierfür wurden Gefrierschnitte von benignem und malignem humanem Nierengewebe angefertigt. Diese wurden mit den vier Maus- $\alpha$ Endoglin-Antikörpern SN6 (mIg $\gamma$ 1), MEM226 (mIg $\gamma$ 2a), Endo-1 (mIg $\gamma$ 1) und Endo-2 (mIg $\gamma$ 3) immunhistologisch angefärbt und bewertet. Zur Kontrolle eines vaskulären Färbemusters wurde ein Antikörper gewählt, welcher gegen das als pan-endothelialer Marker beschriebene Protein PECAM-1 (CD31) gerichtet ist.

**Endoglin ist vaskulär exprimiert** Durch die immunhistologischen Färbungen konnte für alle vier  $\alpha$ Endoglin-Antikörper ein vaskuläres Färbemuster auf humanem Gewebe bestätigt werden. Stellvertretend für die vier Antikörper ist in Abbildung 3.1 das immunhistologische Ergebnis für den Klon MEM226 auf einem Kryoschnitt eines Nierenzellkarzinoms dargestellt.

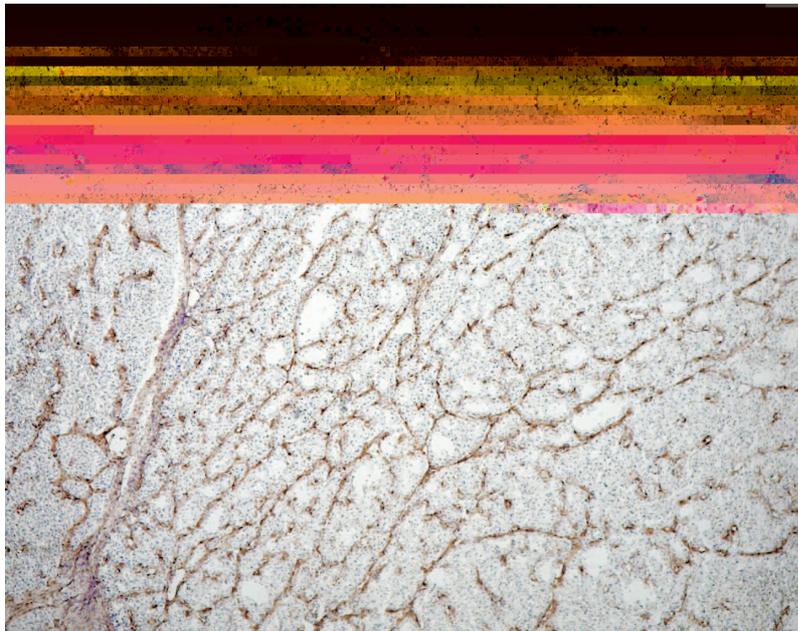


Abbildung 3.1: **Vaskuläres Färbemuster von Endoglin:** Immunhistologische Färbung des  $\alpha$ Endoglin-Antikörperklons MEM226 [1  $\mu$ g/mL] auf einem Nierenzellkarzinom (RCC251). Braun: spezifische Antikörperbindung; Detektion mittels HRP-Polymer und DAB-Färbung; blau: Gegenfärbung mit Hämatoxylin

**Überexpression von Endoglin auf Tumorendothel** Die differentielle Expression von Endoglin auf Tumorendothel und Endothelzellen des gesunden Gewebes wurde unter Verwendung von *human frozen tissue arrays* immunhistologisch analysiert. Bei dem verwendeten *array* konnten 14 unterschiedliche maligne Gewebetypen mit jeweils entsprechendem benignem Gewebe, welche auf dem selben Objektträger aufgebracht waren, simultan bearbeitet werden. In Tabelle 3.1 sind die Färbeintensitäten von zwei der vier  $\alpha$ Endoglin-Antikörperklone auf den verschiedenen Gewebetypen tabellarisch dargestellt.

Der Antikörper SN6 zeigte eine deutliche, spezifische Färbung auf dem Tumorendothel von Pankreas-, Skelettmuskel- und Hautgewebe. Die Endothelzellen des gesunden Gewebes wurden vor allem auf Lungengewebe und dem Ovar deutlich angefärbt. Betrachtet man alle 14 Gewebetypen im Überblick, ist die Färbeintensität und somit die Antigenexpression auf allen Tumorgeweben (mit Ausnahme der Leber) stärker, als auf den entsprechenden gesunden Gewebeschnitten. Vergleichbare Ergebnisse zeigte der Antikörper MEM226. Die beiden Klone Endo-1 und Endo-2 resultierten generell in einer schwächeren Färbung aller Gewebeproben. Allerdings konnte auch für diese beiden Antikörper eine etwas stärkere Färbung auf dem Tumorendothel der meisten Gewebe nachgewiesen werden.

Diese initialen immunhistologischen Färbungen bestätigten die beschriebene Überexpression von Endoglin auf den Tumor-versorgenden Blutgefäßen.

Tabelle 3.1: **Bewertung der immunhistologischen Färbung der  $\alpha$ Endoglin-Antikörperklone SN6 und Endo-2 auf einem *human frozen tissue array*:** Färbeintensitäten der  $\alpha$ Endoglin-Antikörper [je 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ] auf 14 verschiedenen Gewebetypen (jeweils maligne und benigne) des *human frozen tissue arrays*; -: keine Färbung +: schwache Färbung ++: mäßige Färbung +++: starke Färbung ++++: sehr starke Färbung, Beurteilung der Färbeintensität erfolgte durch zwei unabhängige Personen

	SN6		Endo-2	
	Gesundes Gewebe	Tumorgewebe	Gesundes Gewebe	Tumorgewebe
Gehirn	+	++	-	(+)
Brust	+	++	(+)	-
Kolon	+(+)	++	(+)	(+)
Niere	+(+)	+++	(+)	++
Leber	+	-	(+)	-
Lunge	++	+++	-	(+)
Pankreas	+	+++	(+)	+(+)
Prostata	(+)	+	(+)	-
Skelettmuskel	+	+++	++	-
Haut	(+)	+++	(+)	+
Dünndarm	(+)	+(+)	-	(+)
Magen	+(+)	++	(+)	+
Ovar	+++	++++	(+)	+
Uterus	+	++	-	(+)

**$\alpha$ Endoglin-Antikörper weisen unterschiedliche Spezifitäten für Tumorendothel auf** Im weiteren Vergleich der immunhistologischen Untersuchungen konnten teilweise deutliche Unterschiede im Färbemuster der vier Antikörper ermittelt werden. Mit Proben aus dem Skelettmuskel zeigten die beiden  $\alpha$ Endoglin-Antikörperklone SN6 und Endo-2 deutlich unterschiedliche Spezifitäten für das Endothel. In Abbildung 3.2 sind die immunhistologischen Färbungen der beiden Antikörperklone auf malignem und benignem Skelettmuskelgewebe dargestellt. SN6 zeigte eine sehr starke Färbung auf dem Endothel des Rhabdomyosarkoms, jedoch kaum auf den normalen Blutgefäßen. Im Vergleich hierzu, wurden die Endothelzellen des Normalgewebes durch Endo-2 stark angefärbt, jedoch konnte keine Färbung auf den Tumorgefäßen nachgewiesen werden.

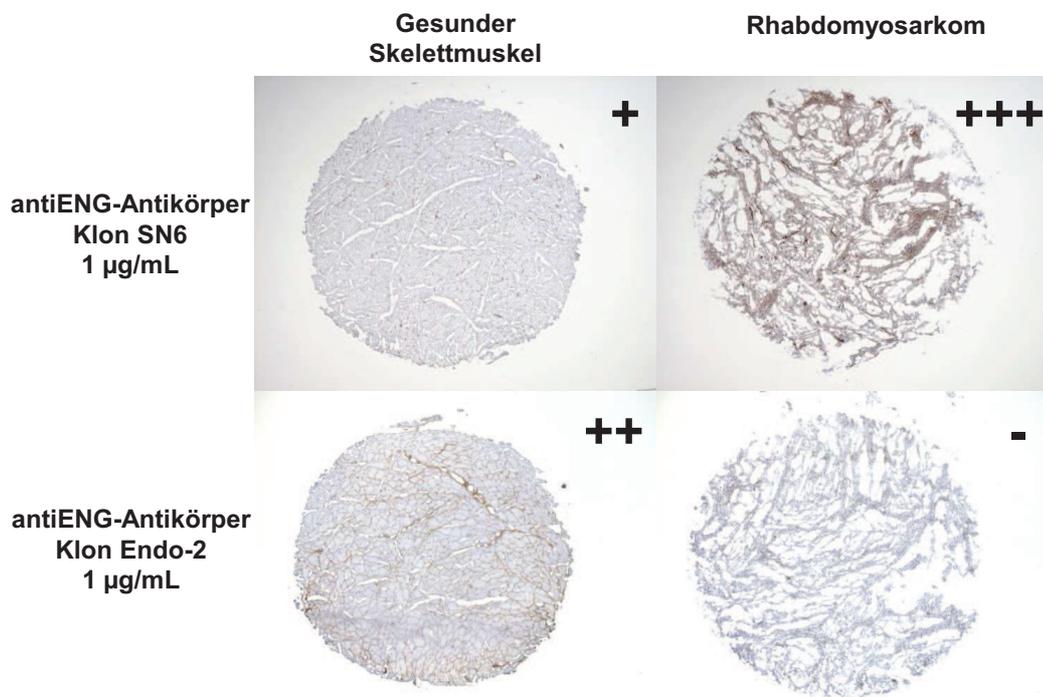


Abbildung 3.2: **Immunhistologischer Vergleich zweier  $\alpha$ Endoglin-Antikörper auf Skelettmuskel:** Färbung der  $\alpha$ Endoglin-Antikörperklone SN6 und Endo-2 (je 1  $\mu$ g/mL) auf benignem und malignem Skelettmuskel des *human frozen tissue arrays*. Die Detektion erfolgte mittels HRP-Polymer und DAB-Färbung. Bewertung der Braunfärbung als spezifische Antikörperbindung: (-) keine Färbung, (+) schwache Färbung, (++) mäßige Färbung, (+++) starke Färbung, (++++) sehr starke Färbung. Blaue Gegenfärbung der Zellkerne mittels Hämatoxylin

Parallel zu diesen immunhistologisch generierten Resultaten, wurden die vier  $\alpha$ Endoglin-Antikörper auf der humanen ENG<sup>+</sup>NALM-16 Zelllinie durchflusszytometrisch untersucht. Dabei konnten unterschiedliche maximale Fluoreszenzintensitäten und Affinitäten nachgewiesen werden (vgl. Abbildung 3.3).

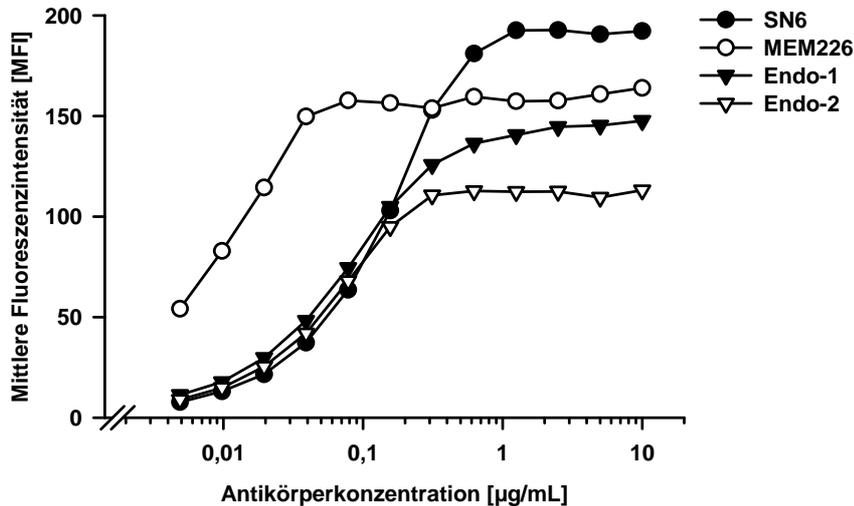


Abbildung 3.3: Durchflusszytometrische Analyse unterschiedlicher  $\alpha$ Endoglin-Antikörper auf NALM-16 Zellen: Titration verschiedener  $\alpha$ Endoglin-Antikörper auf der humanen ENG<sup>+</sup>NALM-16 Zelllinie. Sekundärreagenz: Ziege-anti-Maus-APC

Diese ersten Ergebnisse belegen zusammengefasst die bereits beschriebene vaskuläre Expression von Endoglin. Gleichzeitig konnte die Überexpression des Proteins auf Tumorendothel im Vergleich zu gesunden Blutgefäßen bestätigt werden. Dabei zeigten die verwendeten Antikörper allerdings deutliche Unterschiede in der Anfärbung der benignen und malignen Gewebeschnitte. Dies führte zu der Hypothese, dass das durch den Antikörper erkannte Epitop des Antigens die Spezifität der Antikörper für das Tumorendothel stark beeinflusst. Die Vorstellung, andere  $\alpha$ Endoglin-Antikörper mit verbesserter Spezifität für Tumorendothel generieren zu können, erschien damit plausibel.

### 3.1.2 Generierung von $\alpha$ Endoglin-Antikörpern mittels Hybridomtechnik

**Generierung einer Endoglin-exprimierenden Zelllinie** Zur Generierung neuer  $\alpha$ Endoglin-Antikörper mit verbesserter Tumorendothelspezifität, wurde zur Immunisierung von Mäusen eine Endoglin-exprimierende Sp2/0-Ag14 Zelllinie hergestellt. Abbildung 3.4 zeigt die durchflusszytometrisch analysierte Endoglin-Expression untransfizierter Sp2/0-Ag14-Zellen, sowie der generierten Transfektante in Histogrammen.

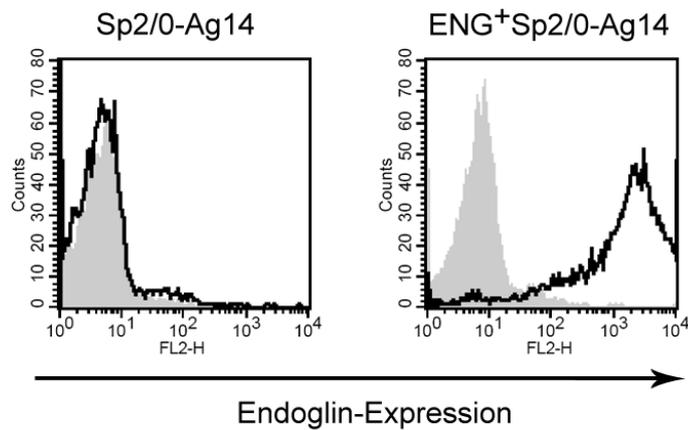


Abbildung 3.4: **Endoglin-Expression der generierten Sp2/0-Ag14 Transfektante:** Durchflusszytometrische Analyse von Sp2/0-Ag14 Zellen, sowie den generierten  $\text{ENG}^+$ Sp2/0-Ag14 Transfektanten mittels  $\alpha$ Endoglin-Antikörperklon SN6 (schwarze Linie) und mIg $\gamma$ 1-Isotyp (grau gefüllt) mit je 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . Sekundärreagenz: Ziege-anti-Maus-PE

Aus den Histogrammen wird deutlich, dass die untransfizierten Sp2/0-Ag14-Zellen kein humanes Endoglin auf der Oberfläche exprimieren. Nach Transfektion dieser Maus-Myelomzelllinie konnte dagegen eine starke Antigenexpression nachgewiesen werden.

**Immunisierung von Mäusen und chemische Zellfusion** Zur Herstellung von Hybridomen wurden die generierten Endoglin-exprimierenden Sp2/0-Ag14-Zellen zur Immunisierung von Mäusen (BALB/c) verwendet. Die Immunisierung mit dieser syngenen Zelllinie sollte die Anzahl an Endoglin-spezifischen B-Zellen maximieren bzw. die Immunantwort gegen nicht-syngene Oberflächenproteine verhindern. Zur Erhöhung der Immunogenität wurden die Zellen mit dem Adjuvants CpG (Ligand für TLR9, *engl. toll-like receptor 9*) intraperitoneal appliziert. Insgesamt wurden 18 Mäuse immunisiert und deren vereinzelte Milzzellen in 18 unabhängigen chemischen Fusionen mit der Mausmyelomzelllinie Sp2/0-Ag14 nach Köhler und Milstein eingesetzt [Köhler und Milstein, 1975].

**Die generierten Hybridome sind spezifisch für Endoglin** Im Rahmen dieser Arbeit konnten insgesamt 21 neue  $\alpha$ Endoglin-Antikörper aus vier unabhängigen Fusionen hergestellt werden (Namensgebung: mK-ro2 bis mK-ro23, siehe Tabelle 3.2). Dabei erfolgte die Identifizierung dieser generierten Hybridome mittels

Durchflusszytometrie. Die Zellkulturüberstände wurden auf verschiedenen Zelllinien analysiert. Alle generierten Antikörperklone zeigten eine spezifische Bindung auf ENG<sup>+</sup>Zellen (Endoglin-exprimierende Sp2/0-Ag14; NALM-16) und keine Bindung auf ENG<sup>-</sup>Zellen [mit irrelevantem Antigen (OX40) transfizierte Sp2/0-Ag14 Zelllinie]. Exemplarisch sind in Abbildung 3.5 die durchflusszytometrischen Resultate der Fusionen Nr. 17 und Nr. 18 dargestellt.

Nach Subklonierung der Hybridome wurden die Isotypen der 21 neuen Mausantikörper bestimmt. Die Isotypen mIg $\mu$  und mIg $\gamma$ 1 konnten durchflusszytometrisch mittels spezifischer Sekundärreagenzien ermittelt werden. Alle übrigen Subtypen wurden mit Hilfe des *Iso-Gold<sup>TM</sup> Rapid Mouse Monoclonal Isotyping Kits* bestimmt. Die zwölf Antikörper des mIg $\gamma$ -Isotyps wurden anschließend zur weiteren Charakterisierung aus Zellkulturüberstand mittels Affinitätschromatographie an Protein A aufgereinigt.

In Tabelle 3.2 sind die 21 generierten  $\alpha$ Endoglin-Antikörperklone mK-ro bezüglich Fusionsnummer, ursprünglicher Nomenklatur und Isotyp aufgelistet.

Tabelle 3.2: Übersicht der generierten  $\alpha$ Endoglin-Antikörperklone mK-ro bezüglich Isotyp, Fusionsnummer und Nomenklatur: Die Antikörper des mIg $\gamma$ -Isotyps sind fett gedruckt.

[htbp] Fusionsnr.	Klon	Bezeichnung	Isotyp
F9	8H3 4D10	<b>mK-ro2</b>	<b>mIg<math>\gamma</math>1</b>
F16	5H11 8C6	mK-ro4	mIg $\mu$
F17	3E9 1B4	mK-ro5	mIg $\mu$
F17	3C4 1B3	mK-ro6	mIg $\mu$
F17	2A5 1C1	mK-ro7	mIg $\mu$
F17	4B10 3G4	<b>mK-ro8</b>	<b>mIg<math>\gamma</math>1</b>
F17	5D6 1A7	<b>mK-ro9</b>	<b>mIg<math>\gamma</math>2a</b>
F17	2E4 1A11	<b>mK-ro10</b>	<b>mIg<math>\gamma</math>2a</b>
F17	2B3 1B5	<b>mK-ro11</b>	<b>mIg<math>\gamma</math>2a</b>
F17	2C3 1G5	<b>mK-ro12</b>	<b>mIg<math>\gamma</math>2a</b>
F17	3D5 1A5	<b>mK-ro13</b>	<b>mIg<math>\gamma</math>2a</b>
F18	3F11 1D9	mK-ro14	mIg $\mu$
F18	4G4 1E7	mK-ro15	mIg $\mu$
F18	6B2 1H11	mK-ro16	mIg $\mu$
F18	3F11 3D11	mK-ro17	mIg $\mu$
F18	4E10 2C8	mK-ro18	mIg $\mu$
F18	6D4 1B1	<b>mK-ro19</b>	<b>mIg<math>\gamma</math>1</b>
F18	4F3 2H12	<b>mK-ro20</b>	<b>mIg<math>\gamma</math>2a</b>
F18	5E6 2D9	<b>mK-ro21</b>	<b>mIg<math>\gamma</math>2a</b>
F18	6A8 1C10	<b>mK-ro22</b>	<b>mIg<math>\gamma</math>2a</b>
F18	6G4 1D8	<b>mK-ro23</b>	<b>mIg<math>\gamma</math>2b</b>

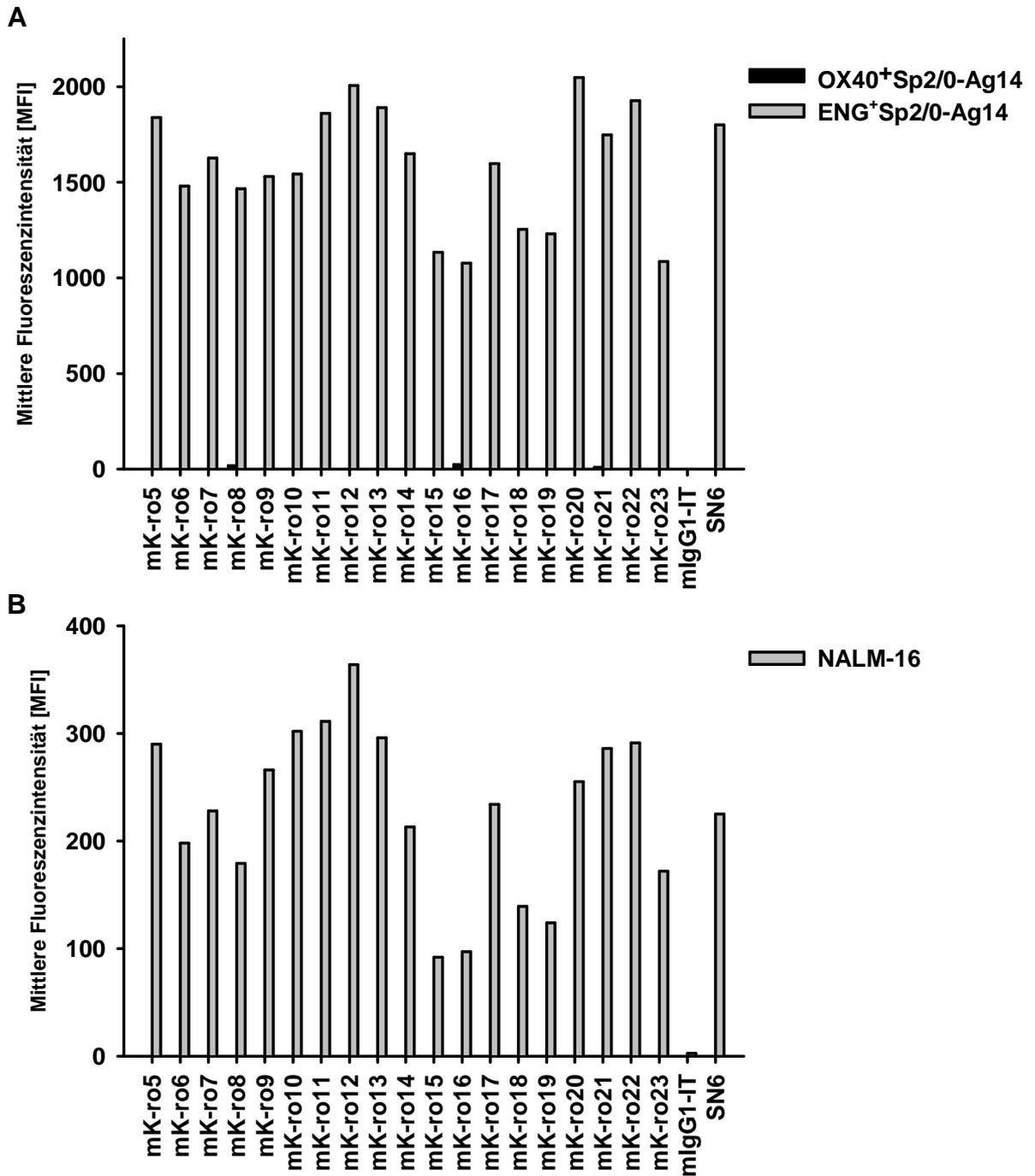


Abbildung 3.5: Durchflusszytometrische Analyse der generierten  $\alpha$ Endoglin-Antikörper aus Fusion Nr. 17 und Nr. 18: Zur Untersuchung der Spezifität für Endoglin wurden die unverdünnten Zellkulturüberstände der generierten Hybridome durchflusszytometrisch auf den ENG<sup>+</sup>Zelllinien (A: Endoglin-exprimierende Sp2/0-Ag14 Transfektante; B: NALM-16), sowie in A auf der mit irrelevantem Antigen transfizierten ENG<sup>-</sup>Zelllinie (OX40-exprimierende Sp2/0-Ag14 Transfektante) untersucht. Sekundärreagenz: Ziege-anti-Maus-APC

#### 3.1.3 Funktionelle Evaluierung der generierten $\alpha$ Endoglin-Antikörper

Für den Erfolg des Therapieansatzes, sowie die weitgehende Vermeidung potentieller Nebenwirkungen sind verschiedenste Aspekte zur Bewertung eines potentiellen therapeutischen Antikörpers wichtig. Die Charakterisierung der generierten  $\alpha$ Endoglin-Antikörper erfolgte daher anhand folgender kritischer Parameter:

- Kreuzreaktivität mit Maus-Endoglin für potentielle *in vivo*-Versuche
- Affinität der Antikörper an Endoglin, sowie maximal-erreichbare Fluoreszenzindices
- Untersuchung einer potentiellen Interaktion der Antikörper mit dem Liganden TGF- $\beta$ 1
- Antikörperbindung an die im humanem Serum zirkulierende lösliche Variante von Endoglin
- eventueller Antigenverlust über Internalisierung oder Abscherung von Endoglin nach Antikörperbindung
- Spezifität für das Tumorendothel im Vergleich zum gesunden Blutgefäßsystem
- Antikörperbindung an ENG<sup>+</sup>-hämatopoetische Vorläuferzellen des Knochenmarks

Anhand dieser im Folgenden dargestellten Untersuchungen erfolgte die anschließende Selektion von vier der neuen  $\alpha$ Endoglin-Antikörper zur Chimärisierung und Fc-Optimierung.

### 3.1.3.1 Kreuzreaktivität der neuen Antikörper mit Maus-Endoglin

Im Rahmen der Entwicklung und präklinischen Testung neuer Therapeutika ist die Maus ein noch immer weit verbreitetes Modellsystem. Kreuzreaktive Antikörper können dabei auf Effektivität und eventuelle Toxizität *in vivo* untersucht werden. Daher ist es von Interesse, die 21 generierten Antikörper auf eine potentielle Kreuzreaktivität mit Maus-Endoglin (mENG) zu untersuchen.

Hierfür wurden die mIg-Konzentrationen der antikörperhaltigen Zellkulturüberstände aller Antikörper mittels ELISA bestimmt. Anschließend konnten die Klone mit einer auf 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  eingestellten Verdünnung des Zellkulturüberstands auf der mENG<sup>+</sup>Zelllinie B16 durchflusszytometrisch analysiert werden. Als Positivkontrolle diente der direkt-markierte kommerzielle  $\alpha$ Maus-Endoglin Antikörperklon MJ7/18. Die Abbildung 3.6 zeigt, dass für keinen der getesteten Antikörper eine Bindung an B16 Zellen gezeigt werden konnte. Eine signifikante Kreuzreaktivität mit Maus-Endoglin liegt demnach bei keinem Antikörper vor.

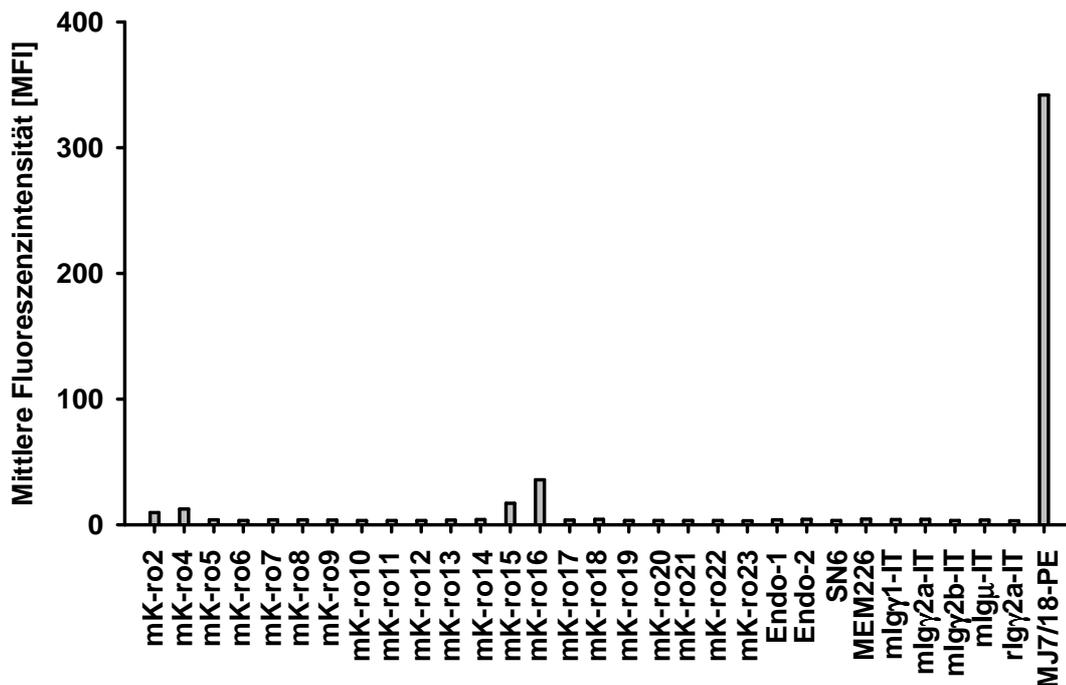


Abbildung 3.6: **Kreuzreaktivität der  $\alpha$ Endoglin-Antikörper mit Maus-Endoglin (mENG):** Durchflusszytometrische Untersuchung der Zellkulturüberstände aller generierten Hybridome (Antikörperkonzentration: ca. 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ), sowie der bekannten  $\alpha$ Endoglin-Antikörper (Endo-1, Endo-2, SN6, MEM226; je 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) auf der mENG<sup>+</sup>Zelllinie B16. Positivkontrolle: Ratte-anti-mENG MJ7/18-PE; Isotypkontrolle: Ratte-anti-Maus rIgy2a-IT-PE, mIgy1-IT, mIgy2a-IT, mIgy2b-IT, mIgy $\mu$ -IT; Sekundärreagenz: Ziege-anti-Maus-PE

### 3.1.3.2 Antikörper zeigen deutliche Unterschiede im Titrationsverhalten

Die zwölf mittels Affinitätschromatographie an Protein A aufgereinigten Antikörper des mIg $\gamma$ -Isotyps wurden bezüglich ihres Titrationsverhaltens mit dem kommerziellen  $\alpha$ Endoglin-Antikörperklon SN6 verglichen. Hierfür wurde die Konzentrationsabhängige Bindung auf der ENG<sup>+</sup>NALM-16 Zelllinie mittels Durchflusszytometrie untersucht. Es konnten erhebliche Unterschiede in maximaler Fluoreszenzintensität, also der maximalen Anzahl an gebundenen Antikörpermolekülen an Endoglin, sowie in der Affinität zwischen den einzelnen Antikörpern nachgewiesen werden (siehe Abbildung 3.7). Für mK-ro22 und mK-ro11 lag die maximale Fluoreszenzintensität mit ca. 180 MFI (*engl. mean fluorescence intensity*) am höchsten. Diese zeigten auch die stärkste Affinität. Für mK-ro8 und mK-ro23 konnten maximale Fluoreszenzintensitäten zwischen 90 MFI und 120 MFI gemessen werden. Der Antikörperklon mK-ro19 konnte aufgrund einer sehr schwachen Affinität selbst bei einer Konzentration von 5  $\mu$ g/mL keine Sättigung des Antigens erreichen. Der kommerzielle SN6 lag mit Affinität und maximaler Fluoreszenzintensität von ca. 140 MFI im oberen Drittel der getesteten Antikörper.

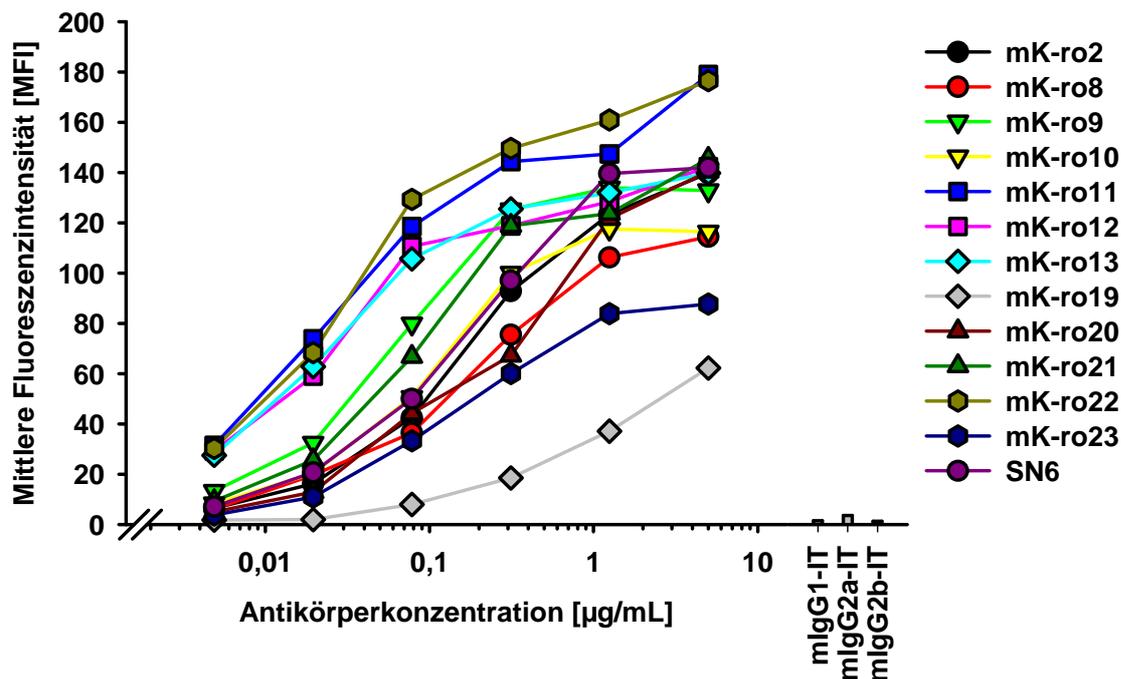


Abbildung 3.7: Titrationsverhalten der zwölf aufgereinigten  $\alpha$ Endoglin-Antikörper des mIg $\gamma$ -Isotyps, sowie des kommerziellen SN6 auf ENG<sup>+</sup>NALM-16 Zellen: Übersichtshalber wurde nur jeder zweite durchflusszytometrisch generierte Messpunkt graphisch dargestellt; Sekundärreagenz: Ziege-anti-Maus-PE

### 3.1.3.3 Antikörper erzielen keine Verdrängung des Liganden TGF- $\beta$ 1

Endoglin ist ein akzessorischer Co-Rezeptor des TGF- $\beta$ -Rezeptorkomplexes. Dabei führt die Bindung des entsprechenden Liganden TGF- $\beta$ 1 an diesen Komplex zur Proliferation der Endothelzellen. Die Blockierung dieser Liganden-Rezeptor-Interaktion könnte diese Induktion unterbinden und somit anti-angiogenetisch wirken. Demnach wurde untersucht, ob die Bindung der  $\alpha$ Endoglin-Antikörper die Bindung von TGF- $\beta$ 1 an seinen Rezeptor verhindern können.

Hierfür wurde die ENG<sup>+</sup>NALM-16 Zelllinie mit je 10  $\mu$ g/mL der Antikörper vorinkubiert. Anschließend folgte die Färbung mit dem Biotin-markierten rekombinanten humanen Liganden rhTGF- $\beta$ 1 nach Herstellerangaben. Die durchflusszytometrischen Ergebnisse sind im Balkendiagramm in Abbildung 3.8 dargestellt. Es wurde gezeigt, dass keiner der getesteten  $\alpha$ Endoglin-Antikörperklone die Bindung des Liganden TGF- $\beta$ 1 und somit die intrazelluläre Weiterleitung des pro-angiogenetischen Signals verhindern konnte.

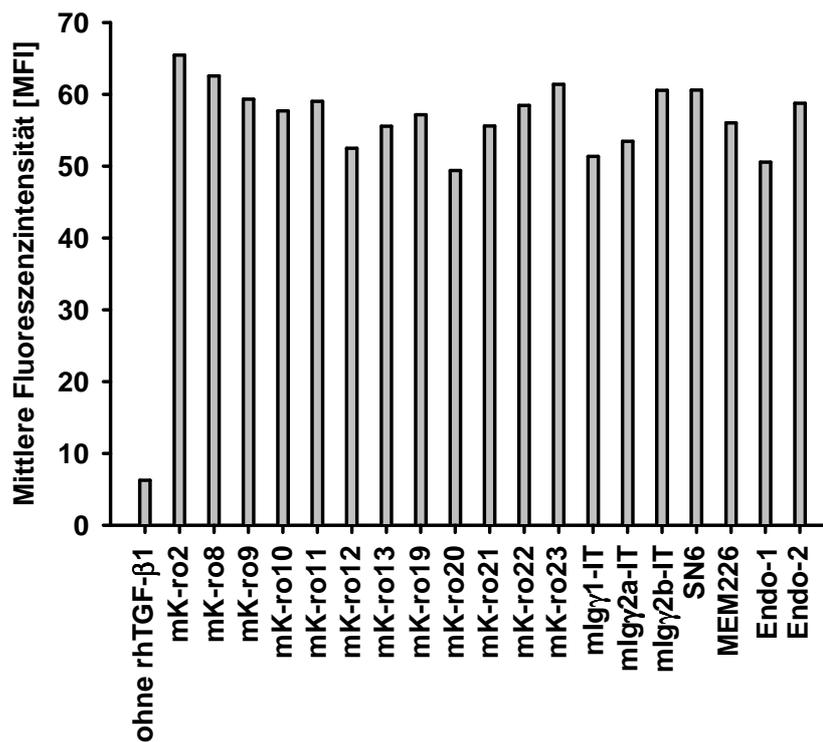


Abbildung 3.8: **Keine Verdrängung des Liganden TGF- $\beta$ 1 durch Bindung der  $\alpha$ Endoglin-Antikörper:** Vorinkubation der ENG<sup>+</sup>NALM-16 Zelllinie mit Antikörperklonen mK-ro, sowie SN6, MEM226, Endo-1 und Endo-2 [je 10  $\mu$ g/mL]. Verwendung des Biotin-markierten rhTGF- $\beta$ 1 nach Herstellerangaben

## 3.1.3.4 Bindung der neuen Antikörper an lösliches Endoglin

Das Membranprotein Endoglin tritt ebenfalls in löslicher Form im menschlichen Körper auf. Die Bindung an diese lösliche Variante könnte sich bei einer potentiellen therapeutischen Anwendung negativ auf die Effektivität des Antikörpers auswirken.

Um potentielle Unterschiede der generierten Antikörper in der Bindung des löslichen Endoglins aufzudecken, wurde diese Interaktion mittels ELISA analysiert. Wie in Abbildung 3.9 dargestellt, binden alle zwölf generierten  $\alpha$ Endoglin-Antikörperklone des mIg $\gamma$ -Isotyps, sowie SN6 an die lösliche Form von Endoglin und sind somit nicht spezifisch für die membranständige Variante des Proteins.

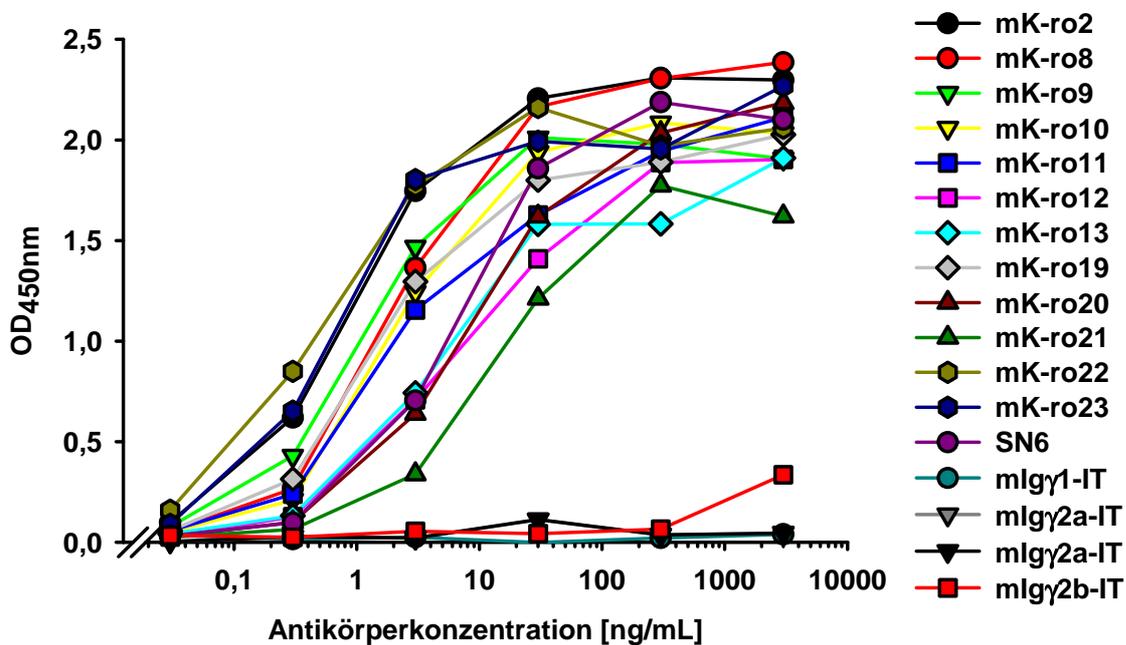


Abbildung 3.9: Bindung der Antikörperklone mK-ro und SN6 an lösliches Endoglin: Untersuchung der Konzentrations-abhängigen Bindung der  $\alpha$ Endoglin-Antikörper an die lösliche Form von Endoglin (sENG) mittels ELISA. Detektion über einen biotinylierten Ziege-anti-Mausantikörper und Streptavidin-HRP.

### 3.1.3.5 Antigen-Modulation durch Bindung der $\alpha$ Endoglin-Antikörper

Die Expression eines Antigens kann durch Bindung von Antikörpern moduliert werden. Dabei wird das Antigen entweder internalisiert oder von der Zelloberfläche abgeschert. Dieser Vorgang ist als Antigen-Modulation oder auch *antigen shift* bekannt. Eine solche Internalisierung oder Abscherung von Endoglin von der Zellmembran der Endothelzellen würde bei einem potentiellen therapeutischen Einsatz der Antikörper zur Beeinträchtigung der Wirkung führen.

Um festzustellen, ob die Epitop-Bindung der generierten Antikörper über mehrere Stunden zur Internalisierung oder Abscherung des Antigens führen kann, wurden ENG<sup>+</sup>NALM-16 Zellen mit ansteigenden Antikörperkonzentrationen für 26 h in Kulturmedium vorinkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit einer sättigenden Antikörperkonzentration von 2  $\mu\text{g}/\text{mL}$  inkubiert und durchflusszytometrisch analysiert. Aus Abbildung 3.10 wird deutlich, dass der kommerzielle Klon SN6 mit ca. 45% den größten Antigen-Verlust auf der Oberfläche induziert. Der Antikörper mK-ro8 zeigte einen Verlust des Oberflächenproteins Endoglin von ca. 35%. Die langfristige Bindung aller übrigen getesteten Klone resultierte in keiner Verminderung der Endoglinexpression.

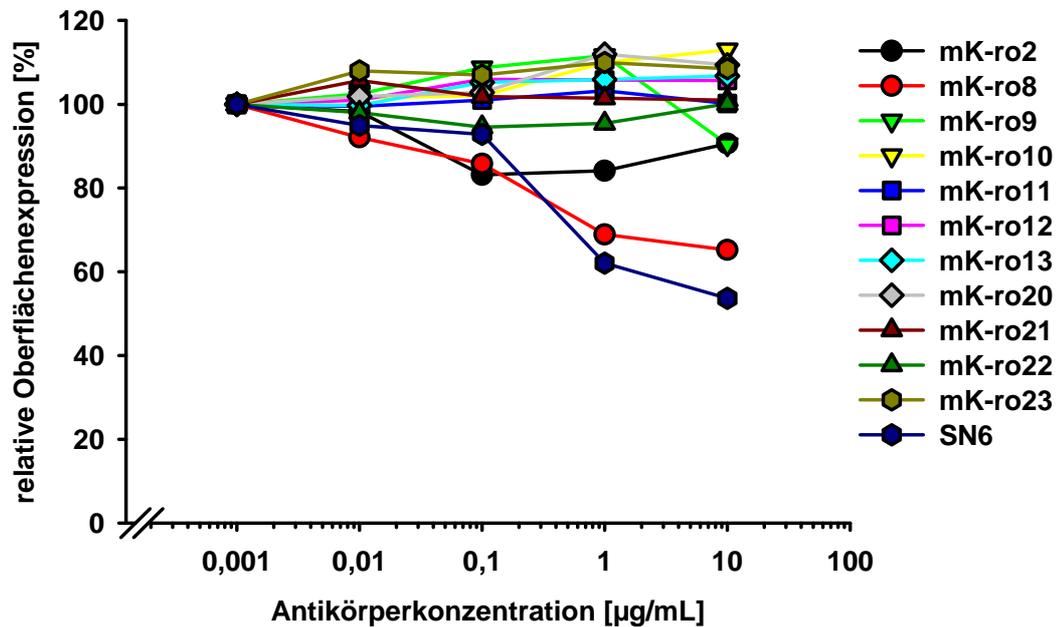


Abbildung 3.10: Durchflusszytometrische Analyse der Endoglinexpression nach Bindung der aufgereinigten  $\alpha$ Endoglin-Antikörper: Vorinkubation der ENG<sup>+</sup>NALM-16 Zelllinie mit ansteigender Antikörperkonzentration für 26 h. Die Färbung erfolgte mit einer sättigenden Antikörperkonzentration von 2  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . Sekundärreagenz: Ziege-anti-Maus-PE

#### 3.1.3.6 Untersuchung der Spezifität für Tumorendothel

Die wichtigste Eigenschaft eines neuen Antikörpers zur potentiellen anti-angiogenetischen Tumorthherapie ist die Spezifität für die Tumor-versorgenden Gefäße im Vergleich zu dem gesunden Blutgefäßsystem des Körpers. Die Bindung der  $\alpha$ Endoglin-Antikörper auf dem Endothel von normalem und malignem Gewebe konnte unter Verwendung zweier komplementärer Methoden analysiert werden.

**Immunhistologische Bewertung der  $\alpha$ Endoglin-Antikörper auf normalen und malignen Nierenschnitten** Die Beurteilung der Spezifität für Tumorendothel erfolgte unter anderem anhand der semi-quantitativen Immunhistologie. Hierbei wurden Kryoschnitte von Nierenzellkarzinom und kommerziell erhältlichem normalem Nierengewebe angefertigt und gefärbt. Als Positivkontrolle diente ein  $\alpha$ CD31-Antikörper (PECAM-1), welcher pan-endothelial bindet.

Es konnte für alle zwölf aufgereinigten Antikörper ein vaskuläres Färbemuster auf der Niere nachgewiesen werden. Für die Klone mK-ro8 und mK-ro23 ergab sich der größte Färbeintensitätsunterschied zwischen dem Normal- und Tumorgewebe. Generell erschien die Farbintensität dieser beiden Antikörper schwächer zu sein, als beispielsweise die des mK-ro22. Dieses Molekül resultierte in einer starken Färbung auf dem gesunden Endothel, sowie einer sehr starken Färbung des Tumorendothels. Der  $\alpha$ Endoglin-Antikörper SN6 führte zu einer etwas schwächeren Färbung, jedoch wie bei den meisten Antikörpern, zu einer Reaktion nicht nur mit dem Endothel des malignen Gewebes, sondern auch mit gesunden Blutgefäßen. Diese semi-quantitativen, immunhistologischen Färbungen der zwölf generierten Antikörper wurden durch zwei Personen am Mikroskop bewertet.

**Durchflusszytometrische Analyse der  $\alpha$ Endoglin-Antikörper auf benignen und malignen primären Nierenzellen** Die Tumorendothel-Spezifität der generierten  $\alpha$ Endoglin-Antikörper konnte neben den immunhistologischen Färbungen von Gewebeschnitten zusätzlich durch die quantitative Analyse von primären Nierenzellen im Durchflusszytometer beurteilt werden. Weiterhin ermöglicht diese Methode die Untersuchung der Antikörperbindung ausschließlich an die extrazelluläre Domäne von Endoglin, eventuell cytoplasmatisch vorhandenes Protein (das immunhistologisch ebenfalls nachgewiesen wird) wird hierbei nicht detektiert. Für diese Experimente wurde Nierenzellkarzinom und entsprechendes benignes Gewebe der Niere aus Patienten des Universitätsklinikums Tübingen untersucht. Die Gewebe wurden direkt nach Entnahme mittels enzymatischem Verdau in eine Einzelzellsuspension gebracht und anschließend kryokonserviert.

Um die Bindung der  $\alpha$ Endoglin-Antikörper auf primären Endothelzellen zu bestimmen, wurden die aufgetauten benignen und malignen Nierenzellen nach einer von Dipl.-Biochem. Heiko Schuster etablierten Kombination von Fluorochrom-markierten Antikörpern angefärbt und durchflusszytometrisch untersucht. In Abbildung 3.11 ist die *gating*-Strategie der primären Nierenzellen exemplarisch dargestellt. Ausgehend von viablen, kernhaltigen Einzelzellen wurden dabei zunächst  $CD45^+$ -hämatopoetische Zellen von der Analyse ausgeschlossen. Innerhalb der  $CD45^-$ -Population konnten frühe Endothelzellen als  $CD31^+CD34^{high}$  indentifiziert werden.

Insgesamt wurden die Nieren- bzw. Tumorzellen von drei Spendern auf Bindung der  $\alpha$ Endoglin-Antikörper untersucht. In den Abbildungen 3.12 und 3.13 sind die spezifischen Fluoreszenzindices (SFI) der Antikörperbindung an  $CD45^-CD31^+CD34^{high}$ -Endothelzellen aller drei Spender dargestellt.

In Abbildung 3.12 A wurden die primären benignen und malignen Zellen eines Patienten mit klarzelligem Nierenzellkarzinom (#792) analysiert. Bei diesen Färbungen konnten sehr hohe Fluoreszenzintensitäten erreicht werden. Der Antikörper mK-ro8 zeigte mit einem spezifischen Fluoreszenzindex von über 40 mit Abstand die stärkste Bindung auf dem Tumorendothel. Für mK-ro2, mK-ro23 und SN6 wurden SFI von knapp über 20 bestimmt. Für die übrigen, getesteten Antikörper konnte nur eine relativ schwache Bindung auf den malignen Endothelzellen nachgewiesen werden (SFI: 10-15). Dieses Verhältnis spiegelte sich ebenfalls in der Bindung der Antikörper auf den entsprechenden gesunden Endothelzellen wieder. Jedoch wiesen die Moleküle hierbei eine deutlich schwächere Bindung auf (SFI zwischen 2 und 14).

Für die Zellen des Patienten #803 (vgl. Abbildung 3.12 B) wurde ebenfalls ein hoher SFI für mK-ro8 bestimmt (SFI 13). Jedoch zeigte der Klon mK-ro23 bei diesen Patientenzellen eine ähnlich starke Bindung auf dem Tumorendothel. Im Vergleich zu den Patientenzellen #792 wurde, im Verhältnis zu den anderen getesteten Antikörperklonen, auf den Zellen #803 eine stärkere Bindung des mK-ro22 nachgewiesen.

Die Bindungsstärke auf den Patientenzellen #776 (vgl. Abbildung 3.13) konnte nur für fünf Antikörper bestimmt werden. Diese entsprachen im Verhältnis zueinander den Ergebnissen von #792 und #803.

### 3.1. ENDOGLIN ALS VASKULÄRES ZIELANTIGEN

Zusammenfassend ist die Antikörperbindung des mK-ro8 auf dem Tumorendothel aller drei Spender am stärksten. An zweiter Stelle steht der Antikörperklon mK-ro23. Für die drei Antikörper mK-ro2, mK-ro22, sowie dem kommerziellen Referenzantikörper SN6 konnten mittlere Bindungsstärken nachgewiesen werden. Das Verhältnis der Bindungsintensitäten aller Klone untereinander spiegelt sich mit kleineren Unterschieden auf dem Normalgewebe wieder. Die übrigen getesteten Klone resultierten in einer vergleichsweise schwachen Bindung auf gesundem und Tumorendothel.

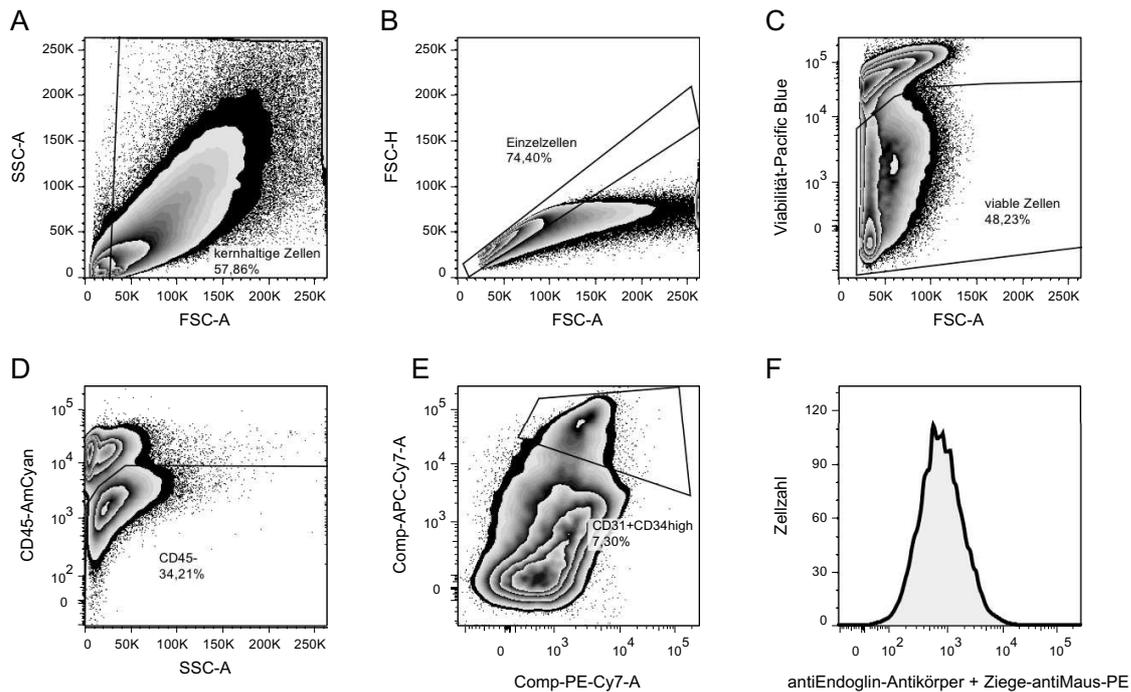


Abbildung 3.11: **Gating-Strategie der primären Nierenzellen:** Bindung der  $\alpha$ Endoglin-Antikörper auf  $CD45^-CD31^+CD34^{high}$ -Endothelzellen der primären Nierenzellsuspension. **A:** *gating* der kernhaltigen Zellen; **B:** *gating* der Einzelzellen; **C:** *gating* der viablen Zellen über den Farbstoff Violet LIVE/DEAD; **D:** Ausschluss der  $CD45^+$ -hämatopoetischen Zellen über den AmCyangekoppelten  $\alpha$ CD45-Antikörper; **E:** *gating* der  $CD31^+CD34^{high}$ -Endothelzellen mittels  $\alpha$ CD31-PE-Cy7 und  $\alpha$ CD34-APC-Cy7; **F:** Bindung der  $\alpha$ Endoglin-Antikörper; Sekundärantikörper: Ziege-anti-Maus-PE

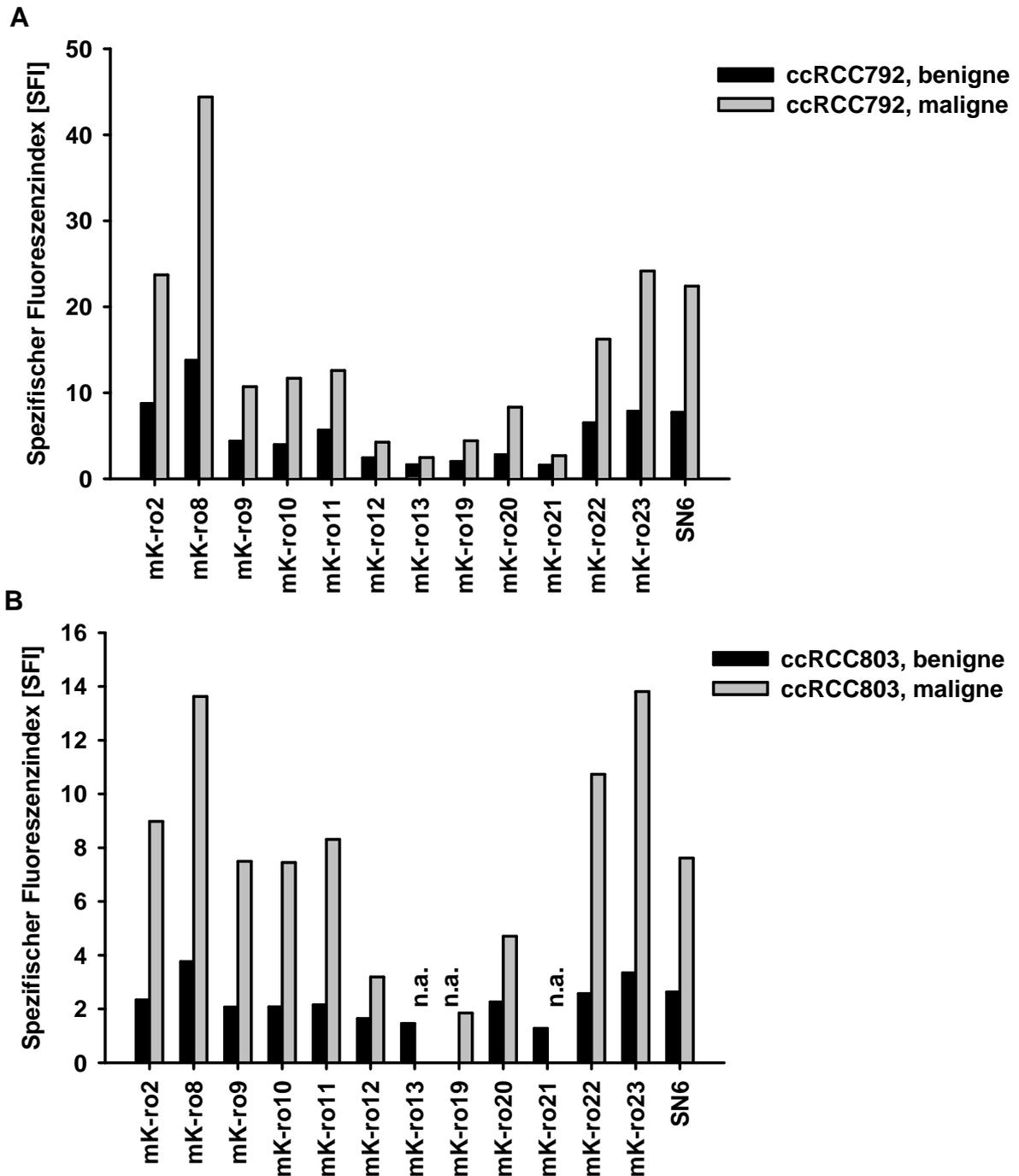


Abbildung 3.12: Bindung der  $\alpha$ Endoglin-Antikörper auf primären CD45<sup>-</sup>CD31<sup>+</sup>-CD34<sup>high</sup> Endothelzellen der Niere: A: Endoglin-Expression der Endothelzellen benigner und maligner Nierenzellen (Spender: #RCC792) B: Endoglin-Expression der Endothelzellen benigner und maligner Nierenzellen (Spender: #RCC803); Antikörperkonzentration: 5  $\mu$ g/mL; Sekundärreagenz: Ziege-anti-Maus-PE; n.a.: nicht analysiert

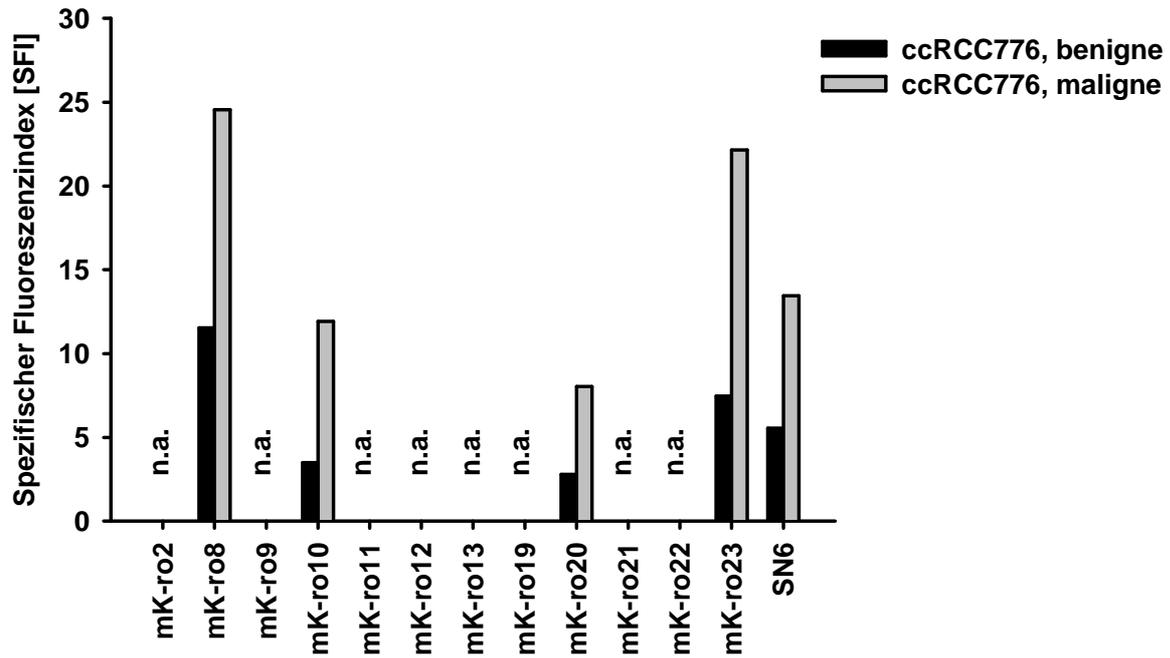


Abbildung 3.13: Bindung der  $\alpha$ Endoglin-Antikörper auf primären  $CD45^-CD31^+$ - $CD34^{high}$  Endothelzellen der Niere: Endoglin-Expression der Endothelzellen benigner und maligner Nierenzellen (Spender: #RCC776). Antikörperkonzentration:  $5 \mu\text{g}/\text{mL}$ ; Sekundärreagenz: Ziege-anti-Maus-PE; n.a.: nicht analysiert

## 3.1.3.7 Schwache Bindung an gesunde, hämatopoetische Vorläuferzellen

Es ist beschrieben, dass Endoglin nicht nur auf Endothelzellen, sondern auch auf Vorläuferzellen des Knochenmarks exprimiert wird. Zur Abschätzung eventueller Nebenwirkungen durch die Antikörper-vermittelte Lyse dieser Zellen, wurde die Bindung der zwölf generierten Antikörper, sowie von SN6 an diese Zellen durchflusszytometrisch untersucht.

Dabei wurde mittels QIFIKIT<sup>®</sup> die Anzahl der gebundenen Antikörpermoleküle pro Zelle bestimmt. Hämatopoetische Vorläuferzellen wurden hier als CD34<sup>+</sup>CD45<sup>dim</sup> definiert (siehe Abbildung 3.14). Die Ergebnisse der Analysen von zwei bzw. drei gesunden Knochenmarkspendern sind in Abbildung 3.15 dargestellt. Demnach binden im Vergleich, bei einer Antikörperkonzentration von 5 µg/mL, die Moleküle mK-ro8, mK-ro19 und mK-ro23 schwächer an die so definierten hämatopoetischen Vorläuferzellen. Für den mK-ro19 sind diese Resultate allerdings bedingt durch die geringe Affinität des Antikörpers.

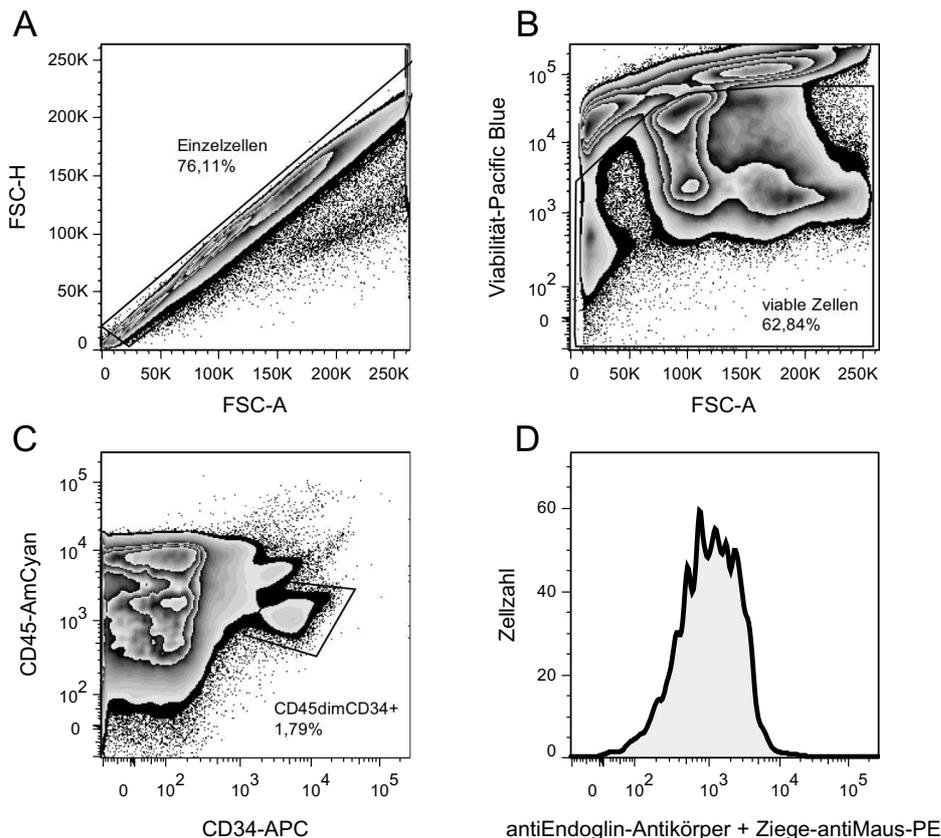


Abbildung 3.14: **Gating-Strategie der primären Knochenmarkszellen:** Bindung der  $\alpha$ Endoglin-Antikörper auf CD34<sup>+</sup>CD45<sup>dim</sup>-Vorläuferzellen des Knochenmarks. **A:** *gating* der Einzelzellen; **B:** *gating* der viablen Zellen über den Farbstoff Violet LIVE/DEAD (Molecular Probes, Darmstadt); **C:** *gating* der CD34<sup>+</sup>CD45<sup>dim</sup>-Vorläuferzellen über den AmCyan-gekoppelten  $\alpha$ CD45-Antikörper, sowie über den APC-gekoppelten  $\alpha$ CD34-Antikörper; **D:** Bindung der  $\alpha$ Endoglin-Antikörper [5 µg/mL]; Sekundärantikörper: Ziege-anti-Maus-PE

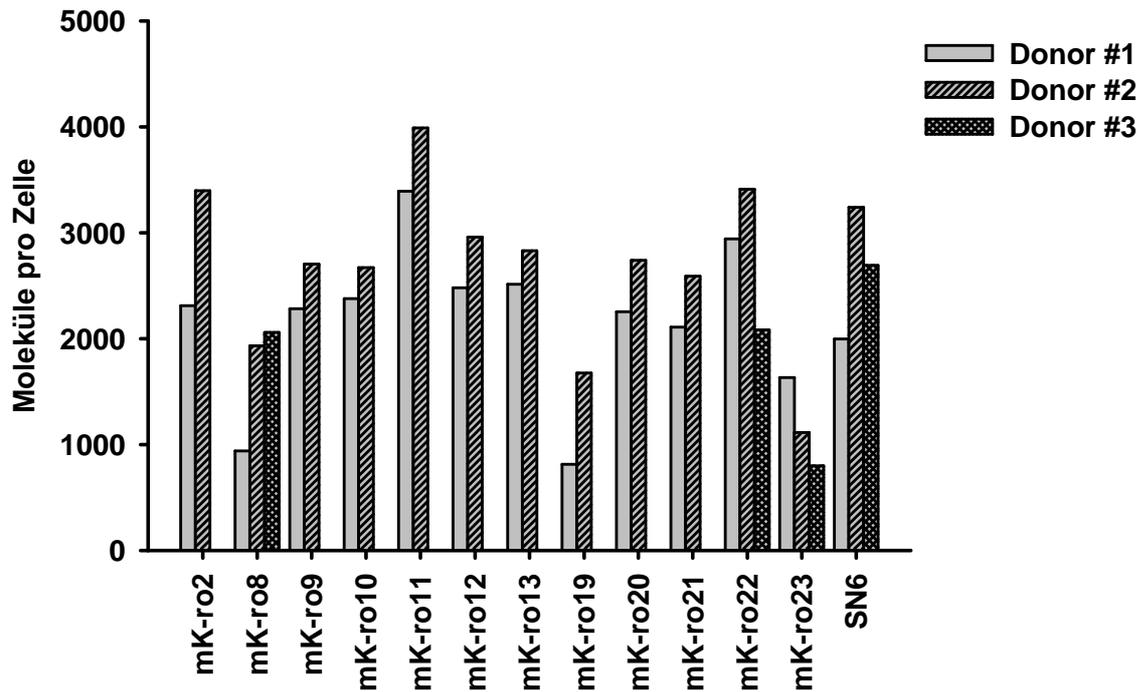


Abbildung 3.15: Bindung der  $\alpha$ Endoglin-Antikörper an humane  $CD34^+CD45^{dim}$ -Vorläuferzellen des Knochenmarks: Es wurde Knochenmark von drei gesunden Spendern analysiert. Die Bindung auf den Zellen des Spenders #3 konnte nur von mK-ro8, mK-ro22, mK-ro23 und SN6 untersucht werden. Die Quantifizierung der Moleküle pro Zelle erfolgte mittels QIFIKIT<sup>®</sup>. Antikörperkonzentration: 5  $\mu$ g/mL; Sekundärreagenz: Ziege-anti-Maus-PE

### 3.1.3.8 Selektion von vier Antikörpern zur Chimärisierung

Aufbauend auf die Charakterisierung der zwölf generierten  $\alpha$ Endoglin-Antikörper des mIg $\gamma$ -Isotyps, wurden die vier vielversprechendsten Maus-Antikörper zur Chimärisierung nach den folgenden Gesichtspunkten selektioniert:

Mittels Immunhistologie und Durchflusszytometrie konnte die Bindung auf Tumorendothel im Vgl. zu gesunden Blutgefäßen untersucht werden. Hierbei erzielten v.a. die Klone mK-ro8 und mK-ro23 die höchsten Fluoreszenzen auf den malignen Nierenzellen, wobei die Signale auf den gesunden Blutgefäßen ebenfalls leicht erhöht waren. Für die Klone mK-ro8 und mK-ro23 konnte weiterhin die geringste Anzahl der gebundenen Antikörpermoleküle pro gesunder hämatopoetischer Vorläuferzelle nachgewiesen werden.

Neben diesen beiden vielversprechendsten Klonen mK-ro8 und mK-ro23 wurde zusätzlich der Antikörper mK-ro22 selektiert. Dieser Antikörper zeigte die höchste Affinität und maximale Fluoreszenzintensität bei den durchflusszytometrischen Analysen. Als vierter Kandidat wurde mK-ro10 ausgewählt. Dieses Molekül sollte die restlichen  $\alpha$ Endoglin-Antikörper repräsentieren, da hier die Unterschiede untereinander nur noch minimal waren. In Tabelle 3.3 sind die Kriterien zur Auswahl der einzelnen Antikörper übersichtlich dargestellt.

Tabelle 3.3: **Selektion der  $\alpha$ Endoglin-Antikörper zur Chimärisierung:** Auflistung der zur Chimärisierung ausgewählten Antikörper bezüglich der entsprechenden Auswahlkriterien.

Auswahlkriterium	Antikörperklon
Titrationverhalten: höchste Affinität und Sättigung	mK-ro22
Bindung auf benignem und malignem Endothel primärer Nierenzellen: stärkste Fluoreszenzsignale auf Tumorendothel	mK-ro2, mK-ro8, mK-ro22, mK-ro23
Immunhistologische Analysen: schwache Färbung des gesunden Gewebes	mK-ro8, mK-ro23
geringste Anzahl gebundener Antikörpermoleküle pro gesunder, hämatopoetischer Vorläuferzelle	mK-ro8, mK-ro23
repräsentativ für den Großteil der generierten $\alpha$ Endoglin-Antikörper	mK-ro10

3.1.3.9 Gegenseitige Verdrängung ausgewählter  $\alpha$ Endoglin-Antikörper

Für eine potentielle Kombinationstherapie aus mehreren Antikörpern, welche gegen das gleiche Antigen gerichtet sind, muss ausgeschlossen werden, dass die Bindung der verschiedenen Antikörper durch gleiche oder überlappende Epitope eingeschränkt sein könnte.

Hierfür wurden Verdrängungsexperimente der vier zur Chimärisierung selektierten  $\alpha$ Endoglin-Antikörperklone durchgeführt. Abbildung 3.16 zeigt, dass die beiden Klone mK-ro8 und mK-ro23 gleiche bzw. überlappende Epitope erkennen. Für die restlichen, untersuchten Antikörper wurden keine überlappenden Epitope nachgewiesen.

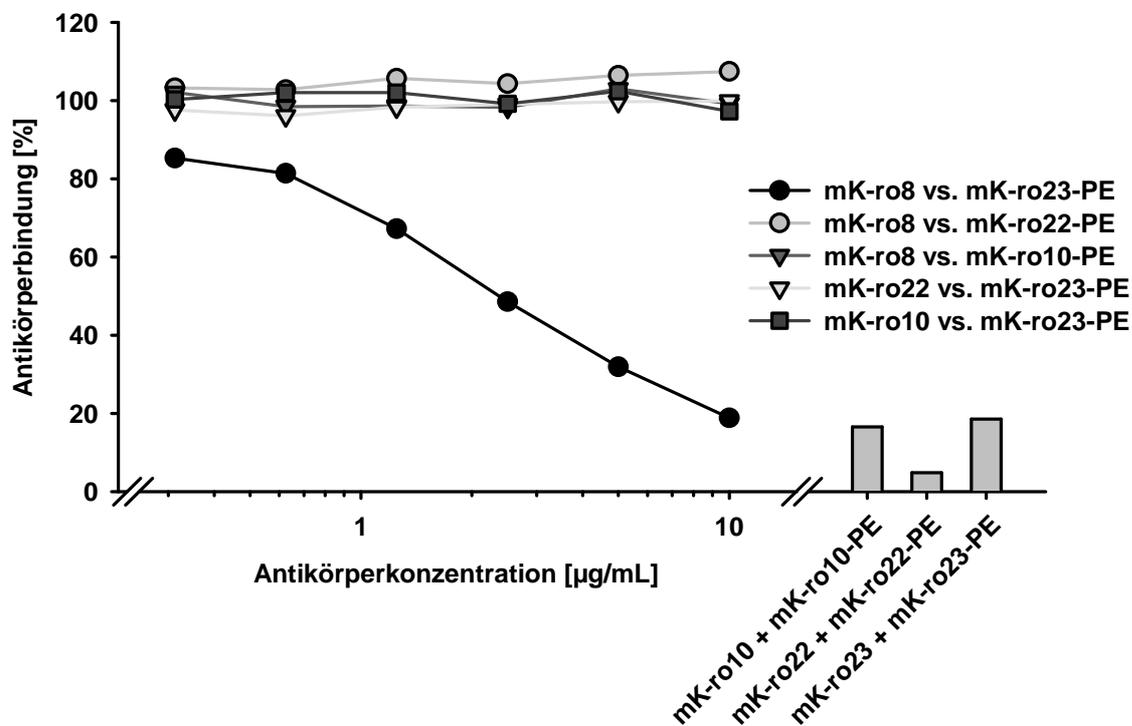


Abbildung 3.16: **Verdrängung der vier  $\alpha$ Endoglin-Antikörperklone untereinander:** Durchflusszytometrische Analyse der Konzentrations-abhängigen Verdrängung der vier  $\alpha$ Endoglin-Antikörper untereinander auf der Zelllinie NALM-16. Gleichzeitige Inkubation der ENG<sup>+</sup>-Zellen mit saturierender Konzentration von 2  $\mu$ g/mL der RPE-konjugierten  $\alpha$ Endoglin-Antikörper, sowie steigenden Konzentrationen der unmarkierten Moleküle. Dargestellt ist die Antikörperbindung normiert auf die Ko-Inkubation mit entsprechender unkonjugierter Isotypkontrolle.

### 3.1.4 Chimärisierung und SDIEM-Optimierung der $\alpha$ Endoglin-Antikörper

#### 3.1.4.1 Klonierung der $\alpha$ Endoglin-Antikörper

**Chimärisierung der Maus-Antikörper mK-ro8, mK-ro10, mK-ro22 und mK-ro23** Zur Chimärisierung wurde die mRNA der vier Maus-Antikörper aus Hybridomzellen isoliert. Nach anschließender reverser Transkription konnte die cDNA zur PCR eingesetzt werden. Als Primer dienten von Dr. Ludger Große-Hovest entworfene degenerierte Primerpools (PP), welche an die *leader*-Sequenzen der variablen Domänen von Maus-Antikörpern hybridisieren, sowie Primer, welche Isotypspezifisch an die konstante Domäne CH1 bzw. CL binden. Es wurden neun PP für die VDJ-Region der schweren Kette (PP H1-1 und PP H1-2 bis PP H8) und sieben PP für die VJ-Region der leichten Kette (PP K1 bis PP K7) mittels PCR getestet. Im Folgenden wird die Klonierung exemplarisch für den  $\alpha$ Endoglin-Antikörperklon mK-ro22 beschrieben. In Abbildung 3.17 ist das Agarosegel, auf dem die PCR-Amplikons aufgetragen wurden dargestellt, welche mittels PCR mit den verschiedenen Primerpools aus der cDNA von mK-ro22 generiert wurden.

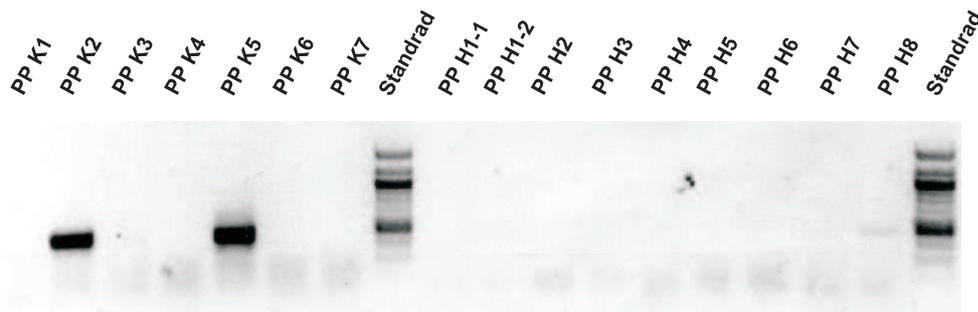


Abbildung 3.17: Agarosegel mit PCR-Amplikons, welche mittels cDNA von mK-ro22 und den degenerierten Primerpools (PP) generiert wurden: Sieben PP zur Amplifikation der VJ-Region: PP K1 bis PP K7; Neun PP zur Amplifikation der VDJ-Region: PP H1-1 bis PP H8; Agarosegel: 1,2%; Standard: 100 bp-Marker

Für mK-ro22 konnte eine schwache aber spezifische Bande in der erwarteten Größe von 600 bp für die VDJ-Region der schweren Kette im PP H8 detektiert werden. Für die VJ-Region der leichten Kette wurden zwei Amplikons in der erwarteten Größe von 223 bp amplifiziert, in PP K2 und in PP K5. Da durch den PP K2 erfahrungsgemäß die aberrante *kappa*-Kette des Fusionspartners Sp2/0-Ag14 amplifiziert wird, wurden die PCR-Produkte von PP K5 und PP H8 zur weiteren Klonierung des mK-ro22 verwendet. Mittels entsprechender Restriktionsendonukleasen wurden die PCR-Produkte verdaut und in die Zwischenvektoren pDIA-mixed-Fc (schwere Kette) und pDIA-mu-CL (leichte Kette) ligiert. Nach Transformation von *E. coli* und anschließender Plasmidisolierung konnten die bis dahin unbekannt variablen Domänen der schweren und leichten Antikörperketten mittels des Primers CV001for2 durch Sequenzierung identifiziert werden. Zur anschließenden Amplifikation der variablen Domänen wurden Primer komplementär zur verifizierten DNA-Sequenz generiert. Das Amplikon konnte anschließend in die von Dr. Ludger Große-Hovest entwickelten Expressionsvektoren für die chimäre leichte Kette, die

chimäre schwere Kette, sowie für die chimäre schwere Kette mit integrierter SDIEM-Modifikation ligiert und transformiert werden. Die linearisierte Plasmid-DNA wurde in Sp2/0-Ag14 Zellen transfiziert.

Die finale Aufreinigung aller chimärisierten bzw. zusätzlich optimierten Antikörper ( $\chi$ K-ro8,  $\chi$ K-ro8SDIEM,  $\chi$ K-ro10,  $\chi$ K-ro10SDIEM,  $\chi$ K-ro22,  $\chi$ K-ro22SDIEM,  $\chi$ K-ro23,  $\chi$ K-ro23SDIEM) erfolgte aus Zellkulturüberstand mittels Affinitätschromatographie an Protein A.

**Klonierung des  $\alpha$ Endoglin-Referenzantikörpers TRC105** Um die chimärisierten und optimierten  $\alpha$ Endoglin-Antikörperklone  $\chi$ K-ro8,  $\chi$ K-ro8SDIEM,  $\chi$ K-ro10,  $\chi$ K-ro10SDIEM,  $\chi$ K-ro22,  $\chi$ K-ro22SDIEM,  $\chi$ K-ro23 und  $\chi$ K-ro23SDIEM in den folgenden Versuchen mit dem sich bereits in einer klinischen Studie befindlichen chimären  $\alpha$ Endoglin-Antikörper TRC105 des Pharmakonzerns TRACON Pharmaceuticals (parentaler Maus-Antikörperklon SN6j) zu vergleichen, wurden die publizierten Sequenzen der variablen Domänen [Seon et al., 2011] bei der Firma GeneArt synthetisiert. Die Klonierung in die eigenen Expressionsvektoren, sowie die Transfektion und Proteinreinigung lief in Analogie zu den eigenen Antikörpern ab (siehe oben). Neben dem ursprünglichen chimären Format TRC105 (im Folgenden auch als  $\chi$ SN6j bezeichnet), wurde zusätzlich eine SDIEM-optimierte Version des TRC105 hergestellt,  $\chi$ SN6jSDIEM.

Dieser  $\alpha$ Endoglin-Antikörperklon SN6j, welcher nun mit den in dieser Arbeit hergestellten, chimärisierten und optimierten Antikörpern verglichen wurde, entspricht nicht dem Klon SN6, welcher während der Charakterisierung der Maus-Antikörper als Referenz eingesetzt wurde.

### 3.1.4.2 Bestimmung der Reinheit und Homogenität

**Bestimmung der Reinheit mittels SDS-PAGE** Die Reinheit der chimärisierten und optimierten Antikörper konnte mittels SDS-PAGE untersucht werden. Abbildung 3.18 zeigt die SDS-PAGE aller fünf chimärisierten, sowie aller fünf SDIEM-optimierten Antikörper unter reduzierenden und nicht-reduzierenden Bedingungen. Als Kontrolle wurde ein optimierter Antikörper  $\chi$ 4G8SDIEM, welcher gegen das Leukämie-assoziierte Oberflächenantigen CD135 gerichtet ist, mitgeführt.

Unter nicht-reduzierenden Bedingungen (Abbildung 3.18 A) zeigten alle zehn Antikörper eine deutliche Einzelbande im erwarteten Größenbereich zwischen 98 kDa und 250 kDa. Unter reduzierenden Bedingungen (Abbildung 3.18 B) konnten für alle Moleküle Banden der schweren und leichten Ketten in erwarteter Größe (vgl.  $\chi$ 4G8SDIEM) nachgewiesen werden. Erfahrungsgemäß wiesen die SDIEM-optimierten, schweren Ketten aufgrund einer zusätzlichen Glykosylierungsstelle eine Doppelbande auf. Für den Antikörperklon  $\chi$ K-ro10 wurden schwache Banden oberhalb der schweren Ketten detektiert. Die übrigen neun Antikörper zeigten keine unerwarteten Banden, was für eine hohe Antikörperreinheit nach Affinitätschromatographie an Protein A spricht.

Um sicherzustellen, dass die Doppelbanden der SDIEM-modifizierten schweren Antikörperketten auf unterschiedliche Glykosylierung, im Vergleich zu den chimären schweren Antikörperketten, zurückzuführen ist, wurde exemplarisch mit dem  $\chi$ K-ro22SDIEM ein PNGase F Verdau durchgeführt. Aus Abbildung 3.18 C wird deutlich, dass die Doppelbande der schweren Kette nach enzymatischem Verdau mit PNGase F verschwindet.

### 3.1. ENDOGLIN ALS VASKULÄRES ZIELANTIGEN

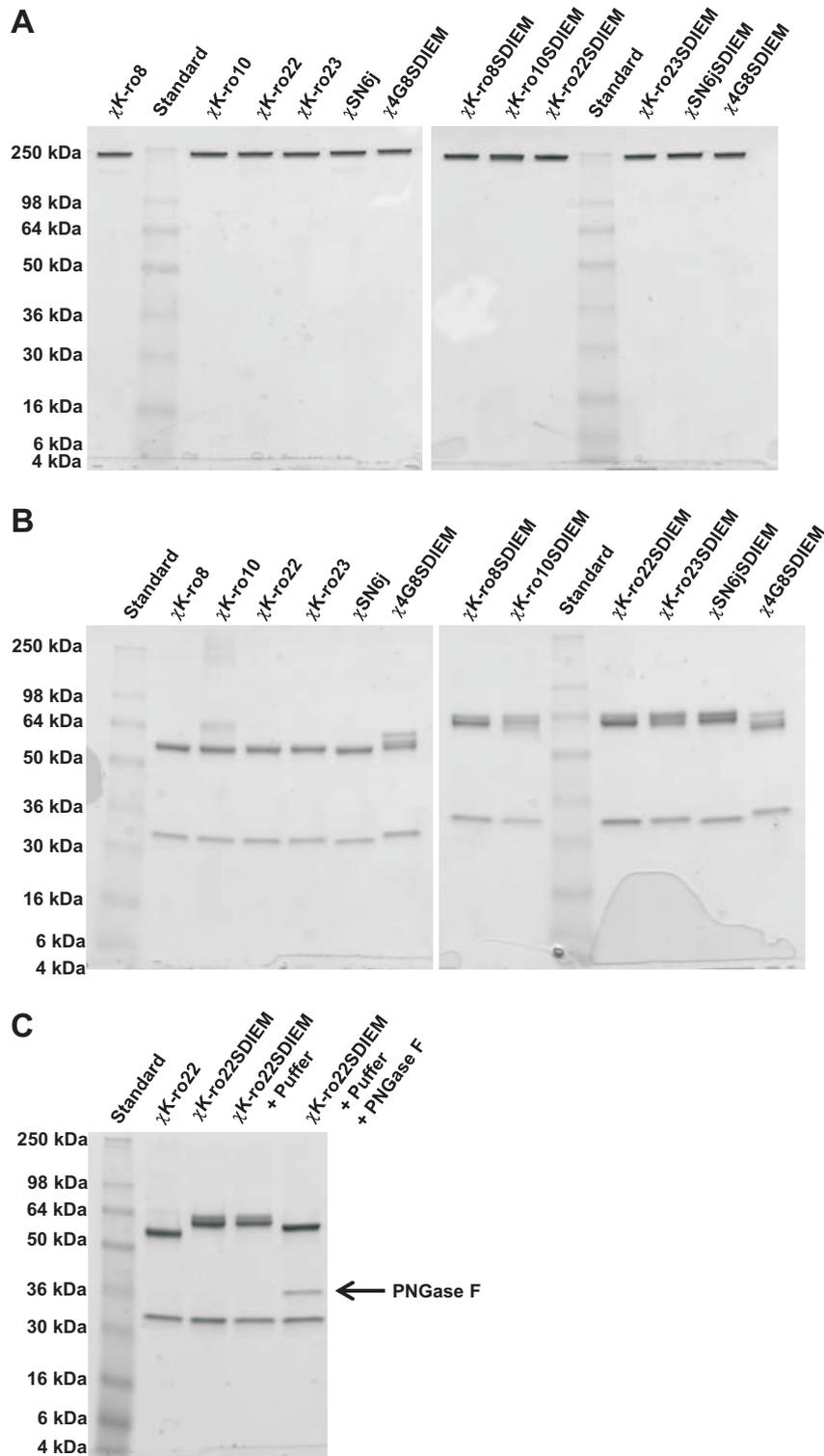


Abbildung 3.18: Analyse aller chimärisierten und optimierten  $\alpha$ Endoglin-Antikörper mittels SDS-PAGE: **A**: SDS-PAGE unter nicht-reduzierenden Bedingungen **B**: SDS-PAGE unter reduzierenden Bedingungen **C**: Verdau mit PNGaseF von  $\chi$ K-ro22SDIEM unter reduzierenden Bedingungen; Standard: SeeBlue Pre-Stained Standard; Fertiggel: Mini-PROTEAN precast gel Any kD; Kontrollantikörper:  $\chi$ 4G8SDIEM

**Bestimmung der Homogenität mittels analytischer Gelfiltration** Die Reinheit der fünf chimären und fünf optimierten Antikörper wurde zusätzlich mittels analytischer Gelfiltration untersucht. In den Abbildungen 3.19, 3.20 und 3.21 sind die Elutionsprofile der Referenzantikörper SN6j, sowie der Klone K-ro8, K-ro10, K-ro22 und K-ro23 dargestellt. Es konnten deutlich symmetrische Peaks bei der erwarteten Größe für chimäre bzw. optimierte Antikörper nachgewiesen werden, wobei die SDIEM-modifizierte Antikörper durch den angehängten myc-tag und die daraus resultierende zusätzliche Glykosylierungsstelle wie erwartet ein verändertes Laufverhalten aufweisen.

Lediglich für den  $\chi$ K-ro10SDIEM wurde eine deutliche Verunreinigung nachgewiesen.

Anhand der analytische Gelfiltration konnten für den  $\chi$ K-ro8, sowie den  $\chi$ K-ro8SDIEM ebenfalls homogene Einzelpeaks nachgewiesen werden, allerdings zeigte dieser Klon ein aberrantes Laufverhalten. Die Elutionsprofile beider Antikörpervarianten zeigten ein Migrationsverhalten, das einem deutlich kleineren Protein entsprach als erwartet (vgl. Abbildung 3.20 A).

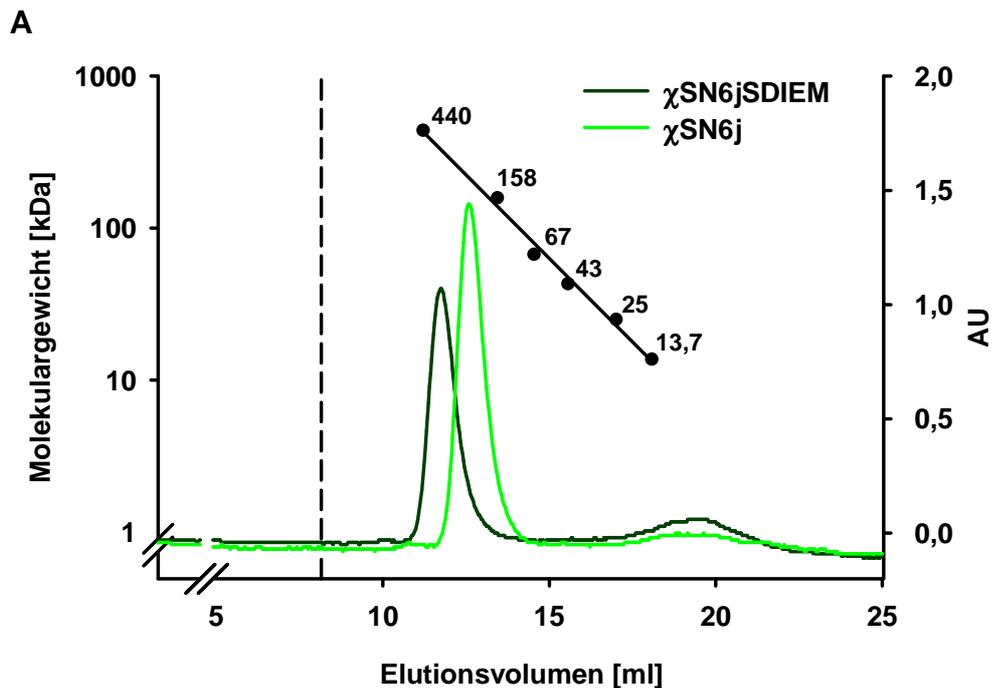


Abbildung 3.19: **Bestimmung der Homogenität des Referenzantikörperklons SN6j mittels analytischer Gelfiltration:** Elutionsprofile der Antikörper  $\chi$ SN6j (10  $\mu$ g) und  $\chi$ SN6jSDIEM (8  $\mu$ g); linke y-Achse: Skala des Molekulargewichtes der verwendeten Eichproteine; rechte y-Achse: Skala der Absorption der Antikörper

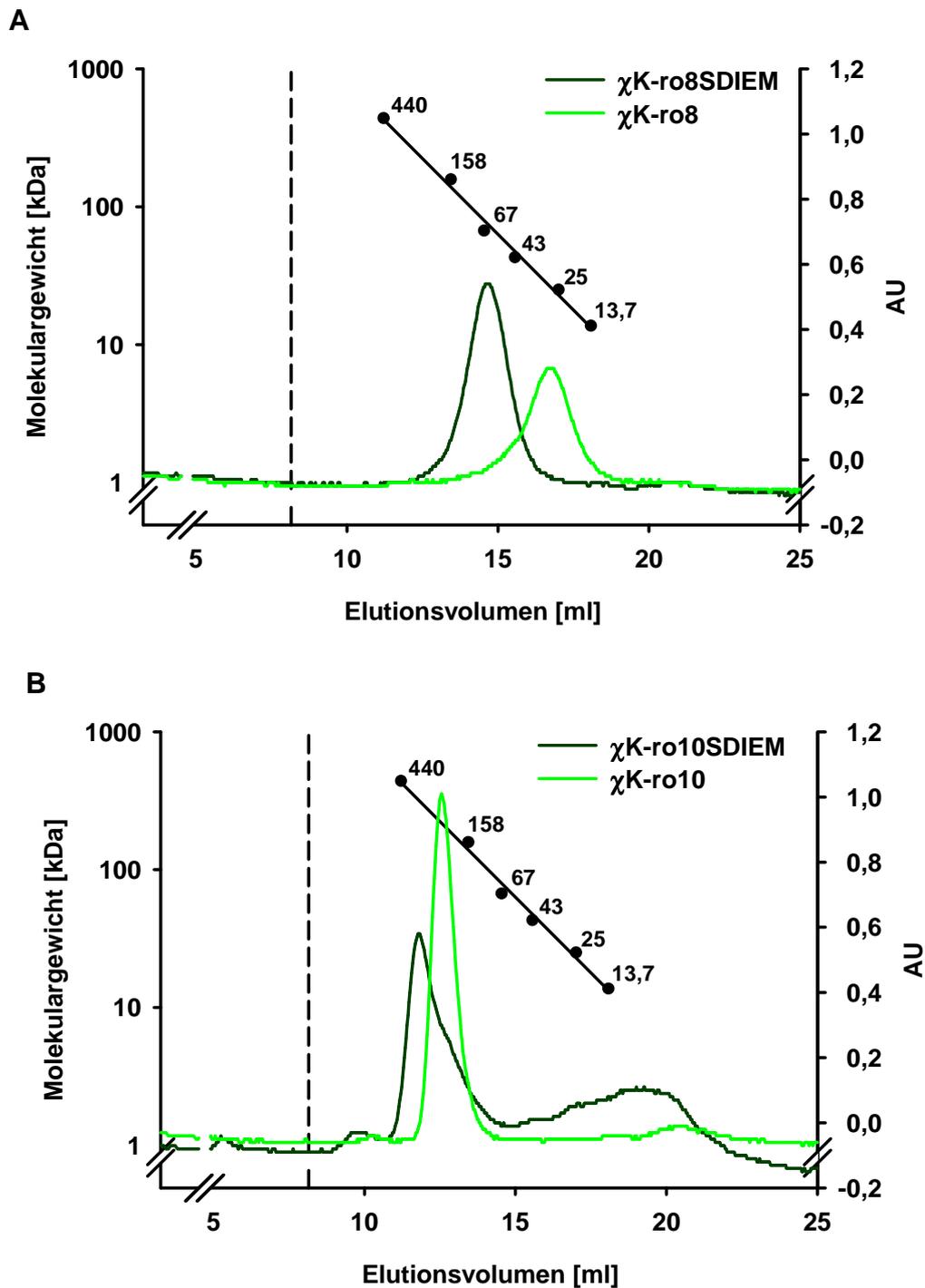


Abbildung 3.20: Bestimmung des Reinheitsgrades der Antikörperklone K-ro8 und K-ro10 mittels analytischer Gelfiltration: **A**: Elutionsprofile der Antikörper  $\chi$ K-ro8 (10  $\mu$ g) und  $\chi$ K-ro8SDIEM (10  $\mu$ g) **B**: Elutionsprofile der Antikörper  $\chi$ K-ro10 (7,6  $\mu$ g) und  $\chi$ K-ro10SDIEM (7,7  $\mu$ g); linke y-Achse: Skala des Molekulargewichtes der verwendeten Eichproteine; rechte y-Achse: Skala der Absorption der Antikörper

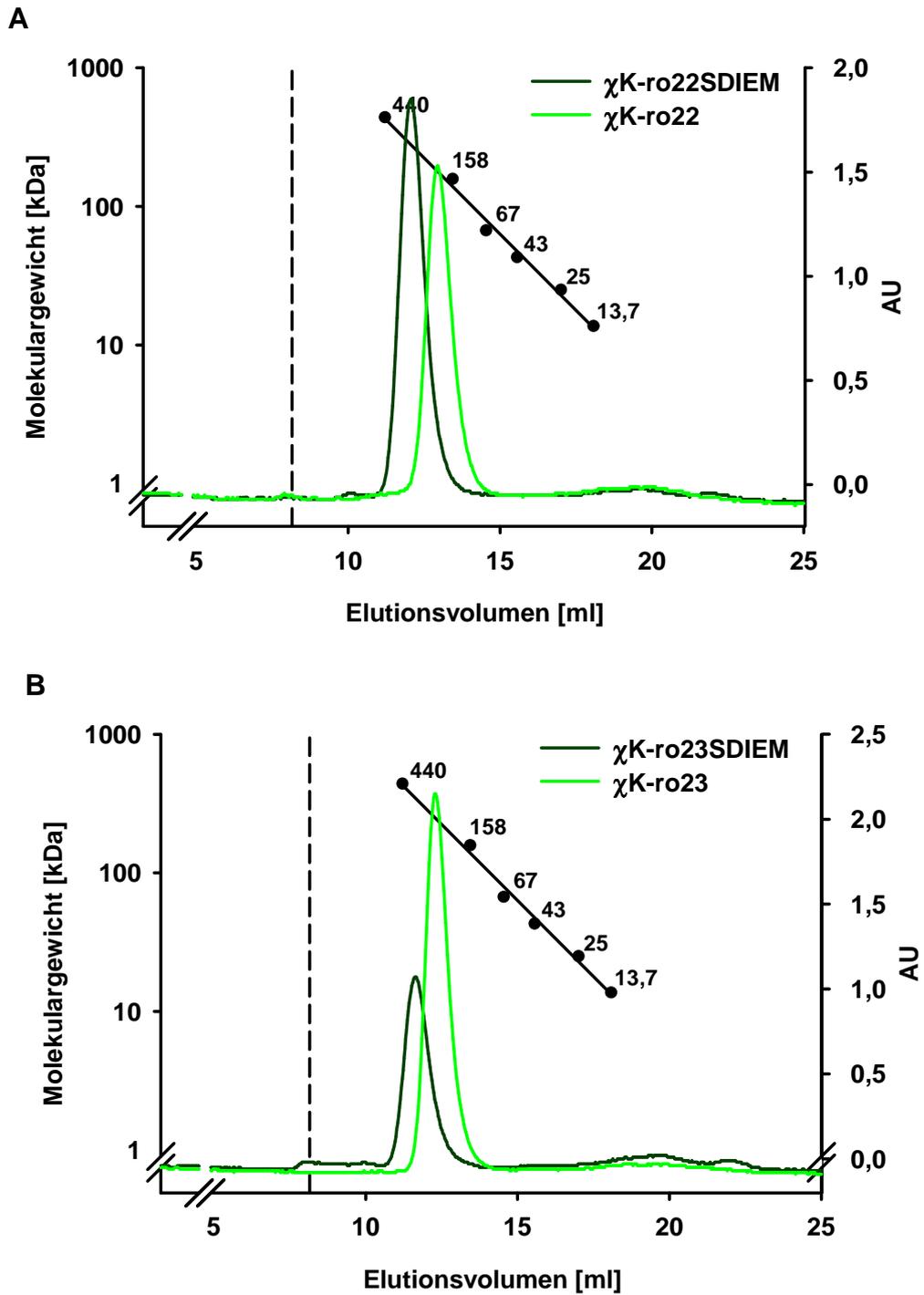


Abbildung 3.21: Bestimmung des Reinheitsgrades der Antikörperklone K-ro22 und K-ro23 mittels analytischer Gelfiltration: A: Elutionsprofile der Antikörper  $\chi$ K-ro22 (10  $\mu$ g) und  $\chi$ K-ro22SDIEM (10  $\mu$ g) B: Elutionsprofile der Antikörper  $\chi$ K-ro23 (10  $\mu$ g) und  $\chi$ K-ro23SDIEM (10  $\mu$ g); linke y-Achse: Skala des Molekulargewichtes der verwendeten Eichproteine; rechte y-Achse: Skala der Absorption der Antikörper

### 3.1.5 Vergleich der chimärisierten $\alpha$ Endoglin-Antikörper mit dem Referenzmolekül TRC105

#### 3.1.5.1 Vergleich des Titrationsverhaltens

Im Folgenden wurden die chimärisierten und optimierten  $\alpha$ Endoglin-Antikörper  $\chi$ K-ro8,  $\chi$ K-ro8SDIEM,  $\chi$ K-ro10,  $\chi$ K-ro10SDIEM,  $\chi$ K-ro22,  $\chi$ K-ro22SDIEM,  $\chi$ K-ro23 und  $\chi$ K-ro23SDIEM mit dem Referenzantikörper TRC105 bzw.  $\chi$ SN6j, sowie der SDIEM-optimierten Version, dem  $\chi$ SN6jSDIEM, hinsichtlich Affinität und maximaler Fluoreszenzintensität verglichen. Hierfür wurde die Konzentrations-abhängige Antikörperbindung auf der Endoglin-positiven Prä-B-ALL-Zelllinie NALM-16 durchflusszytometrisch analysiert.

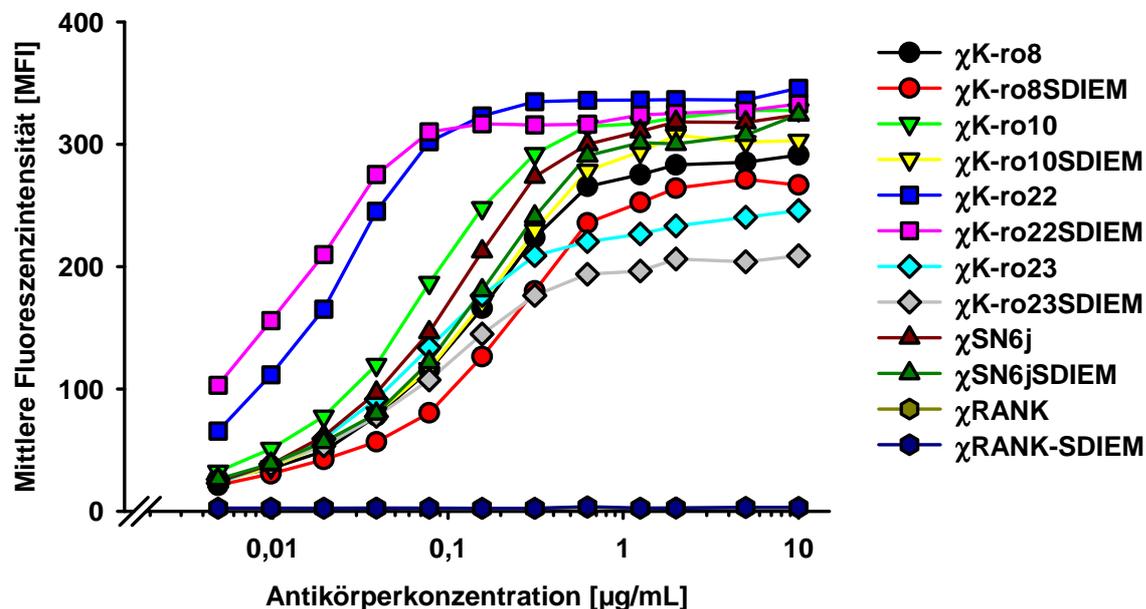


Abbildung 3.22: Titration der chimärisierten und optimierten  $\alpha$ Endoglin-Antikörper auf  $ENG^+$ NALM-16 Zelllinie: Konzentrations-abhängigen Bindung der chimärisierten Antikörper auf der  $ENG^+$ Zelllinie NALM-16 mittels Durchflusszytometrie. Folgende Isotypkontrollen wurden verwendet: RANK $\gamma$ 1 (chimär) und RANKSDIEM (optimiert). Als Sekundärreagenz diente Ziegenanti-Maus-APC.

Die Abbildung 3.22 zeigt, dass das Titrationsverhalten der fünf chimären Antikörperklone den jeweiligen SDIEM-modifizierten Formaten entspricht. Wie anhand der durchflusszytometrischen Untersuchungen der entsprechenden Maus-Antikörper mK-ro8, mK-ro10, mK-ro22 und mK-ro23 erwartet, sind die Affinitäten des  $\chi$ K-ro22, sowie des  $\chi$ K-ro22SDIEM am höchsten. Die Affinitäten und maximalen Fluoreszenzintensitäten des  $\chi$ SN6j, sowie des  $\chi$ SN6jSDIEM sind vergleichbar zu denen des Klons K-ro10.

### 3.1.5.2 Chimärisierte $\alpha$ Endoglin-Antikörper binden ein anderes Epitop als TRC105

Mit Hilfe eines Verdrängungsexperimentes sollte geprüft werden, ob die vier chimärisierten Antikörperklone überlappende Epitope mit dem TRC105 bzw.  $\chi$ SN6j erkennen. Hierfür wurde der  $\chi$ SN6j mittels *Lynx Rapid RPE Antibody Conjugation Kit* an das Fluorochrom R-Phycoerythrin gekoppelt. Anschließend wurde die Endoglin-positive Zelllinie NALM-16 mit einer sättigenden Antikörperkonzentration von 1  $\mu$ g/mL des  $\chi$ SN6j-PE und gleichzeitig mit ansteigenden Antikörperkonzentrationen der chimären Antikörper  $\chi$ K-ro8,  $\chi$ K-ro10,  $\chi$ K-r22 und  $\chi$ K-ro23 inkubiert. In Abbildung 3.23 sind die durchflusszytometrischen Ergebnisse dargestellt.

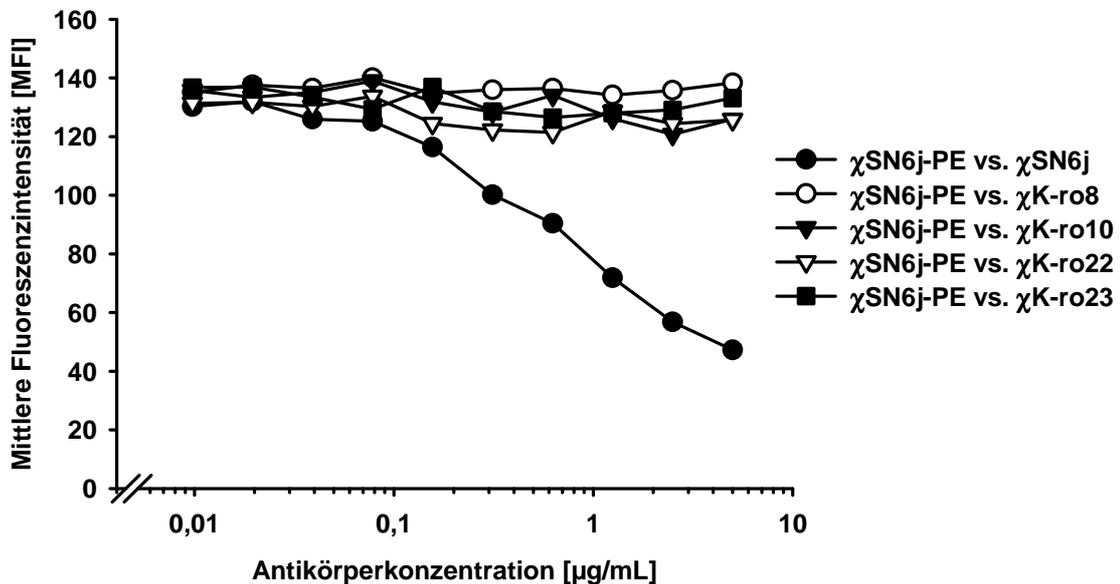


Abbildung 3.23: Verdrängungsexperiment zwischen Fluorochrom-markiertem TRC105 bzw.  $\chi$ SN6j und den generierten  $\alpha$ Endoglin-Antikörpern: Durchflusszytometrische Analyse der Konzentrations-abhängigen Verdrängung des Fluorochrom-konjugierten  $\chi$ SN6j-PE durch  $\chi$ K-ro8,  $\chi$ K-ro10,  $\chi$ K-r22 und  $\chi$ K-ro23 auf der Endoglin-positiven Zelllinie NALM-16. Als interne Kontrolle diente der unmarkierte  $\chi$ SN6j.

Aus der oben-dargestellten Grafik wird deutlich, dass die Bindung des Fluorochrom-markierten TRC105 an Endoglin von den getesteten Antikörpern nicht inhibiert wird. Als interne Kontrolle konnte bei ansteigender Antikörperkonzentration des unkonjugierten  $\chi$ SN6j ein deutlicher Abfall der mittleren Fluoreszenzintensität des  $\chi$ SN6j-PE gemessen werden.

#### 3.1.5.3 Vergleich der Tumorendothelspezifität der chimärisierten $\alpha$ Endoglin-Antikörper mit TRC105

**Immunhistologische Bewertung der  $\alpha$ Endoglin-Antikörper auf 14 benignen und malignen Gewebetypen** Um das wichtigste Charakteristikum der Tumorendothelspezifität der neuen  $\alpha$ Endoglin-Antikörper weiter untersuchen zu können, wurden die vier ausgewählten Klone auf *human frozen tissue arrays* mit 14 verschiedenen Tumorgewebetypen und je entsprechendem Normalgewebe immunhistologisch angefärbt untersucht. Die Beurteilung der Gefrierschnitte hinsichtlich Färbeintensität sowie Spezifität für Tumorendothel erfolgte dabei wiederum unter dem Mikroskop nach subjektivem Eindruck. Der bereits in klinischer Studie befindliche TRC105 sollte in diesem Zuge ebenfalls immunhistologisch bewertet und gleichzeitig mit den vier neuen Antikörpern verglichen werden. Die Einteilung der Färbeintensität erfolgte in keine bzw. eine schwache, mäßige, starke und sehr starke Färbung. In Tabelle 3.4 sind die immunhistologischen Ergebnisse tabellarisch zusammengestellt.

Der pan-endotheliale  $\alpha$ CD31-Antikörper wurde als Kontrolle mitgeführt. Dieser Klon färbte die Blutgefäße der verschiedenen Gewebetypen unterschiedlich stark. Die stärksten Färbeintensitäten (mäßige bis starke Färbung) wurden auf den benignen Gefrierschnitten der Niere, der Lunge, des Pankreas, sowie des Dünndarms nachgewiesen. Mit Ausnahme der Haut konnten für diesen Antikörper keine deutlichen Differenzen zwischen benignem und malignem Gewebe beobachtet werden.

Für alle fünf getesteten  $\alpha$ Endoglin-Antikörperklone K-ro8, K-ro10, K-ro22, K-ro23 und SN6j konnten mit wenigen Ausnahmen (für K-ro10: Lunge; für K-ro22: Haut; für K-ro23: Leber und Prostata) eine schwächere Färbung auf dem Normalgewebe im Vergleich zum Tumorgewebe nachgewiesen werden. Die stärksten Färbungen aller 14 gesunden Gewebetypen wurden auf der Niere und der Leber detektiert (schwache Färbung). Das Endothel des malignen Gewebes wurde teilweise gleich schwach, häufig aber stärker angefärbt. Es konnten für den malignen Pankreas, die maligne Niere, sowie den malignen Dünndarm die stärksten Färbeintensitäten nachgewiesen werden. Somit wurde die erwartete Tumorendothelspezifität aller fünf getesteten Klone semi-quantitativ bestätigt.

Das Ausmaß der Färbeintensitäten zwischen den fünf  $\alpha$ Endoglin-Antikörpern generell lässt sich wie folgt zusammenfassen:

$$\text{K-ro23} < \text{K-ro10} < \text{SN6j} < \text{K-ro8} < \text{K-ro22}.$$

Tabelle 3.4: **Bewertung der immunhistologischen Färbung der optimierten  $\alpha$ Endoglin-Antikörperklone auf einem *human frozen tissue array*:** Färbeintensitäten der  $\alpha$ Endoglin-Antikörper [je 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ] auf 14 verschiedenen Gewebetypen (jeweils maligne und benigne) des *human frozen tissue arrays*; -: keine Färbung, +: schwache Färbung, ++: mäßige Färbung, +++: starke Färbung, ++++: sehr starke Färbung, (+) entspricht einer Zwischenstufe, pan-endothelialer Kontrollantikörper:  $\alpha$ CD31

	$\alpha$ CD31-Antikörper		$\chi$ SN6jSDIEM		$\chi$ K-ro8SDIEM		$\chi$ K-ro10SDIEM		$\chi$ K-ro22SDIEM		$\chi$ K-ro23SDIEM	
	Gesundes Gewebe	Tumorgewebe	Gesundes Gewebe	Tumorgewebe	Gesundes Gewebe	Tumorgewebe	Gesundes Gewebe	Tumorgewebe	Gesundes Gewebe	Tumorgewebe	Gesundes Gewebe	Tumorgewebe
<b>Gehirn</b>	(+)	+	(+)	+(+)	-	+	-	+	(+)	++	-	+
<b>Brust</b>	+	++	(+)	+	(+)	+(+)	-	+	(+)	++(+)	-	(+)
<b>Kolon</b>	(+)	+	(+)	+	(+)	+(+)	(+)	+	(+)	++	-	(+)
<b>Niere</b>	++	+(+)	+	++++	+	++++	(+)	++++	+(+)	++++	(+)	++
<b>Leber</b>	(+)	+(+)	(+)	+(+)	+	+(+)	(+)	+	+	++	(+)	(+)
<b>Lunge</b>	+++	++	-	+	(+)	+	(+)	(+)	+(+)	++	-	+(+)
<b>Pankreas</b>	++	+(+)	(+)	+	(+)	++	(+)	+(+)	+	++(+)	(+)	+
<b>Prostata</b>	(+)	+(+)	-	+	(+)	+	(+)	+	+	+(+)	(+)	(+)
<b>Skelettmuskel</b>	(+)	+	-	+	-	(+)	-	+	(+)	++	-	(+)
<b>Haut</b>	(+)	+++	-	-	-	(+)	-	-	(+)	(+)	-	-
<b>Dünndarm</b>	++(+)	++(+)	-	++++	-	++++	(+)	++++	+	++++	(+)	++++
<b>Magen</b>	+	+	(+)	+	(+)	+(+)	(+)	+	(+)	+(+)	-	(+)
<b>Ovar</b>	+	+	(+)	+	(+)	+	(+)	+	+	+(+)	-	(+)
<b>Uterus</b>	+(+)	++	-	(+)	-	+(+)	-	(+)	(+)	+(+)	-	-

**Bindung der fünf  $\alpha$ Endoglin-Antikörper an primäre benigne und maligne Endothelzellen der Niere** Analog zu den parentalen Maus-Antikörpern wurde ebenfalls die Bindung der chimärisierten SDIEM-optimierten Antikörper an CD45<sup>-</sup>-CD31<sup>+</sup>CD34<sup>high</sup>-Endothelzellen benigner und maligner Nierenzellen untersucht. Erstmals konnten diese Antikörper hierbei mit dem in einer klinischen Phase befindlichen Antikörper TRC105 bzw.  $\chi$ SN6j verglichen werden. Insgesamt wurden maligne und benigne primäre Nierenzellen von sieben verschiedenen RCC-Patienten analysiert. Für die Primärzellen von fünf dieser sieben Patienten konnten vergleichbare Ergebnisse generiert werden. In den verbleibenden zwei Fällen fand sich kein Unterschied. Dies lässt sich wahrscheinlich durch die Größe dieser beiden Tumoren, welche zur verstärkten Vaskularisierung des Normalgewebes führte, erklären.

In diesen Experimenten wurde die in Abbildung 3.11 dargestellte *gating*-Strategie verwendet. Die *c-myc*-markierten, optimierten  $\alpha$ Endoglin-Antikörper wurden über den *c-myc*-spezifischen Mausantikörperklon abgegriffen und anschließend mit einem Phycoerytrin-gekoppelten Ziege-anti-Maus-Antikörper detektiert. In Abbildung 3.24, 3.25, sowie 3.26 A sind die ermittelten spezifischen Fluoreszenzindices (SFI) der verschiedenen Spenderzellen dargestellt. Grundsätzlich konnte für alle fünf getesteten  $\alpha$ Endoglin-Antikörper ein stärkeres Fluoreszenzsignal auf den Endothelzellen der malignen Zellsuspensionen im Vergleich zu den gesunden Blutgefäßen nachgewiesen werden. In den meisten Fällen zeigte der Antikörperklon  $\chi$ K-ro8SDIEM im direkten Vergleich die höchsten Signale auf den malignen Zellen.

In Abbildung 3.26 B ist die Tumorspezifität aller fünf Antikörper als Quotient der SFI der malignen und benignen Gewebe aller fünf Spender aufgetragen. In vier von fünf Fällen wies der Antikörperklon K-ro8, v.a. im Vergleich zum Referenzantikörperklon SN6j, die deutlich höchste Tumorspezifität auf. Für die übrigen Klone K-ro10, K-ro22 und K-ro23 konnten vergleichbare bzw. bessere Spezifitäten für Tumorendothel als für den SN6j ermittelt werden.

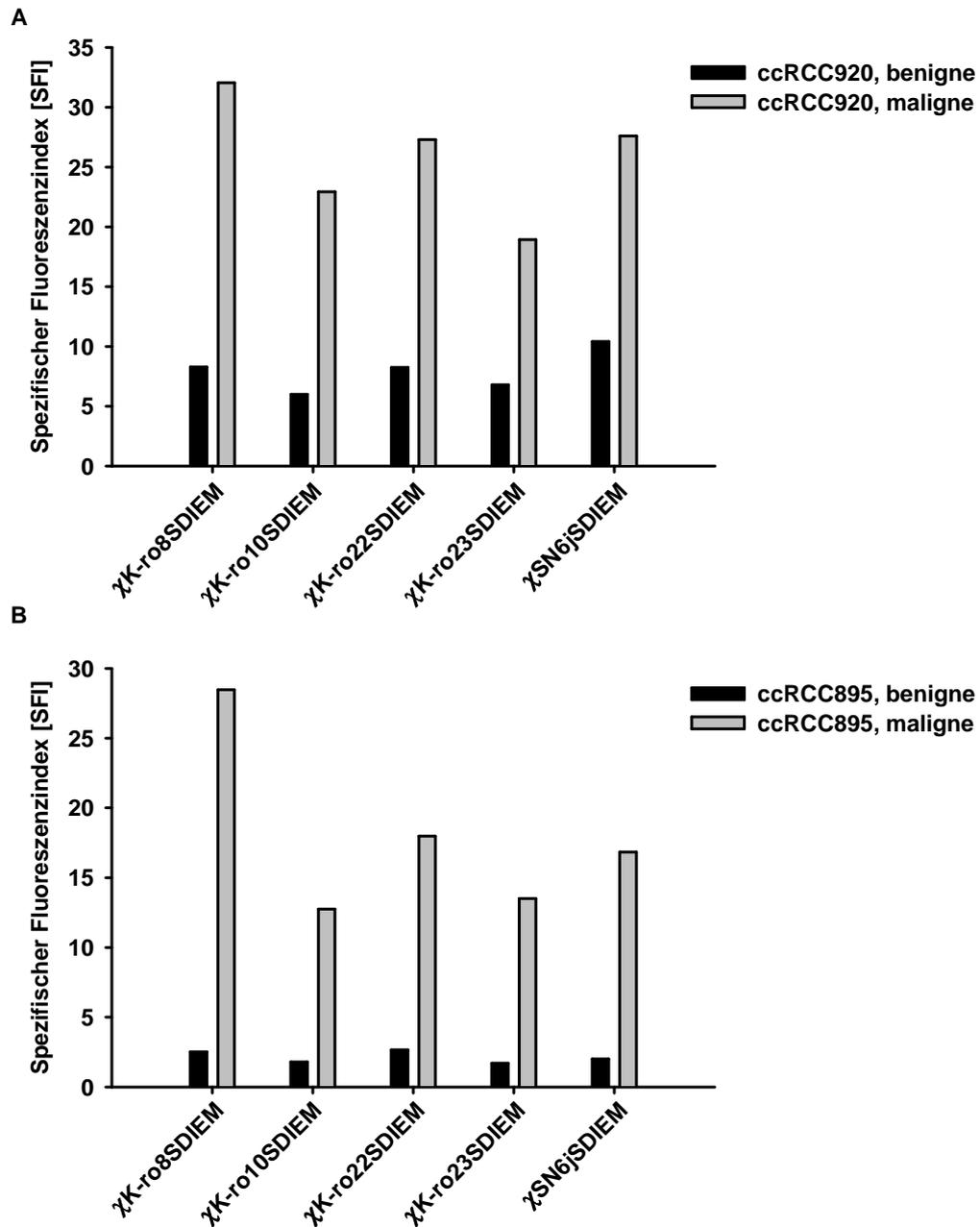


Abbildung 3.24: Bindung der  $\alpha$ Endoglin-Antikörper auf primären  $CD45^-CD31^+-CD34^{high}$ -Endothelzellen der Niere: **A**: Bindung der  $\alpha$ Endoglin-Antikörper auf den Zellen des Spenders RCC920 **B**: Bindung der  $\alpha$ Endoglin-Antikörper auf den Zellen des Spenders RCC895; Antikörperkonzentration:  $5 \mu\text{g/mL}$ ; Sekundärreagenz: Ziege-anti-Maus-PE

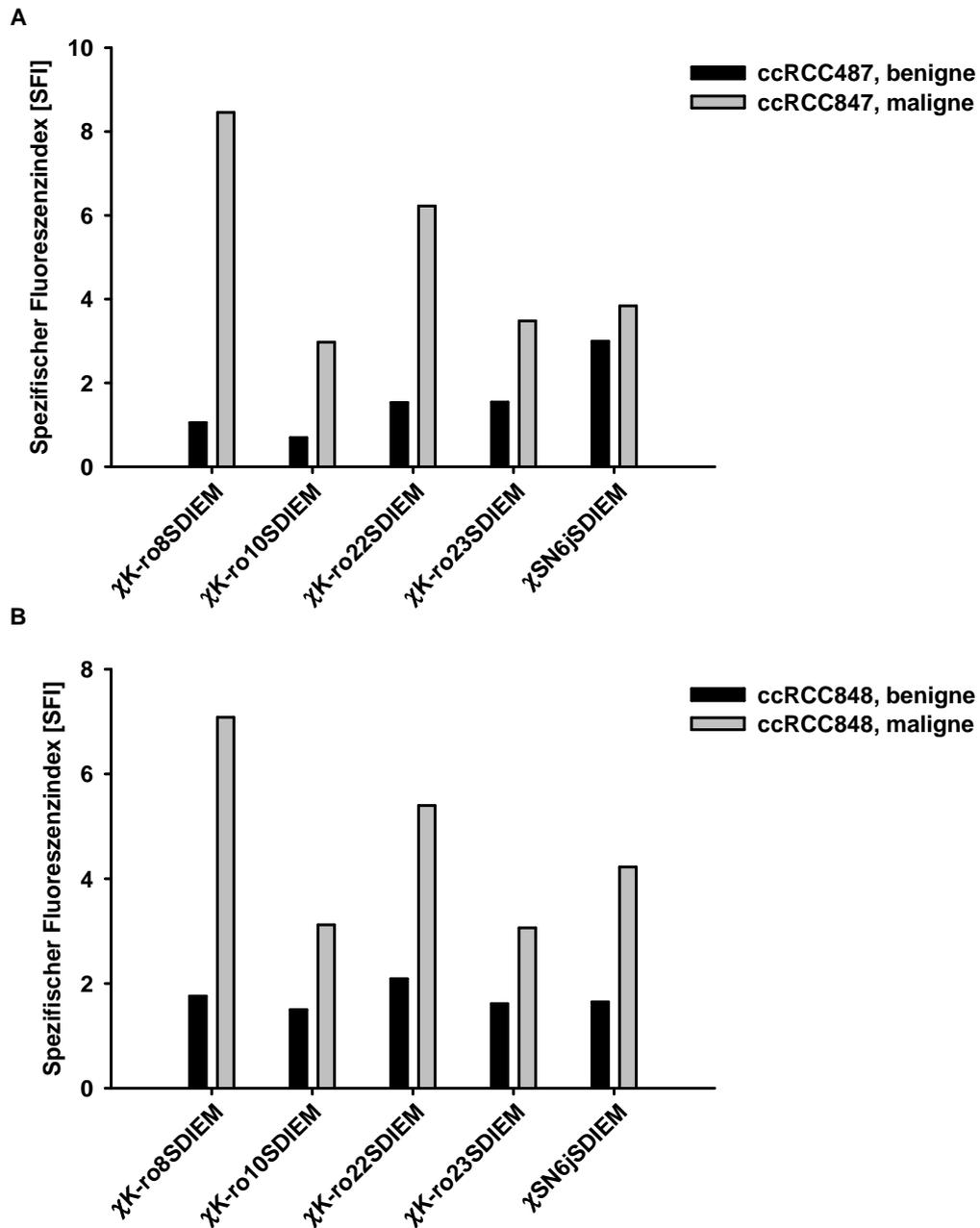


Abbildung 3.25: Bindung der  $\alpha$ Endoglin-Antikörper auf primären  $CD45^-CD31^+-CD34^{high}$ -Endothelzellen der Niere: **A**: Bindung der  $\alpha$ Endoglin-Antikörper auf den Zellen des Spenders RCC847 **B**: Bindung der  $\alpha$ Endoglin-Antikörper auf den Zellen des Spenders RCC848; Antikörperkonzentration:  $5 \mu\text{g}/\text{mL}$ ; Sekundärreagenz: Ziege-anti-Maus-PE

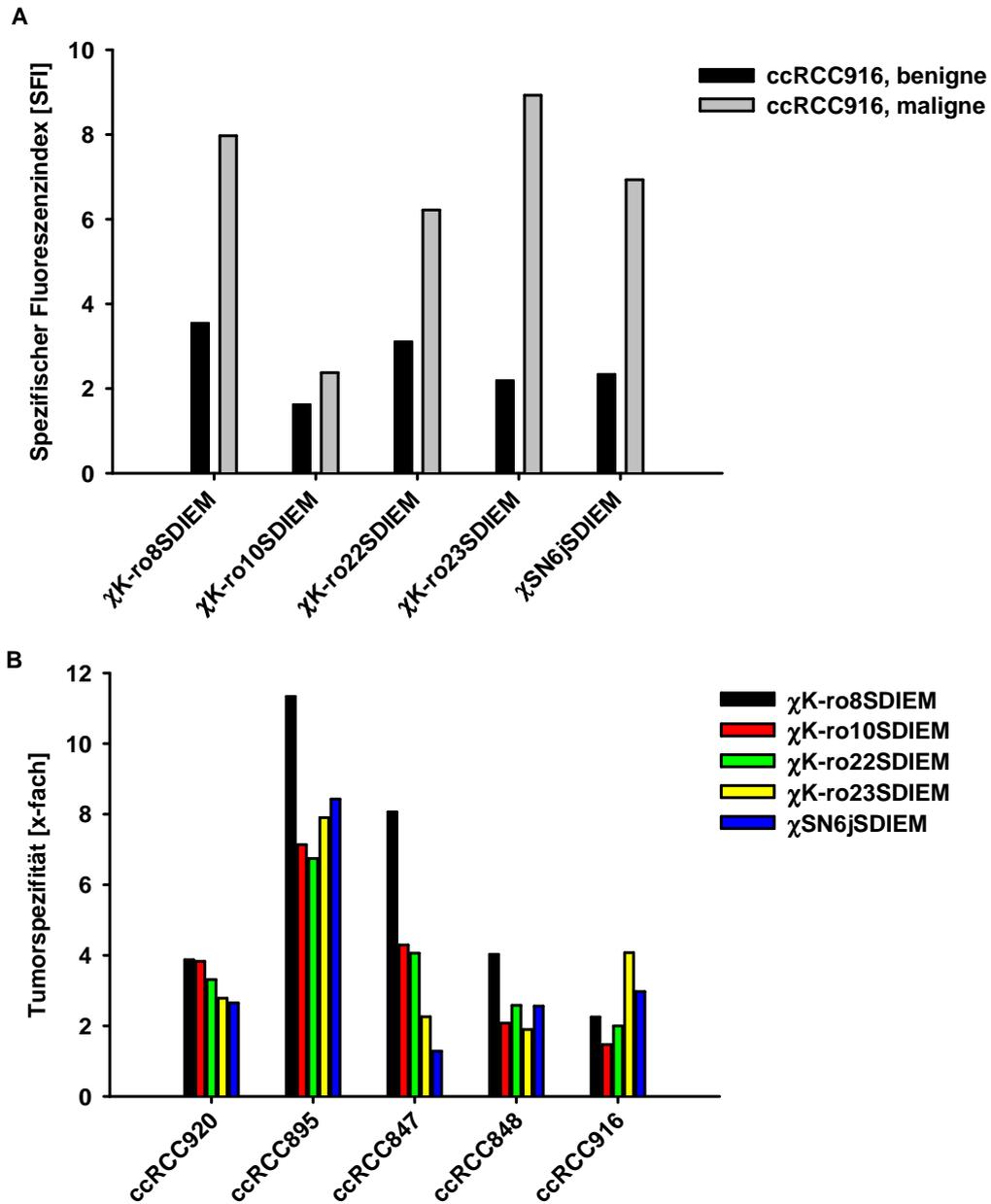


Abbildung 3.26: Bindung der  $\alpha$ Endoglin-Antikörper auf primären  $CD45^-CD31^+$ - $CD34^{high}$ -Endothelzellen der Niere: **A**: Bindung der  $\alpha$ Endoglin-Antikörper auf den Zellen des Spenders RCC916 **B**: Tumorspezifität aller fünf  $\alpha$ Endoglin-Antikörper als Quotient der SFI der malignen und benignen Gewebe aller fünf Spender; Antikörperkonzentration:  $5 \mu\text{g}/\text{mL}$ ; Sekundärreagenz: Ziege-anti-Maus-PE

### 3.1.5.4 Keine Komplement-vermittelte Zytotoxizität

Die Lyse von Zielzellen therapeutischer Antikörper kann sowohl Effektorzell-vermittelt, als auch Komplement-vermittelt erfolgen. Im Folgenden wurden die fünf chimärisierten  $\alpha$ Endoglin-Antikörper bezüglich der Effektorfunktionen charakterisiert.

Alle fünf Moleküle konnten zunächst mittels des  $^{51}\text{Cr}$ -Freisetzungstest auf Induktion von Komplement-vermittelter Zytotoxizität untersucht werden. Hierfür wurden  $\text{ENG}^+$ -Zielzellen mit den zu testenden Antikörpern und humanem Serum inkubiert. In Abbildung 3.27 ist die spezifische  $^{51}\text{Cr}$ -Freisetzung und somit Komplement-vermittelter Zellyse in Prozent dargestellt.

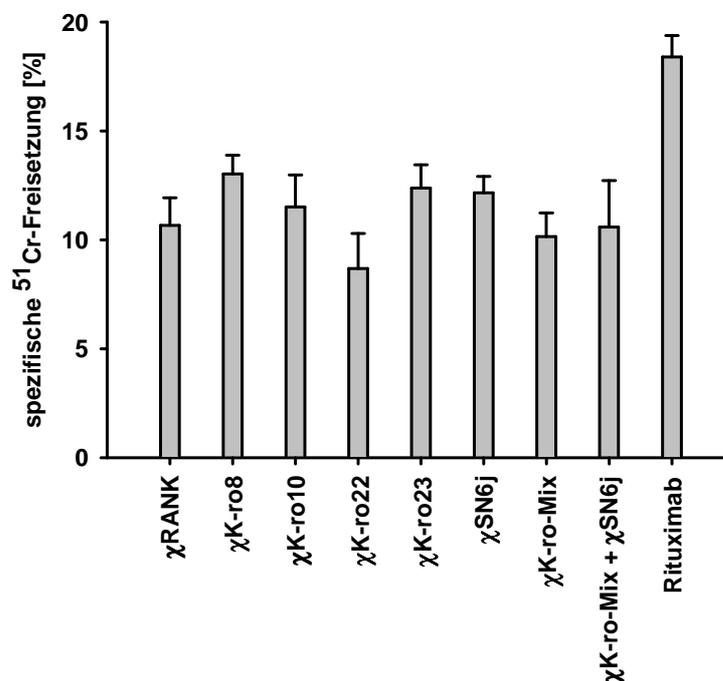


Abbildung 3.27: **Komplement-abhängige Zytotoxizität der chimären  $\alpha$ Endoglin-Antikörper:** Die Komplement-abhängige Zytotoxizität der chimären  $\alpha$ Endoglin-Antikörper wurde mittels  $^{51}\text{Cr}$ -Freisetzungstest analysiert.  $\chi$ K-ro-Mix:  $\chi$ K-ro8,  $\chi$ K-ro10,  $\chi$ K-ro22 und  $\chi$ K-ro23 in einem Versuchsansatz; Positivkontrolle:  $\alpha$ CD20-Antikörper Rituximab; Isotypkontrolle:  $\chi$ RANK; Serumkonzentration: 50%; Zielzellen:  $\text{ENG}^+$ NALM-16 Zellen; Inkubationszeit: 4h

Es konnte keine Komplement-abhängige Zytotoxizität für die einzelnen chimären  $\alpha$ Endoglin-Antikörper nachgewiesen werden. Dies war ebenso für die Kombination aller fünf chimärisierten  $\alpha$ Endoglin-Antikörper ( $\chi$ K-ro Mix +  $\chi$ SN6j) der Fall.

### 3.1.5.5 Deutliche Steigerung der ADCC durch SDIEM-optimierten Antikörper

Die Bestimmung der Antikörper-vermittelten zellulären Zytotoxizität war in dieser Arbeit von zentraler Bedeutung. Der direkte anti-vaskuläre Therapieansatz erfordert einen potenten therapeutischen Antikörper. Die Untersuchungen der mittels gentechnischer Optimierung des Fc-Teils angestrebten verstärkten ADCC-Aktivität der  $\alpha$ Endoglin-Antikörper erfolgten ebenfalls mittels  $^{51}\text{Cr}$ -Freisetzungstest.

Hierbei wurden die  $\text{ENG}^+$ -Zielzellen mit den entsprechenden Antikörpern, sowie mononukleären Zellen des peripheren Blutes gesunder Spender inkubiert. In Abbildung 3.28 sind die einzelnen Vergleiche der  $\alpha$ Endoglin-Antikörperklone K-ro8, K-ro10, K-ro22, K-ro23 und SN6j grafisch dargestellt.

Für alle fünf Antikörper konnte eine deutliche Steigerung der ADCC-Aktivität durch die SDIEM-Optimierung im Fc-Teil im Vergleich zur chimärisierten, nicht-optimierten Variante erzielt werden. Für den Klon K-ro22 konnte sogar erst durch diese Modifikation eine signifikante Zellyse nachgewiesen werden.

### 3.1. ENDOGLIN ALS VASKULÄRES ZIELANTIGEN

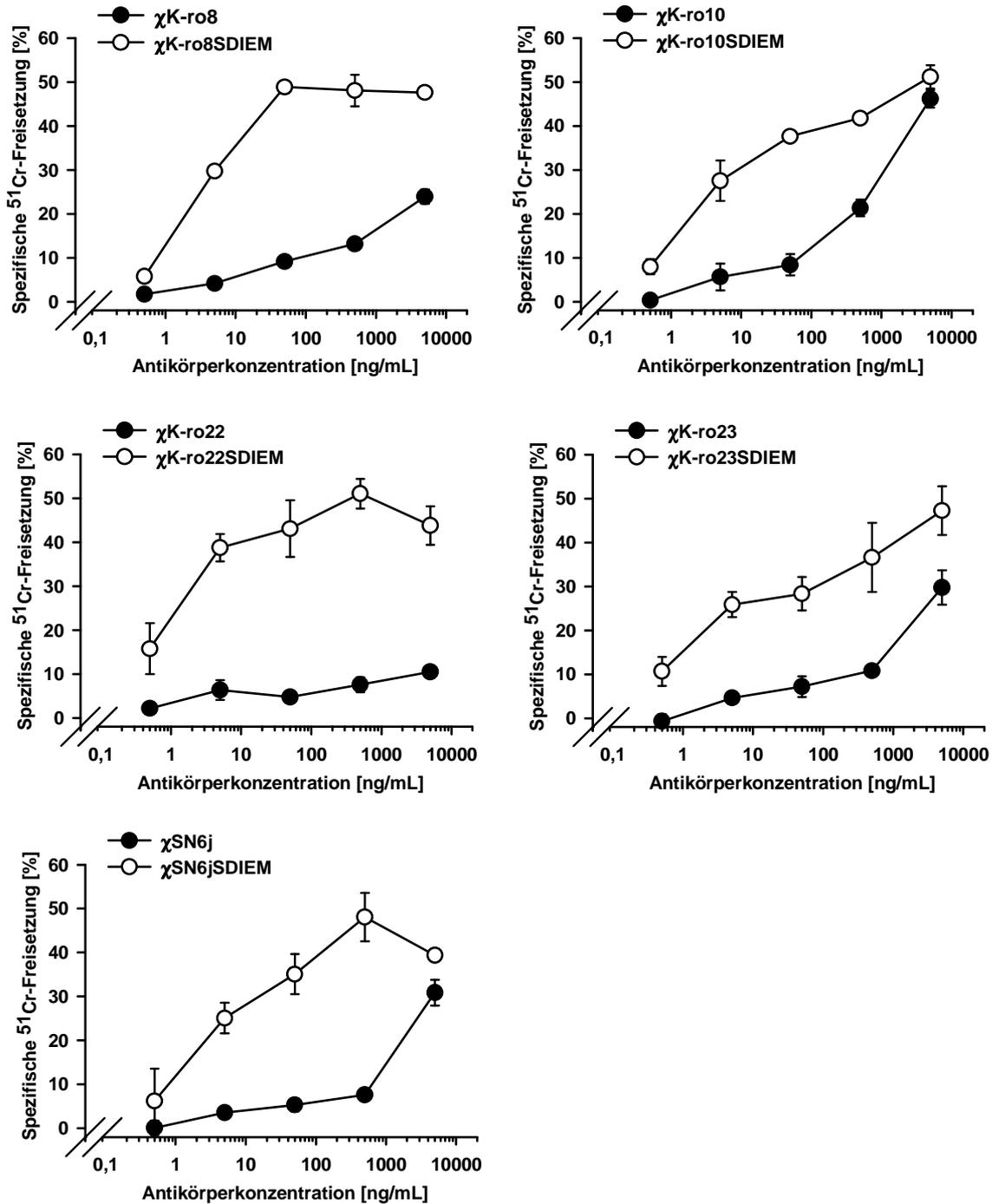


Abbildung 3.28: Antikörper-vermittelte zelluläre Zytotoxizität der chimären und optimierten  $\alpha$ Endoglin-Antikörper auf der Zelllinie NALM-16: Die ADCC-Aktivität der  $\alpha$ Endoglin-Antikörper wurde mittels <sup>51</sup>Cr-Freisetzungstest analysiert. Zielzellen: ENG<sup>+</sup>NALM-16 Zellen; Effektorzellen: PBMC eines gesunden Spenders; Verhältnis Effektorzellen : Zielzellen 50:1; Inkubationszeit: 4h; exemplarische Darstellung von insgesamt drei verschiedenen PBMC-Spendern

In Abbildung 3.29 ist der Vergleich der generierten chimären und optimierten  $\alpha$ Endoglin-Antikörper  $\chi$ K-ro8SDIEM,  $\chi$ K-ro10SDIEM,  $\chi$ K-ro22SDIEM und  $\chi$ K-ro23SDIEM mit dem Referenzantikörper  $\chi$ SN6j (TRC105) dargestellt.

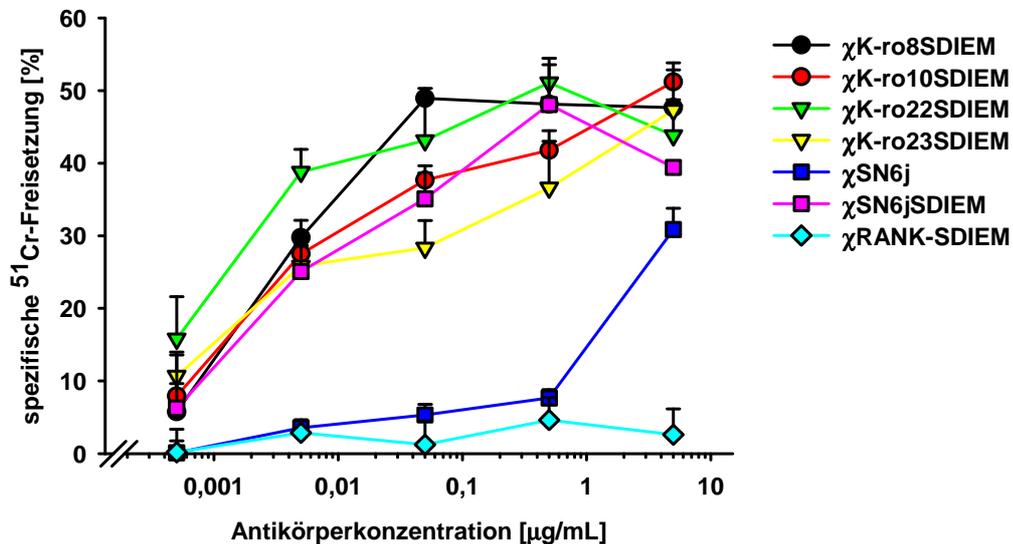


Abbildung 3.29: Antikörper-vermittelte zelluläre Zytotoxizität der chimären und optimierten  $\alpha$ Endoglin-Antikörper auf der Zelllinie NALM-16: Die ADCC-Aktivität der  $\alpha$ Endoglin-Antikörper wurde mittels  $^{51}\text{Cr}$ -Freisetzungstest analysiert. Isotypkontrolle:  $\chi$ RANK-SDIEM; Zielzellen:  $\text{ENG}^+$ NALM-16 Zellen; Effektorzellen: PBMC eines gesunden Spenders; Verhältnis Effektorzellen : Zielzellen 50:1

Alle vier neuen chimären und optimierten  $\alpha$ Endoglin-Antikörper weisen eine deutlich stärkere ADCC-Aktivität auf, als der bereits in klinischer Phase befindliche Antikörper  $\chi$ SN6j bzw. TRC105 der Firma TRACON Pharmaceuticals. Letzterer konnte allerdings durch den SDIEM-modifizierten Fc-Teil ebenfalls stark verbessert werden.

### 3.1.5.6 ADCC der optimierten $\alpha$ Endoglin-Antikörper auf primären Endothelzellen

Die Antikörper-vermittelte zelluläre Zytotoxizität der  $\alpha$ Endoglin-Antikörper auf primären adhärennten Endothelzellen der Nabelschnurvene (*engl. human umbilical vein endothelial cells*, HUVEC) wurde mittels Impedanzmessung bestimmt. In Schaubild 3.30 ist die spezifische Lyse nach 2 h dargestellt.

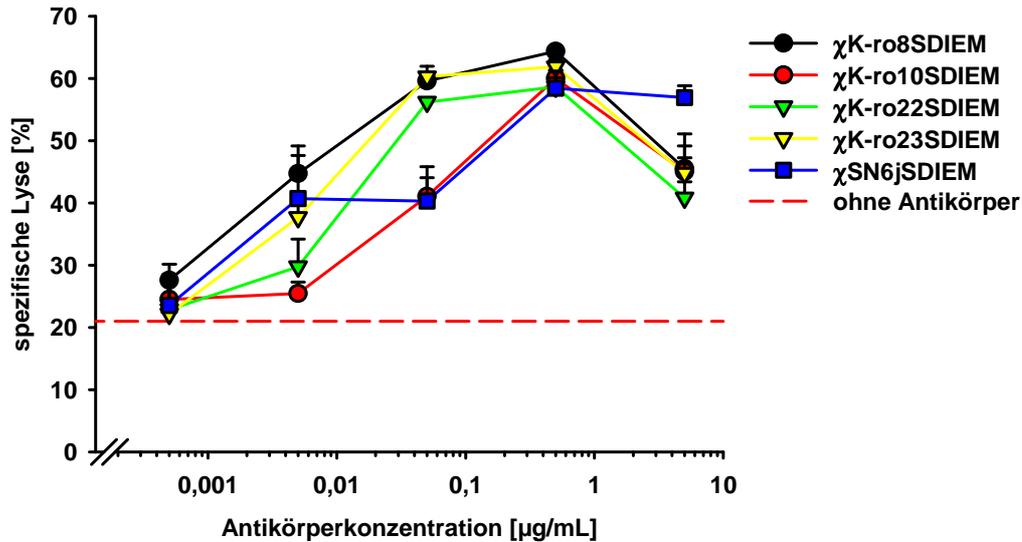


Abbildung 3.30: Antikörper-vermittelte zelluläre Zytotoxizität der optimierten  $\alpha$ Endoglin-Antikörper auf den adhärennten primären  $\text{ENG}^+$ Endothelzellen: Die ADCC-Aktivität der  $\alpha$ Endoglin-Antikörper wurde mittels Impedanzmessung analysiert. Zielzellen: HUVEC; Effektorzellen: PBMC eines gesunden Spenders; Verhältnis Effektorzellen : Zielzellen 50:1

Grundsätzlich konnte für alle getesteten Antikörper eine spezifische Lyse der HUVECs nachgewiesen werden. In diesem Experiment wurden alle fünf SDIEM-optimierten  $\alpha$ Endoglin-Antikörper miteinander verglichen, wobei die auftretenden Unterschiede zwischen den einzelnen Klonen nur minimal waren. Jedoch ist die Tendenz für eine stärkere ADCC-Aktivität für den  $\chi$ K-ro8SDIEM auf primären Zellen auch hier erkennbar.

### 3.1.5.7 Immunhistologische Analyse des $\chi$ K-ro8SDIEM auf malignem Pankreasgewebe

Im Rahmen der immunhistologischen Untersuchungen der *human frozen tissue arrays* (vgl. Abschnitt 3.1.3.6 und Abschnitt 3.1.5.3) konnten auf verschiedenen Pankreastumoren besonders starke Färbungen durch die verschiedenen  $\alpha$ Endoglin-Antikörper nachgewiesen werden. Hierbei handelt es sich jedoch nicht nur um eine vaskuläre Färbung durch eine Bindung der Endothelzellen des Tumors, sondern ebenso des umgebenden Tumorgewebes. Zur weiteren Verifizierung dieser unerwarteten Ergebnisse wurden sechs weitere Pankreastumore auf Bindung des  $\alpha$ Endoglin-Antikörpers  $\chi$ K-ro8SDIEM immunhistologisch analysiert (vgl. Abbildung 3.31).

Die immunhistologischen Untersuchungen zeigten neben einem vaskulären Färbemuster die zusätzliche Färbung des umgebenden Bindegewebes auf vier von sechs Pankreastumoren (#1, #2, #4 und #6).

### 3.1. ENDOGLIN ALS VASKULÄRES ZIELANTIGEN

---

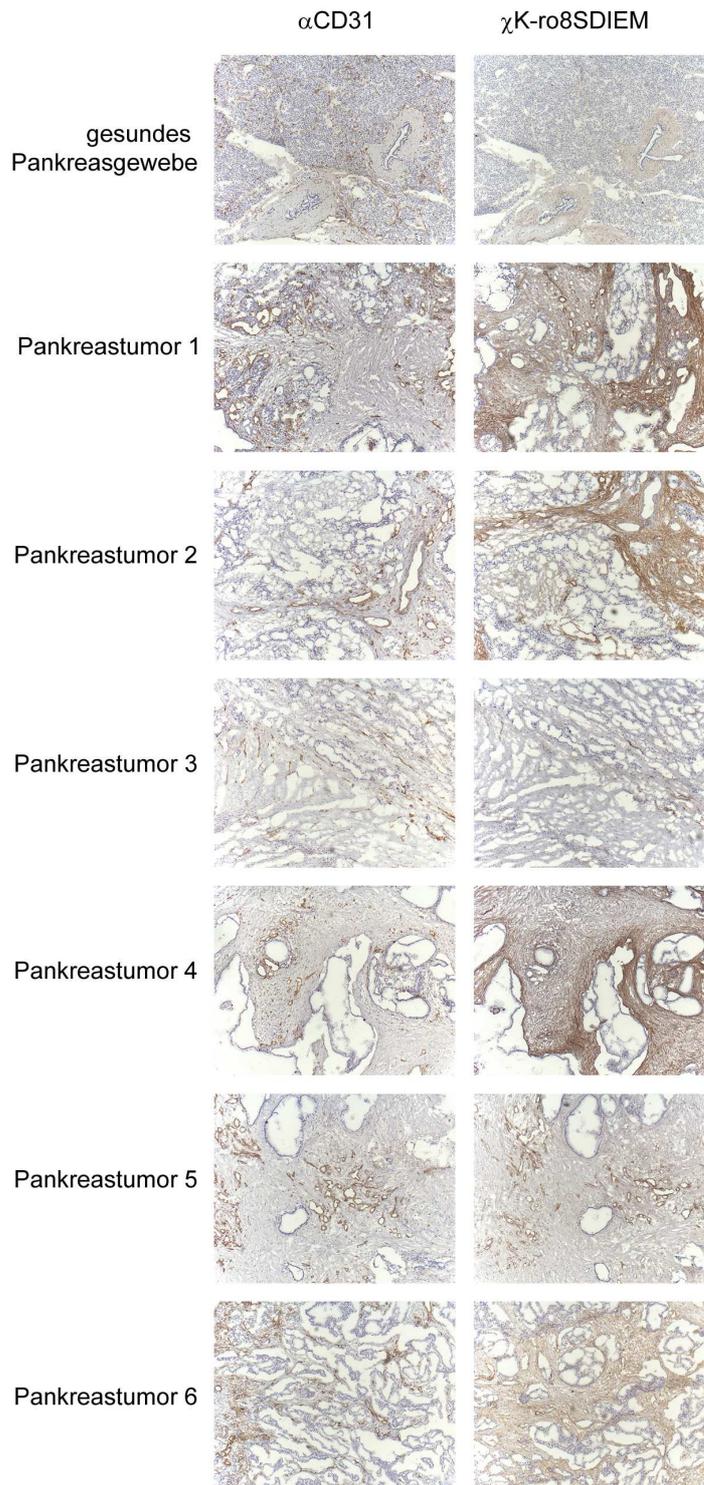


Abbildung 3.31: **Endoglin-Expression auf malignem Pankreasgewebe:** Immunhistologische Analyse des  $\chi$ K-ro8SDIEM auf gesundem Pankreasgewebe, sowie auf sechs unterschiedlichen Pankreastumoren. Als Kontrolle wurde der  $\alpha$ CD31-Antikörper zur Färbung der Endothelzellen verwendet. Braun: spezifische Antikörperbindung; Detektion mittels HRP-Polymer und DAB-Färbung; blau: Gegenfärbung mit Hämatoxylin

## 3.2 Identifizierung neuer vaskulärer Zielantigene

### 3.2.1 W3C4E11 zeigt ein gefäß-typisches immunhistologisches Färbemuster

Im Rahmen dieser Arbeit konnte, neben der Generierung und Charakterisierung neuer Antikörper gegen das als vaskulär-exprimiertes Antigen beschriebene Endoglin, ein weiteres potentiell Zielantigen zur anti-angiogenetischen Tumortherapie identifiziert werden. Dazu wurden verschiedene Antikörper auf Kryoschnitten von Nierenzellkarzinomen und gesundem Nierengewebe immunhistologisch gefärbt und bezüglich eines vaskulären Färbemusters bewertet.

Der Antikörper W3C4E11 führte im Zuge dieser Analysen zu einem vaskulären und auch besonders Tumorendothel-spezifischen Färbemuster (vgl. Abbildung 3.33). In Tabelle 3.5 sind die Resultate der immunhistologischen Färbungen eines *human frozen tissue arrays* dargestellt.

Tabelle 3.5: **Bewertung der Färbeintensität des Antikörperklons W3C4E11** auf 14 verschiedenen, immunhistologisch gefärbten Geweben (jeweils maligne und benigne) eines *human frozen tissue arrays*; -: keine Färbung +: schwache Färbung ++: mäßige Färbung +++: starke Färbung ++++: sehr starke Färbung; Die Beurteilung der Färbeintensität erfolgte durch zwei Personen.

	W3C4E11	
	Gesundes Gewebe	Tumorgewebe
<b>Gehirn</b>	-	-
<b>Brust</b>	+	+++
<b>Kolon</b>	+	+++
<b>Niere</b>	(+)	++
<b>Leber</b>	-	(+)
<b>Lunge</b>	+	++(+)
<b>Pankreas</b>	(+)	+++
<b>Prostata</b>	+++	+(+)
<b>Skelettmuskel</b>	(+)	++++
<b>Haut</b>	(+)	++
<b>Dünndarm</b>	+	++
<b>Magen</b>	+(+)	++++
<b>Ovar</b>	+++(+)	+
<b>Uterus</b>	++(+)	+++

Es wurden für diesen Antikörperklon generell deutlich stärkere Färbeintensitäten auf den verschiedenen Tumorgeweben, im Vergleich zu den entsprechenden Normalgeweben, nachgewiesen. Die Untersuchungen ergaben lediglich eine starke bis sehr starke Färbung auf dem Normalgewebe der Prostata und des Ovars, die entsprechenden malignen Gewebeschnitte wurden hingegen nur schwach angefärbt. Deutlich stärkere Färbeintensitäten konnten auf den malignen Geweben von Brust, Kolon, Pankreas, Skelettmuskel, Magen und Uterus detektiert werden, wobei für diese Gewebetypen

(mit Ausnahme des Uterus) nur eine schwache Färbung auf dem Normalgewebe nachgewiesen wurde.

Der Klon W3C4E11 war durch Immunisierung von Mäusen mit WERI-Rb1 Zellen im Labor von Dr. Hans-Jörg Bühring (Universitätsklinikum Tübingen, Abteilung für Innere Medizin II) mittels Hybridomtechnik generiert worden. Es handelt sich um einen mIg $\mu$ -Antikörper, welcher als spezifisch an das Antigen frizzled-9 (FZD9) bindend publiziert ist [Battula et al., 2007]. W3C4E11 ist der derzeit einzig beschriebene monoklonale  $\alpha$ FZD9-Antikörper. Aus diesen Gründen sollten neue  $\alpha$ FZD9-Antikörper mittels Hybridomtechnik generiert werden.

#### 3.2.2 Generierung von FZD9-exprimierenden Zelllinien

Die Generierung einer FZD9-exprimierenden Zelllinien für die Immunisierung von Mäusen erfolgte mit Hilfe der kommerziell erhältlichen FZD9 cDNA (I.M.A.G.E. clone #4791657, imaGenes GmbH). Die amplifizierte und mit entsprechenden Restriktionsschnittstellen versehene cDNA wurde in einen Expressionsvektor ligiert und zur Transfektion von Sp2/0-Ag14- und CHO-Zellen verwendet. Die zellmembranständige Expression konnte anschließend mittels des Antikörpers W3C4E11 durchflusszytometrisch analysiert werden. In Abbildung 3.32 ist das Histogramm der generierten FZD9<sup>+</sup>Sp2/0-Ag14 Zelllinie dargestellt. Es konnte ein mittleres Differenzsignal im Vergleich zur untransfizierten Zelllinie nachgewiesen werden. Für die CHO-Transfektante wurde nur ein sehr schwaches Fluoreszenzsignal ermittelt (vgl. Abbildung 3.34).

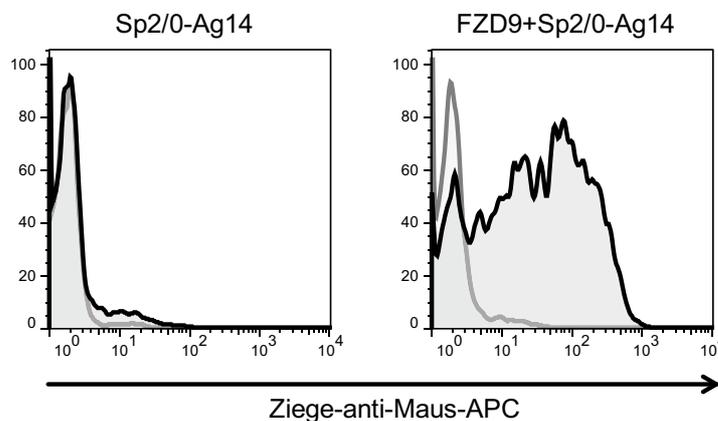


Abbildung 3.32: **W3C4E11-Bindung auf transfizierter Zelllinie:** Durchflusszytometrische Analyse der zellmembranständigen Antigenexpression der FZD9-transfizierten Sp2/0-Ag14-Zelllinie; hellgraue Linie: mIgM-Isotypkontrolle [10  $\mu$ g/mL]; schwarze Linie: ankonzentrierter Zellkulturüberstand des W3C4E11; Sekundärreagenz: Ziege-anti-Maus-APC

#### 3.2.3 Generierung FZD9-spezifischer Antikörper

Zur Generierung eigener  $\alpha$ FZD9-Antikörper wurden Sp2/0-Ag14-Transfektanten zur Immunisierung von BALB/c-Mäusen verwendet. Allerdings konnten in beiden Fusionen ausschließlich unspezifische Antikörper generiert werden. Aufgrund einer

sehr hohen Homologie von 98% zwischen dem Maus- und dem humanem Protein FZD9 wurden anschließend NZB/W F1-Mäuse zur Immunisierung verwendet. Da die Expression der eigens hergestellten Transfektanten (CHO und Sp2/0-Ag14) jedoch sehr schwach war, wurden zur Immunisierung dieser Mäuse HEK293-FZD9-Transfektanten aus dem Labor von Dr. Hans-Jörg Bühring verwendet [Battula et al., 2007]. Es konnte ein spezifischer Antikörperklon generiert werden, welcher als K-zd1 (*Krizzled 1*) bezeichnet wurde. Die durchflusszytometrische Analytik zeigte eine deutliche Bindung dieses Antikörpers auf den FZD9-transfizierten Sp2/0-Ag14 im Vergleich zur untransfizierten Zelllinie (vgl. Abbildung 3.34). Der mIg $\mu$ -Isotyp von K-zd1 wurde mittels Kit bestimmt.

### 3.2.4 Vergleich beider Antikörper K-zd1 und W3C4E11

Der generierte  $\alpha$ FZD9-Antikörper K-zd1 sollte bezüglich Antigen-Bindung und vaskulärem Färbemuster mit dem von Dr. Hans-Jörg Bühring generierten Molekül W3C4E11 verglichen werden.

**Kein vaskuläres Färbemuster durch K-zd1** Das immunhistologische Färbemuster des  $\alpha$ FZD9-Antikörpers K-zd1 wurde auf Gefrierschnitten von Nierenzellkarzinom und kommerziell erhältlichem, gesunden Nierengewebe analysiert. Überraschenderweise zeigte das Molekül K-zd1 kein spezifisch vaskuläres Färbemuster. Statt dessen wurde hauptsächlich umgebendes Gewebe der Gefrierschnitte angefärbt (vgl. Abbildung 3.33).

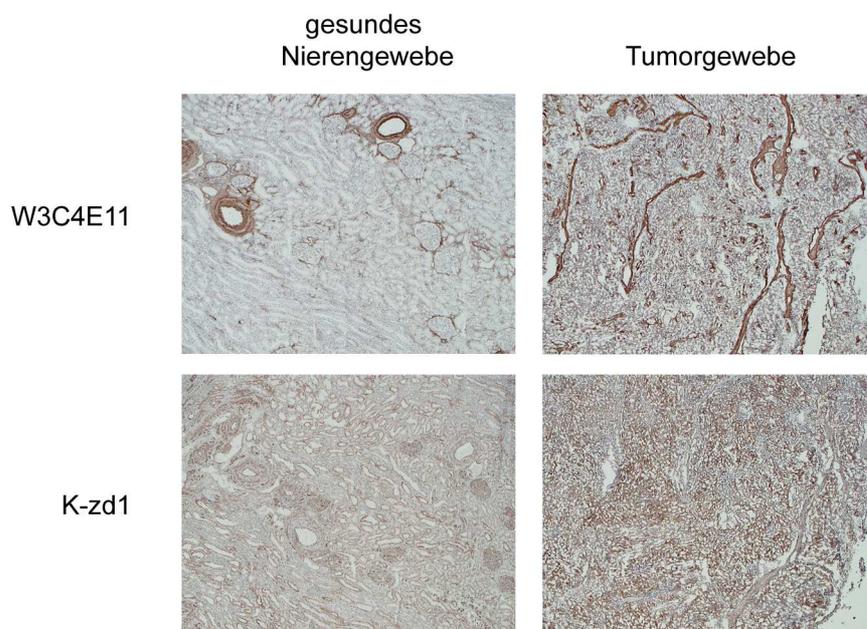


Abbildung 3.33: **Immunhistologischer Vergleich von W3C4E11 und K-zd1:** Immunhistologische Färbung von W3C4E11 und K-zd1 (jeweils unter Verwendung von unverdünntem Zellkulturüberstand) auf einem Nierenzellkarzinom (RCC) und kommerziellem gesundem Nierengewebe. Braun: spezifische Antikörperbindung; Detektion mittels HRP-Polymer und DAB-Färbung; blau: Gegenfärbung mit Hämatoxylin

**K-zd1 bindet spezifisch an FZD9** Aufgrund der abweichenden Ergebnisse der immunhistologischen Untersuchungen wurden die Spezifitäten der beiden Proteine K-zd1 und W3C4E11 näher miteinander verglichen. Hierfür wurde die Bindung beider Antikörper auf acht HEK293-Transfektanten (FZD1<sup>+</sup>, FZD2<sup>+</sup>, FZD4<sup>+</sup>, FZD5<sup>+</sup>, FZD6<sup>+</sup>, FZD7<sup>+</sup>, FZD9<sup>+</sup> und FZD10<sup>+</sup>; Dr. Hans-Jörg Bühring), sowie auf den generierten Zelllinien FZD9<sup>+</sup>Sp/20-Ag14 und FZD9<sup>+</sup>CHO durchflusszytometrisch untersucht.

Die Analyse ergab für beide Klone eine sehr starke Bindung an FZD9<sup>+</sup>HEK293-Zellen. Im Gegensatz zu K-zd1 wurde für W3C4E11 ebenso eine starke Bindung an die übrigen sieben FZD-Transfektanten nachgewiesen. Des Weiteren wurde für W3C4E11 aufgrund eines starken Hintergrundsignals nur ein schwaches Differenzsignal zwischen den untransfizierten Zelllinien und den FZD9<sup>+</sup>CHO bzw. FZD9<sup>+</sup>Sp2/0-Ag14 gezeigt. Für K-zd1 wurde hingegen eine spezifische Bindung an FZD9<sup>+</sup>Sp2/0-Ag14 Zellen, sowie an FZD9<sup>+</sup>CHO Zellen nachgewiesen. Interessanterweise zeigte K-zd1 nur eine sehr schwache Bindung an WERI-Rb1-Zellen. Der W3C4E11 zeigte hingegen ein starkes Signal auf den WERI-Rb1-Zellen (vgl. Abbildung 3.34).

Diese Ergebnisse bestätigen die Annahme, dass der in dieser Arbeit generierte Antikörper K-zd1 spezifisch an das Membranprotein FZD9 bindet. Da allerdings kein gefäß-typisches Färbemuster mittels Immunhistologie generiert wurde, scheint dieses Molekül zur potentiellen anti-angiogenetischen Immuntherapie ungeeignet. Im Gegensatz hierzu, ist der Antikörper W3C4E11 mit nunmehr unklarer Spezifität, aufgrund des viel versprechenden vaskulären Färbemusters, nach wie vor von Interesse.

Eine genauere Charakterisierung des Zielantigens des W3C4E11 wurde allerdings durch auftretende Probleme bei Aufreinigung (u.a. über Hydroxyapatit) des mIg $\mu$ -Antikörpers erschwert, da der Antikörper zur ausgeprägten Aggregatbildung neigte. Das Molekül verlor dadurch seine Bindungskapazität. Aufgrund dieser Problematik sollte der Antikörper in ein biochemisch stabiles Format umkloniert werden. Die Wahl fiel auf ein chimären Ig $\gamma$ 1-Format, welcher leicht produziert, aufgereinigt, sowie charakterisiert werden kann.

#### 3.2.5 Chimärisierung des mIg $\mu$ -Antikörpers W3C4E11

**Klonierung** Die Chimärisierung erfolgte in Analogie zur Klonierung der  $\alpha$ Endoglin-Antikörperklone (vgl. Abschnitt 3.1.4.1 auf Seite 92). Für den Antikörper W3C4E11 wurden insgesamt drei PCR-Amplikons generiert. Für die schwere Kette konnte eine deutliche Bande im H1-2-Pool nachgewiesen werden, im Falle der *kappa*-Kette wurde ein starkes Signal im K2-Pool, sowie ein sehr schwaches Signal im K4-Pool detektiert (Daten nicht dargestellt). Da durch die degenerierten Primer des K2-Pools erfahrungsgemäß die aberrante *kappa*-Kette des Fusionspartners Sp2/0-Ag14 amplifiziert wird, wurde das schwache Amplikon des K4-Pools zur weiteren Klonierung verwendet.

Zur weiteren Verifizierung der variablen Antikörpersegmente wurden die Peptidsequenzen der leichten und schweren Kette des mIg $\mu$ -Antikörpers W3C4E11

nach Trypsinverdau mittels Massenspektrometrie analysiert. Die Untersuchung erfolgte durch Dr. Jörn Dengjel vom Freiburger Zentrum für Biosystemanalyse. Er konnte eine 51 %ige Übereinstimmung zwischen der vorhergesagten Sequenz für die schwere Kette und den analysierten Peptiden, sowie entsprechend eine 93 %ige Übereinstimmung für die leichte Kette des W3C4E11 nachweisen. Dies war eine Bestätigung der korrekt identifizierten und klonierten Sequenzen der variablen Domänen des W3C4E11.

Das Projekt wurde von Dr. Michael Durben und Martin Pflügler übernommen. Nach Transfektion wurde die Bindung der chimären ( $\chi$ W3C4E11) und optimierten Variante ( $\chi$ W3C4E11 SDIEM) auf der zur Immunisierung verwendeten Zelllinie WERI-Rb1 überprüft. Weitere Untersuchungen zur Charakterisierung des unklaren Zielantigens sind momentan in Gang.

### 3.2. IDENTIFIZIERUNG NEUER VASKULÄRER ZIELANTIGENE

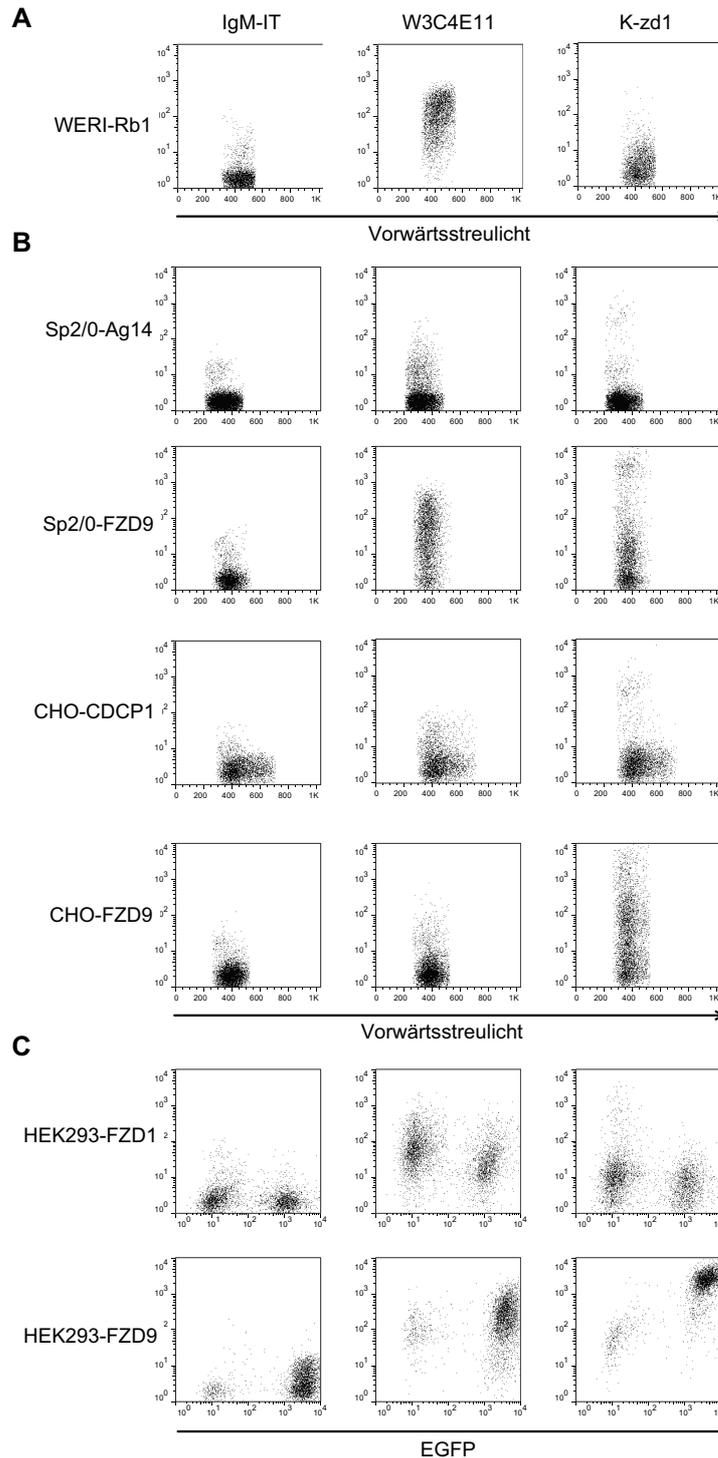


Abbildung 3.34: **FACS-Analyse der beiden Antikörperklone K-zd1 und W3C4E11 auf verschiedenen Zelllinien:** **A:** Analyse der humanen Zelllinie WERI-Rb1, welche zur Mausimmunisierung des mittels Hybridomtechnik hergestellten Klons W3C4E11 verwendet wurde. **B:** Analyse der FZD9<sup>+</sup>Transfektanten CHO-FZD9 und Sp2/0-Ag14-FZD9, sowie der entsprechenden Zelllinien, welche untransfiziert bzw. mit irrelevantem Antigen transfiziert wurden (Sp2/0-Ag14 und CHO-CDCP1). **C:** Analyse der FZD9<sup>+</sup>Transfektante HEK293, sowie exemplarisch von HEK-FZD1. Vergleichbare Ergebnisse wurden für HEK-FZD2, HEK-FZD4, HEK-FZD5, HEK-FZD6, HEK-FZD7 und HEK-FZD10 ermittelt (nicht dargestellt). Sekundärreagenz: Ziege-anti-Maus-APC

# Kapitel 4

## Diskussion

### Inhaltsangabe

---

<b>4.1</b>	<b>Endoglin als vaskuläres Zielantigen . . . . .</b>	<b>122</b>
4.1.1	Initiale Analysen zur Endoglinexpression . . . . .	123
4.1.2	Generierung neuer $\alpha$ Endoglin-Antikörper . . . . .	124
4.1.3	Spezifität für das Tumorendothel . . . . .	125
4.1.4	Sonstige den Therapieerfolg-beeinflussende Parameter . .	126
4.1.5	Chimärisierung und SDIEM-Modifikation ausgewählter $\alpha$ Endoglin-Antikörper . . . . .	128
4.1.6	Optimierte Effektorfunktionen der $\alpha$ Endoglin-Antikörper durch SDIEM-Modifikation . . . . .	129
4.1.7	Tumorendothelspezifität chimärer $\alpha$ Endoglin-Antikörper im Vergleich mit TRC105 . . . . .	130
4.1.8	Schlussfolgerung, Indikation, Ausblick . . . . .	132
<b>4.2</b>	<b>W3C4E11 als anti-vaskulärer Antikörper . . . . .</b>	<b>135</b>

---

## 4.1 Endoglin als vaskuläres Zielantigen

Die anti-angiogenetische Therapie gehört derzeit zu den vielversprechendsten Strategien im Kampf gegen solide Tumorerkrankungen. Im Gegensatz zu genetisch hochgradig instabilen malignen Zellen selbst, bietet das den Tumor versorgende und damit essentielle Blutgefäßsystem -im Prinzip- bessere Angriffspunkte. Im Gegensatz zur Hemmung löslicher Wachstumsfaktoren, wie VEGF, war das Ziel dieser Arbeit die direkte Zerstörung der Tumorgefäße. Die somit fehlende Sauerstoff- und Nährstoffversorgung soll durch Inhibierung der Gefäßneubildung zur Blockierung eines weiteren Tumorwachstums und zusätzlich durch direkte Endothelzellyse zum Aushungern des bestehenden Tumors führen. Die Öffnung der Tumorgefäße könnte außerdem die Einwanderung körpereigener Immunzellen begünstigen oder auch die Zugänglichkeit für anti-Tumor-Medikamente verbessern. Resistenzen, wie sie gegenüber konventionellen Medikamenten, die direkt gegen den Tumor wirken, entstehen, könnten dabei umgangen werden. Auch bietet dieser Ansatz ein potentiell weites Spektrums an behandlungsfähigen Krebserkrankungen, da alle soliden Tumoren auf eine ausreichende Blutversorgung angewiesen sind. Ein weiterer großer Vorteil dieses Therapieansatzes ist die gute Zugänglichkeit von Blutgefäßen, da insbesondere für „große“ Arzneimittel, wie Antikörper, keine Penetration in das umliegende Tumorgewebe erforderlich ist.

Die zentrale und gleichzeitig am schwierigsten zu erfüllende Anforderung an ein solches Therapeutikum stellt allerdings die Spezifität für das Tumorendothel dar. Eine unerwünschte Bindung und Zerstörung gesunder Blutgefäße kann zu erheblichen Nebenwirkungen führen.

**Auswahl des Zielantigens** Im Rahmen dieser Arbeit erfolgte die Auswahl des Zielantigens zur potentiellen Antikörper-vermittelten anti-vaskulären Tumorthherapie daher hauptsächlich anhand folgender drei Gesichtspunkte:

1. membranständiges Endothelprotein
2. starke Überexpression auf dem Tumorendothel
3. höchstmögliche Tumorendothelspezifität im Vergleich zum gesunden Blutgefäßsystem

Bei dem ersten zugelassenen anti-vaskulär wirkenden Medikament, dem monoklonalen humanisierten Antikörper Bevacizumab, ist das Zielantigen der lösliche Wachstumsfaktor VEGF (*engl. vascular endothelial growth factor*). Der Wirkmechanismus dieses Moleküls liegt allerdings lediglich in der Neutralisierung des pro-angiogenetischen Wachstumsfaktors, ohne Induktion einer spezifischen Immunantwort gegen das Tumorendothel. Um solch eine gewünschte, spezifische und darüber hinaus effektive und langanhaltende Immunreaktion erzielen zu können, muss es sich bei dem Zielantigen um ein membranständiges Protein handeln. Durch Antikörper-vermittelte Effektormechanismen kann dann eine effektive Lyse der Endothelzellen und damit auch das Öffnen der Tumor-versorgenden Gefäße erreicht werden. Dies begünstigt die Infiltration von Immunzellen in den Tumor und ermöglicht somit eine spezifische Immunreaktion des Körpers gegen die malignen Zellen.

### 4.1.1 Initiale Analysen zur Endoglinexpression

Als Zielantigen, welches diese drei gesetzten Anforderungen für einen erfolgreichen anti-vaskulären Therapieansatz erfüllen könnte, wurde das membranständige Protein Endoglin als potentieller Kandidat gewählt. Die initialen Untersuchungen bezüglich Antigenexpression unterschiedlicher Gewebetypen, sowie Tumorendothelspezifität erfolgten mittels Immunhistologie.

Es wurden mehrere bereits verfügbare  $\alpha$ Endoglin-Antikörper zunächst auf eigens angefertigten benignen und malignen Nierengewebeschnitten getestet, wobei alle untersuchten Antikörper ein vaskuläres Färbemuster zeigten. Zur Analyse weiterer Gewebetypen wurden sogenannte *human frozen tissue arrays* immunhistologisch gefärbt und ausgewertet. Diese beinhalteten 14 unterschiedliche maligne Schnitte mit jeweils entsprechendem benignen Gewebe. Dieser *array* ermöglichte somit eine parallele und verhältnismäßig schnelle immunhistologische Analyse von z.B. Gehirn, Lunge, Niere, Colon und Pankreas. Mit Ausnahme der Leber ergab sich für den kommerziellen  $\alpha$ Endoglin-Referenzantikörper SN6 eine verstärkte Antikörperbindung und somit Färbeintensität auf allen 13 malignen Gefrierschnitten, im Vergleich zum entsprechenden gesunden Gewebe. Die Differenz der Färbeintensität zwischen den benignen und malignen Schnitten war für den Pankreas, die Niere, den Skelettmuskel, sowie die Haut am größten. Diese Ergebnisse konnten somit die beschriebene Überexpression von Endoglin auf Tumorendothel auf unterschiedlichsten Geweben bestätigen.

Dass verschiedene  $\alpha$ Endoglin-Antikörper durchaus unterschiedliche Färbemuster auf benignem und malignem Geweben zeigen können, wurde durch den Vergleich von vier Antikörperklonen gezeigt. Anhand der analysierten *human frozen tissue arrays* konnten für die beiden Mausantikörper SN6 und Endo-2 völlig unterschiedliche Färbemuster auf dem gesunden Skelettmuskel und dem entsprechenden Rhabdomyosarkom nachgewiesen werden. Diese beiden Antikörper zeigten somit deutliche Unterschiede bezüglich der Spezifität für das Endothel des Tumors. Zurückzuführen sind diese Ergebnisse wahrscheinlich auf die Bindung verschiedener Epitope des Endoglinmoleküls.

Zusätzlich wurde die Bindung aller vier untersuchten Antikörper an humanes, endogenes Endoglin einer Prä-B-ALL-Zelllinie durchflusszytometrisch analysiert. Hierbei ergaben sich v.a. deutliche Unterschiede in den maximalen Fluoreszenzintensitäten, welche, zumindest im Falle der beiden Klone SN6 und Endo-1, nicht auf unterschiedliche Affinitäten des verwendeten polyklonalen Sekundärreagenz gegenüber verschiedener Isotypen zurückzuführen sind und bestätigen daher die Hypothese der unterschiedlichen Epitoperkennung beider Antikörper.

Diese initialen Resultate bestätigten damit zusammengefasst die vaskuläre Expression von Endoglin, sowie die starke Überexpression auf dem Endothel von Tumoren. Zusätzlich belegt der ausgeprägte Phänotyp der Endoglin-abhängigen Gefäßerkrankung Morbus Osler die physiologische Relevanz des Proteins. Diese Eigenschaften identifizieren Endoglin als besonders vielversprechendes Zielantigen zur anti-angiogenetischen Tumorthherapie. Diese begründen auch die Möglichkeit,  $\alpha$ Endoglin-Antikörper mit verbesserter Tumorendothelspezifität zu generieren. Es

wird angenommen, dass die durch den Tumor initiierte, unkontrollierte Neoangiogenese zu einer heterogenen, aberranten Endoglin-Expression auf den Endothelzellen führt. Dabei sind unterschiedliche Modifikationen des Endoglins denkbar, wie ein verändertes Glykosylierungsmuster oder eine aberrante räumliche Anordnung des Homodimers auf der Oberfläche einer Tumor-assoziierten Endothelzelle. Je nach erkanntem Epitop des  $\alpha$ Endoglin-Antikörpers kann somit die Spezifität für stark proliferierende Endothelzellen des Tumors deutlich variieren. Die Generierung neuer  $\alpha$ Endoglin-Antikörper mit erhöhter Tumorendothelspezifität erscheint somit plausibel.

#### 4.1.2 Generierung neuer $\alpha$ Endoglin-Antikörper

Im Rahmen dieser Arbeit konnten 21 neue Hybridome generiert werden, welche Endoglin-spezifische Antikörper produzieren. Diese wurden aus vier unterschiedlichen Mausimmunisierungen gewonnen. Die initiale durchflusszytometrische Testung der Hybridomzellkulturüberstände ließ aufgrund der stark variierenden maximalen Fluoreszenzindices bereits zu einem frühen Zeitpunkt darauf schließen, dass die Antikörper verschiedene Epitope erkennen. Dies galt als wichtige Voraussetzung für die gewünschte, verbesserte Spezifität für die blutversorgenden Gefäße des Tumors.

Angestrebter Wirkmechanismus der produzierten  $\alpha$ Endoglin-Antikörper in einem potentiellen Einsatz zur anti-vaskulären Therapie war nicht die Neutralisierung des Proteins, sondern die effektive Lyse der Endothelzellen durch Antikörpervermittelte Effektormechanismen. Dabei sollte die Verbesserung der ADCC-Aktivität durch gentechnische Modifikation des Fc-Teils erfolgen. Kloniert man die variablen Regionen eines  $Ig\mu$ -Antikörpers in ein  $Ig\gamma$ -Format, tritt in der Regel ein erheblicher Affinitätsverlust auf. Aus diesen Gründen wurde der Fokus für die weiteren Untersuchungen zunächst auf die zwölf generierten  $\alpha$ Endoglin-Antikörper der  $mIg\gamma$ -Isotypen gelegt.

Allerdings wäre die Evaluation der in dieser Arbeit generierten  $\alpha$ Endoglin-Antikörper des  $mIg\mu$ -Isotyps ebenfalls interessant. Ein möglicher Vorteil dieser Antikörperklasse beim potentiellen Einsatz zur anti-vaskulären Tumorthherapie wäre hierbei der deutliche Größenunterschied. Das als Pentamer vorliegende Molekül hätte vermutlich aufgrund einer verminderten Penetration in umliegendes Gewebe eine weitaus längere Halbwertszeit im Serum des Patienten, im Vergleich zu einem konventionellen therapeutischen Antikörperformat des  $Ig\gamma$ -Typs. Diese verlängerte Zirkulation im Blut könnte demnach eine gesteigerte Effizienz der Therapie bedeuten. Im Falle einer anti-vaskulären Tumorthherapie stellt die verminderte Penetrationsfähigkeit eines solchen Moleküls keinen Nachteil dar. Zusätzlich würden sich die Antikörper im Wirkmechanismus unterscheiden. Antikörpermoleküle des  $Ig\mu$ -Isotyps gelten potentiell als besonders effizient bei der Aktivierung des Komplements (CDC), welche zur Zerstörung der Tumor-versorgenden Blutgefäße führen könnten. Eine solche Komplement-vermittelte Zytotoxizität wurde für die chimärisierten Antikörper des  $mIg\gamma$ -Isotyps  $\chi$ K-ro8,  $\chi$ K-ro10,  $\chi$ K-ro22, sowie  $\chi$ K-ro23, auch in Kombination mit TRC105, nicht nachgewiesen. Die Wirksamkeit chimärisierter  $Ig\mu$ -Antikörper gegen vaskuläre Antigene ist deshalb zum gegenwärtigen

gen Zeitpunkt spekulativ.

Die Varianz der zwölf verbleibenden Moleküle des mIg $\gamma$ -Isotyps konnte nach deren Aufreinigung mittels Affinitätschromatographie weiter bestätigt werden. Es zeigten sich deutliche Unterschiede in den Affinitäten, wie auch in den maximalen Fluoreszenzindices, dass heißt der Anzahl maximal gebundener Antikörpermoleküle. Dies lässt sich einerseits durch die unterschiedlich starke Bindung des verwendeten polyklonalen Sekundärreagenz an die vertretenen Isotypen mIg $\gamma$ 1, mIg $\gamma$ 2a und mIg $\gamma$ 2b erklären. Jedoch zeigten auch  $\alpha$ Endoglin-Antikörper des selben Isotyps unterschiedliche maximale Fluoreszenzindices. Diese durchfluszytometrischen Resultate bestätigten demnach weiterhin die Vermutung der verschiedenen Epitope und somit variablen Tumorendothelspezifitäten der zwölf neuen  $\alpha$ Endoglin-Antikörper. Für vier der generierten Klone mK-ro8, mK-ro10, mK-ro22 und mK-ro23 wurden Kreuzblockierungsexperimente durchgeführt. Anhand dieser Untersuchungen wurde deutlich, dass die beiden Klone mK-ro8 und mK-ro23, welche ähnliche maximale Fluoreszenzindices aufweisen, überlappende Epitope erkennen. Für die anderen Antikörper konnte die Bindung an unabhängige Epitope bestätigt werden.

Die weitere Charakterisierung der Mausantikörper erfolgte im Wesentlichen unter Berücksichtigung der im Folgenden diskutierten Therapie-relevanten Parameter.

### 4.1.3 Spezifität für das Tumorendothel

Ein besonders kritischer Parameter ist die bekannte Expression von Endoglin auf hämatopoetischen Vorläuferzellen. Um Nebenwirkungen durch eine Beeinträchtigung der Hämatopoese abzuschätzen, wurde besonderes Augenmerk auf die Bindung der generierten  $\alpha$ Endoglin-Antikörper an CD34<sup>+</sup>CD45<sup>dim</sup>-Vorläuferzellen des Knochenmarks gelegt. Die beiden Antikörper mK-ro8 und mK-ro23 zeichneten sich durch die geringste Bindung an diese Vorläuferzellen und somit die schwächste, zu erwartende Stammzelltoxizität aus. Die Bindung des Moleküls mK-ro19 war ebenfalls schwach, allerdings bedingt durch die geringe Affinität dieses speziellen Antikörpers.

Neben der Bindung hämatopoetischer Stammzellen galt die Tumorendothelspezifität im Vergleich zu normalem Endothel als zweites Hauptauswahlkriterium zur Selektion der generierten Antikörper. Die Tumorendothelspezifität wurde dabei unter Verwendung zweier komplementärer Methoden ausführlich untersucht. Es konnten einerseits semi-quantitative Aussagen bezüglich der Antikörperbindung an Endoglin mittels Immunhistologie (i) getroffen werden. Diese Methode zählt zu einer der wichtigsten Analysen zur Antigencharakterisierung, da Informationen bezüglich Proteinexpression und Antikörperbindung im intakten Zellverband gewonnen werden können. Immunhistologische Färbungen ermöglichen somit eine parallele Beurteilung aller Zellen eines Gewebes im Überblick. Der Nachteil dieser Färbungen liegt allerdings in der semi-quantitativen Auswertbarkeit, da die Intensität der Färbung mittels Durchlichtmikroskopie lediglich subjektiv bewertet werden kann. Zudem ist

die Differenzierung der Expression von membranständigem und potentiell vorhandenem cytoplasmatischem Protein auf Gefrierschnitten nicht möglich. Dies ist deshalb von Bedeutung, da für verschiedene Antigene gezeigt wurde, dass eine cytoplasmatische Expression nicht notwendigerweise mit der Membranexpression korreliert, diese ist aber die für eine potentielle Antikörpertherapie entscheidende Größe. Um sicher zu stellen, dass die Differenzen zwischen benignem und malignem Gewebe ausschließlich durch Antikörperbindung der extrazellulären Domäne des membran gebundenen Endoglin zustande kommen, wurden durchflusszytometrische Analysen (ii) durchgeführt. Diese ermöglichen zusätzlich eine Quantifizierung der Antikörperbindung auf über verschiedene Zellmarker definierten Endothelzellen von primären Zellen der Niere, sowie des Nierenzellkarzinoms.

(i) Die zwölf neuen  $\alpha$ Endoglin-Antikörper wurden mittels Immunhistologie auf Gefrierschnitten der Niere bzw. eines Nierentumors bewertet. Prinzipiell konnte für alle zwölf Antikörper des mIg $\gamma$ -Isotyps ein vaskuläres Färbemuster bestätigt werden. Die Differenzen der Färbeintensitäten beider Schnitte und somit die Tumorendothelspezifität, erschienen für die Klone mK-ro8 und mK-ro23 am größten. Betrachtet man ausschließlich die Färbeintensitäten des gesunden Gewebes, wurde für den Klon mK-ro22 die stärkste Färbung detektiert.

(ii) Mittels Durchflusszytometrie wurden die als CD45<sup>-</sup>CD31<sup>+</sup>CD34<sup>high</sup> definierten Endothelzellen von Einzelzellsuspensionen der primären benignen und malignen Niere näher untersucht. Bei allen getesteten Proben verschiedener Spender konnten deutliche Unterschiede bezüglich der Bindungen aller zwölf  $\alpha$ Endoglin-Antikörper an das Endothel der gesunden Niere bzw. des Nierenzellkarzinoms nachgewiesen werden. Dabei bestätigten diese Daten die immunhistologischen Färbungen bezüglich der Differenzen zwischen Endothelzellen des benignen und malignen Gewebes. Für die vier Antikörper mK-ro2, mK-ro22, mK-ro23, sowie mK-ro8 wurden die größten Differenzen nachgewiesen, dabei erzielte der Klon mK-ro8 die deutlichsten Unterschiede und vor allem die stärkste Bindung auf dem Tumorendothel.

Diese Untersuchungen bezüglich der Antikörperbindung auf hämatopoetischen Stammzellen und Tumorendothelspezifität legten den Fokus der potentiell therapeutischen Kandidaten daher hauptsächlich auf die beiden  $\alpha$ Endoglin-Antikörper mK-ro8 und mK-ro23.

#### 4.1.4 Sonstige den Therapieerfolg-beeinflussende Parameter

Neben der Tumorendothelspezifität wurden in dieser Arbeit eine Reihe weiterer Therapie-relevanter Parameter untersucht und für die Auswahl besonders geeigneter  $\alpha$ Endoglin-Antikörper verwendet.

Das Membranprotein Endoglin ist ein akzessorischer Co-Rezeptor des TGF $\beta$ -Rezeptorkomplexes und ist in der Lage die intrazelluläre Signalkaskade nach Ligan denbindung zu modulieren. Dabei ist bekannt, dass die Bindung von TGF- $\beta$ 1 in Anwesenheit von Endoglin die Signalweiterleitung über die intrazelluläre Kaskade

des ALK1-Smad1/5/8-Weges begünstigt. Dies führt zur verstärkten Transkription pro-angiogenetischer Ziel-Gene in den Endothelzellen und initiiert somit deren Proliferation. Im Gegensatz dazu, erfolgt die Signaltransduktion nach Bindung von TGF- $\beta$ 1 in Abwesenheit von Endoglin über den ALK5-Smad2/3-Signalweg und begünstigt den anti-mitogenen Stimuli und somit das Ruhen der Endothelzellen [Koleva et al., 2006].

Es galt daher zu klären, ob die Bindung der Antikörper an Endoglin die TGF- $\beta$ 1-Bindungsstelle am TGF- $\beta$ -Rezeptorkomplex blockieren können. Solch eine Verhinderung der Liganden-Rezeptor-Interaktion würde die intrazelluläre Weiterleitung des pro-angiogenetischen Signals unterdrücken. Diese Blockierung könnte ohne weitere Effektorfunktionen der  $\alpha$ Endoglin-Antikörper zu einer anti-angiogenetischen Wirkung führen.

Allerdings konnte keiner der 16 getesteten  $\alpha$ Endoglin-Antikörper die Bindung des rekombinanten Liganden TGF- $\beta$ 1 behindern. Dies lässt vermuten, dass die räumliche Nähe zwischen der Antikörperbindungsstelle von Endoglin und der Ligandenbindungsstelle des TGF- $\beta$ -Rezeptorkomplexes für eine mögliche Blockade nicht gegeben ist. Es wird vermutet, dass die Liganden der TGF- $\beta$ -Superfamilie hauptsächlich mit der hoch konservierten *ZP-C*-Domäne von Endoglin interagieren [Lin et al., 2011]. Die hohe Sequenzhomologie zwischen Maus und Mensch in diesem Bereich dürfte die Produktion monoklonaler Antikörper, die mit der TGF- $\beta$ 1-Bindestelle interferieren könnten, schwierig machen.

Eine potentielle Kreuzreaktivität der generierten Antikörper mit Maus-Endoglin konnte ausgeschlossen werden, die Epitope der in Mäusen generierten  $\alpha$ Endoglin-Antikörper würde man daher, aufgrund der in diesem Bereich vorhandenen, geringsten Homologie zwischen Mensch und Maus, in der *orphan*-Domäne erwarten.

Ein weiterer grundsätzlich Therapie-relevanter Parameter ist das Vorhandensein von löslichem Antigen im Serum. Für Endoglin ist beschrieben, dass die Konzentration des zirkulierenden Endoglins in Tumorpatienten stark ansteigt [Takahashi et al., 2001b]. Dessen Bindung könnte zur Neutralisierung des applizierten Antikörpers führen und somit die therapeutische Wirkung je nach Konzentration minimieren bzw. verhindern. Da alle getesteten Antikörper an die lösliche Endoglinform binden konnten, scheint sich die Konformation des Proteins nach Abscherung von der Zelloberfläche nicht grundsätzlich zu ändern. Die Arbeitsgruppe um Ben K. Seon bestimmte die Serumkonzentrationen von löslichem Endoglin in verschiedenen Krebspatienten, dabei wurden die höchsten Werte für Patienten mit metastasierendem Kolorektalkarzinom bestimmt. Die Serumkonzentration des löslichen Endoglins lag dabei bei Krebspatienten im Mittel bei  $51,4 \pm 59,7$  ng/mL [Takahashi et al., 2001b]. Allerdings wurden deutliche Unterschiede in Patienten mit metastasierender Krebserkrankung, sowie chemotherapeutischer Behandlung nachgewiesen. Innerhalb einer Kohorte wurden deutliche Schwankungen für die Konzentrationen der zirkulierenden Endoglinvariante bestimmt (maximale Werte von über 200 ng/mL). Die durch übliche Antikörperdosierungen erreichbaren Serumkonzentrationen liegen im Bereich von 50  $\mu$ g/mL und überschreiten diese Werte damit deutlich. Eine wesentliche Beeinträchtigung der Antikörper-Aktivität ist demnach nicht zu erwarten. Dennoch erscheint eine individuelle Bestimmung

der Serumkonzentration des löslichen Endoglin vor Therapiebeginn ratsam.

Mittels weiterer Analysen wurde eine mögliche Antigen-Modulation, also die Internalisierung bzw. Abscherung von Endoglin nach Antikörperbindung, untersucht. Auch dieser Effekt könnte eine potentielle Therapie stark beeinträchtigen. Daher wurde die relative Oberflächenexpression von Endoglin nach einer 26-stündigen Inkubationszeit mit den jeweiligen Antikörpern bestimmt. Lediglich für die beiden Klone mK-ro8 und SN6 wurden Expressionseinbußen auf der Prä-B-ALL-Zelllinie nachgewiesen, wobei es sich mit 35% (mK-ro8) und 45%-Reduktion (SN6) um keinen vollständigen Antigenverlust handelte. Für die restlichen getesteten Antikörper blieb die Endoglinexpression stabil.

Die Arbeitsgruppe um Martin J. Glennie zeigte für verschiedene  $\alpha$ CD20-Antikörper unterschiedliche Antigen-Modulationen. Eine mögliche Internalisierung oder Abscherung des Antigens, durch die Antikörperbiindung scheint daher Epitop- und nicht Antigen-abhängig. Die über einen längeren Behandlungszeitraum auftretenden Resistenzen des therapeutischen  $\alpha$ CD20-Antikörpers Rituximab lassen sich möglicherweise, zumindest zum Teil, durch die Internalisierung des Antigen-Antikörper-Komplexes erklären [Beers et al., 2010]. Für das Antigen Endoglin konnte im Rahmen dieser Arbeit ebenfalls eine Epitop- und nicht Antigen-spezifische Modulation gezeigt werden. Aufgrund der nachgewiesenen, starken Expression von Endoglin auf aktivierten, proliferierenden Endothelzellen der Tumor-versorgenden Gefäße, ist bei dem maximal-bestimmten Antigenverlust von 45% kein signifikanter Einfluss auf eine potentielle Therapie zu erwarten.

**Selektion von vier  $\alpha$ Endoglin-Antikörpern zur Chimärisierung** Ausgehend von den zwölf generierten  $\alpha$ Endoglin-Antikörpern des mIg $\gamma$ -Isotyps, erfolgte, unter Berücksichtigung der oben diskutierten, vergleichenden Ergebnisse die Selektion von vier Antikörpern zur Chimärisierung. Dabei fiel die Wahl auf die Klone mK-ro8 und mKro23. Diese beiden Antikörper zeigten in den Untersuchungen des Hauptauswahlkriteriums bezüglich Tumorendothelspezifität die besten Ergebnisse. So konnten einerseits für beide Moleküle relativ geringe Mengen gebundener Antikörper auf gesunden hämatopoetischen Vorläuferzellen des Knochenmarks gefunden werden, andererseits wurden die höchsten Tumorendothelspezifitäten mittels Immunhistologie und Durchflusszytometrie nachgewiesen. Neben diesen beiden Kandidaten wurde der Antikörper mK-ro22 aufgrund deutlich höherer Affinität ausgewählt. Der vierte Klon mK-ro10 wurde als repräsentativer Vertreter der übrigen Antikörper ebenfalls chimärisiert.

### 4.1.5 Chimärisierung und SDIEM-Modifikation ausgewählter $\alpha$ Endoglin-Antikörper

Grundsätzlich gewährleistet eine Chimärisierung die optimale Interaktion zwischen dem therapeutischen Antikörper und dem Immunsystem des Patienten. Weiterhin kann die Immunogenität des Moleküls und somit die Bildung von HAMAs (*engl. human-anti-mouse antibodies*) verringert werden. Somit ist die Chimärisierung der

selektionierten Maus-Antikörper als unumgängliche Voraussetzung für einen potentiellen Einsatz in der Klinik anzusehen.

Zur weiteren Steigerung der Wirksamkeit dieser Antikörper wurden neben den vier chimärisierten Varianten  $\chi$ K-ro8,  $\chi$ K-ro10,  $\chi$ K-ro22 und  $\chi$ K-ro23 zusätzlich mittels SDIEM-Modifikation Fc-optimierte Antikörper generiert:  $\chi$ K-ro8SDIEM,  $\chi$ K-ro10SDIEM,  $\chi$ K-ro22SDIEM und  $\chi$ K-ro23SDIEM.

**Klonierung und Optimierung des TRC105** TRC105 ist ein chimärer  $\alpha$ Endoglin-Antikörper des Isotyps Ig $\gamma$ 1. Er wird zur Zeit durch den Pharmakonzern TRACON Pharmaceuticals in unterschiedlichen klinischen Studien zur Behandlung solider Tumoren getestet. Der parentale Antikörper des TRC105, der Mausklon SN6j, zeigte vielversprechende präklinische Daten bezüglich anti-angiogenetischer Wirksamkeit. Die für TRC105 kodierenden Sequenzen wurden im Rahmen dieser Arbeit synthetisiert und kloniert. Dieser Referenzantikörper, sowie eine SDIEM-optimierte Version des TRC105,  $\chi$ SN6jSDIEM, konnten somit bezüglich aller kritischen Parameter mit den neuen, optimierten  $\alpha$ Endoglin-Antikörpern verglichen werden.

Alle zehn Moleküle wurden anschließend mittels SDS-PAGE und analytischer Gelfiltration auf Reinheit und Homogenität geprüft. Dabei zeigten die beiden Antikörper  $\chi$ K-ro8 und  $\chi$ K-ro8SDIEM unerwartete Elutionsprofile. Das Migrationsverhalten beider Moleküle entsprach dem Laufverhalten eines deutlich kleineren Proteins. Mittels SDS-PAGE konnten jedoch die erwarteten Proteinbanden und somit die Integrität der Moleküle nachgewiesen werden. Ein eventueller Verlust der leichten Kette, sowie eine fehlerhafte, unvollständige Dimerisierung konnte ausgeschlossen werden. Da das aberrante Laufverhalten für beide Varianten des Moleküls K-ro8 gezeigt wurde, scheint diese Eigenschaft Klon-spezifisch und aufgrund einer deutlich kompakteren Faltung der variablen Bereiche entstanden zu sein.

Um sicherzustellen, dass die durchflusszytometrischen Ergebnisse der Mausantikörper bezüglich Affinität und maximaler Fluoreszenzintensität nicht aufgrund unterschiedlicher Detektion der Isotypen durch das verwendete polyklonale Sekundärreagenz zustande gekommen sind, wurde diese Bindungsanalytik mit den chimären und optimierten Varianten wiederholt. Dabei konnten die Titrationskurven der entsprechenden Mausantikörper bestätigt werden. Diese Resultate verifizieren die klonierten variablen Domänen. Der Referenzantikörper SN6j verhielt sich in diesen Experimenten ähnlich dem Klon K-ro10.

#### 4.1.6 Optimierte Effektorfunktionen der $\alpha$ Endoglin-Antikörper durch SDIEM-Modifikation

Ein wesentliches Ziel dieser Arbeit war die Verstärkung der zytotoxischen Effektorfunktion von  $\alpha$ Endoglin-Antikörpern zur effektiveren anti-vaskulären Tumorthherapie. Um diesen verbesserten, angestrebten Wirkmechanismus realisieren zu können, wurden die ausgewählten  $\alpha$ Endoglin-Antikörper zusätzlich mit der SDIEM-Modifikation versehen. Die Firma Xencor konnte im Jahr 2006 zeigen,

dass der Austausch zweier Aminosäuren im Fc-Teil die Affinität zu humanen Fc $\gamma$ -Rezeptoren deutlich erhöht. Über diesen Mechanismus kann eine solche SDIEM-Optimierung zu einer drastischen Verstärkung der ADCC-Aktivität führen [Lazar et al., 2006]. Erfahrungsgemäß ist diese Modifikation des Fc-Teils jedoch nicht für jeden Antikörper wirksam. Dr. Ludger Grosse-Hovest und Dr. Elwira Pyz zeigten für zwei Antikörper, welche gegen die beiden Zielantigene CD171 und Cspg4 (NG2) gerichtet sind, unveränderte ADCC-Aktivitäten der SDIEM-optimierten Versionen (nicht veröffentlichte Daten).

Die potentiell gesteigerte ADCC-Aktivität der optimierten  $\alpha$ Endoglin-Antikörper wurde im Rahmen dieser Arbeit mittels des  $^{51}\text{Cr}$ -Freisetzungstestes bestimmt. Für alle fünf Klone K-ro8, K-ro10, K-ro22, K-ro23 und SN6j wurde eine zwischen 100- und 1000-fach verstärkte spezifische Tumorzelllyse der SDIEM-modifizierten Antikörper im Vergleich zu den chimären Varianten nachgewiesen. Im direkten Vergleich der fünf SDIEM-modifizierten  $\alpha$ Endoglin-Antikörper untereinander, wurden ähnliche Lyseraten erzielt. Der  $\chi$ K-ro8SDIEM erwies sich dennoch als potentester Klon. Dieser Antikörper erzielte bereits bei der niedrigen Konzentration von 50 ng/mL die saturierte spezifische Tumorzelllyse. Vergleicht man die vier neuen optimierten  $\alpha$ Endoglin-Antikörper mit dem in klinischen Studien befindlichen TRC105 bezüglich ihrer ADCC-Aktivität, so lässt sich eine drastisch verbesserte Aktivität der SDIEM-modifizierten Antikörper feststellen.

Neben den Analysen der Endoglin-positiven Prä-B-ALL-Tumorzelllinie, wurden die Antikörper zusätzlich anhand der vermittelten Zelllyse von primärem Endothel aus der Nabelschnurvene (*engl. human umbilical vein endothelial cells*, HUVEC) bewertet. Insgesamt erreichten alle fünf  $\alpha$ Endoglin-Antikörper mit optimiertem Fc-Teil bei einer Konzentration von 0,5  $\mu\text{g/mL}$  eine spezifische Lyse der HUVEC zwischen 55% und 65%, wobei auch unter diesen Bedingungen der  $\chi$ K-ro8SDIEM, wenn auch knapp, die höchste spezifische Endothelzelllyse erreichte.

Ein optimierter  $\alpha$ Endoglin-Antikörper, wie  $\chi$ K-ro8SDIEM, könnte potentiell im Vergleich zum chimären TRC105 eine verbesserte Aktivität erreichen. Dadurch könnte ein neues therapeutisch-wirksames Behandlungsfenster mit verbesserter Verträglichkeit entstehen.

Bis heute ist kein Fc-optimierter Antikörper für die Tumorthera- pie zugelassenen. Allerdings befinden sich einige SDIE-optimierten An- tikörper (gegen CD19, CD20 und CD30) in früher klinischer Erprobung (www.xencor.com). Bisher wurde diese Optimierung allerdings noch nicht für Antikörper zur anti-angiogenetischen Tumorthera- pie getestet.

#### 4.1.7 Tumorendothelspezifität chimärer $\alpha$ Endoglin-Anti- körper im Vergleich mit TRC105

Um die Untersuchungen bezüglich der Tumorendothelspezifität weiter zu vertiefen und v.a. um die neuen  $\alpha$ Endoglin-Antikörper mit dem bereits in klinischer Erpro- bung befindlichen TRC105 zu vergleichen, wurden die Antikörper wiederholt unter

Verwendung der beiden komplementären Methoden analysiert.

Die immunhistologischen Färbungen erfolgten diesmal auf *human frozen tissue arrays*, welche die parallele Analyse einer breiten Auswahl an humanen Gewebetypen ermöglichte. Grundsätzlich konnte auf allen 14 getesteten Gewebetypen ein vaskuläres Färbemuster durch die fünf  $\alpha$ Endoglin-Antikörper nachgewiesen werden. Zusätzlich hierzu zeigten die Klone eine verstärkte Bindung auf den blutversorgenden Gefäßen der Tumoren, im Vergleich zu dem entsprechenden normalen Endothelien. Allerdings konnten durch diese semi-quantitative Methode nur geringfügige Differenzen der Antikörperbindung bezüglich der Spezifität ermittelt werden. Jedoch spiegelte sich das Verhältnis der maximalen Intensitäten zwischen den Antikörpern untereinander, welches durchflusszytometrisch auf einer Endoglin-exprimierenden Zelllinie bestimmt wurde, auf den immunhistologisch gefärbten Gefrierschnitten wieder. Auch bei diesen Untersuchungen ergaben sich demnach die schwächsten Färbeintensitäten für den  $\chi$ K-ro23SDIEM und die stärkste Färbung für den  $\chi$ K-ro22SDIEM.

Zur Quantifizierung der Tumorendothelspezifität wurden die fünf  $\alpha$ Endoglin-Antikörper auf Einzelzellsuspensionen der Niere, sowie des entsprechenden Nierenzellkarzinoms durchflusszytometrisch untersucht. Zur besseren Vergleichbarkeit untereinander, also Isotyp-unabhängig, wurden auch in diesen Experimenten die optimierten  $\alpha$ Endoglin-Antikörper verwendet. Insgesamt wurden sieben Gewebepärchen aus benignem und malignem Primärmaterial untersucht. Zwei der sieben Proben des normalen Nierengewebes konnten jedoch aufgrund einer zu starken Vaskularisierung nicht ausgewertet werden. Dies lässt sich anhand der Größe des Tumors erklären, da es sich bei diesen beiden Proben um besonders große Geschwülste handelte. Da das zu diesen Zwecken analysierte benigne Nierengewebe während der Resektion des Tumors aus umgebendem Gewebe gewonnen wird, ist anzunehmen, dass das vermeintlich normale Gewebe in diesen beiden Fällen aufgrund der Tumornähe unter Einfluss der malignen Zellen stand und somit bereits verstärkt vaskularisiert war.

Die Bewertung der durchflusszytometrischen Analysen aller fünf Nierenzellproben erfolgte anhand der aus dem Quotient der spezifischen Fluoreszenzindices der malignen und benignen Nierenzellen berechneten Tumorendothelspezifität. Diese war für den  $\alpha$ Endoglin-Antikörper  $\chi$ K-ro8SDIEM bis zu vierfach höher. Für die Klone  $\chi$ K-ro10SDIEM,  $\chi$ K-ro22SDIEM,  $\chi$ K-ro23SDIEM und  $\chi$ SN6jSDIEM (entspricht der SDIEM-optimierten Variante des TRC105) wurden nur minimale Unterschiede untereinander gemessen. Da erste klinische Ergebnisse bezüglich des TRC105 keine überdurchschnittlichen Unverträglichkeiten gegenüber dem anti-angiogenetisch wirkenden Antikörper ergaben, können große Hoffnungen in den nachweislich Tumorspezifischeren  $\chi$ K-ro8SDIEM gelegt werden. In Verdrängungsexperimenten wurde weiterhin nachgewiesen, dass der in klinischer Phase befindliche Antikörper TRC105 kein überlappendes Epitop des Membranproteins Endoglin mit den vier generierten Klonen detektiert. Dies untermauert die deutlichen Differenzen der beiden Antikörper TRC105 und  $\chi$ K-ro8SDIEM bezüglich der Tumorendothelspezifität auf primären Nierenzellen. Das gewünschte Ziel dieser Arbeit, die Generierung eines  $\alpha$ Endoglin-Antikörpers mit verbesserter Spezifität für das Gefäßsystem des Tumors,

konnte somit erreicht werden. Der  $\chi$ K-ro8SDIEM scheint, im Vergleich zu den übrigen getesteten  $\alpha$ Endoglin-Antikörpern, spezifisch an ein Epitop des Tumorendothel-assoziierten aberranten Endoglins stark proliferierender Endothelzellen zu binden.

Allerdings konnte kein Tumorendothel-assoziiertes Antikörper, welcher nicht die Blutgefäße des gesunden Gewebes erkennt, generiert werden. Da das den Tumor-versorgende Gefäßsystem aus dem gesunden Gewebe entsteht und per Definition nicht maligne ist, war dies nicht zu erwarten.

#### 4.1.8 Schlussfolgerung, Indikation, Ausblick

Bereits im Anschluss an die umfangreiche Charakterisierung der Mausantikörper, standen die beiden generierten  $\alpha$ Endoglin-Antikörperklone mK-ro8 und mK-ro23 als vielversprechendste Kandidaten fest. Im Zuge der Chimärisierung und Optimierung der Moleküle kristallisierte sich  $\chi$ K-ro8SDIEM, aufgrund gesteigerter ADCC-Aktivität und höchster Tumorendothelspezifität, als potentiell neues Therapeutikum zur anti-angiogenetischen Tumorthherapie heraus. Die initiale Hypothese dieser Arbeit, dass neue  $\alpha$ Endoglin-Antikörper generiert werden können, die eine erhöhte Spezifität für Tumorendothel aufweisen, konnte somit bestätigt werden.

Mit diesem in Tumorendothelspezifität und ADCC-Aktivität optimierten Molekül könnte die verbesserte, direkt gegen das Tumorendothel gerichtete anti-vaskuläre Therapiestrategie durch aktive Zerstörung der Tumor-versorgenden Blutgefäße realisiert werden. Der  $\alpha$ Endoglin-Antikörper  $\chi$ K-ro8SDIEM könnte dabei durch Öffnung der Endothelzellschicht einen rapiden Zusammenbruch der Tumor-versorgung verursachen. Ein weiterer anti-Tumor-Effekt könnte durch den potentiell begünstigten Einstrom von Immunzellen in das umliegende Tumorgewebe erreicht werden. Die daraus resultierende spezifische Immunantwort des Körpers gegen die entarteten Zellen selbst könnte somit zur direkten Zerstörung des Tumors führen. Die Zugänglichkeit des Tumors für körpereigene Effektorzellen gilt als entscheidende Limitation bei den meisten immuntherapeutischen Ansätzen.

Ein weiterer Vorteil dieser direkten Zerstörung der Tumor-versorgenden Gefäße gegenüber der Neutralisierung des pro-angiogenetischen Wachstumsfaktors, könnte die Vermeidung auftretender Therapieresistenzen darstellen, welche über die Jahre mehrfach beschrieben wurden. Es ist bekannt, dass die Behandlung des  $\alpha$ VEGF-Antikörpers Bevacizumab über einen längeren Zeitraum zur Normalisierung der Tumor-versorgenden Gefäße führen kann [Jain, 2001]. Über die Neutralisierung des pro-angiogenetischen Wachstumsfaktors, welcher während der Tumorangio-genese stark überexprimiert wird, kann das natürliche Gleichgewicht zwischen pro- und anti-angiogenetischen Faktoren wieder hergestellt werden. Dies führt zur funktionalen und strukturellen Veränderung in Richtung gesunder Blutgefäße und somit jedoch zu Resistenz gegenüber dieser Art von anti-vaskulärer Behandlung.

Als mögliche Indikation des neuen, potenten anti-vaskulär wirkenden  $\alpha$ Endoglin-Antikörpers  $\chi$ K-ro8SDIEM gelten generell solide Tumoren. Allerdings könnte eine anti-angiogenetische Tumorthherapie, welche die Öffnung des Endothels verursacht, ein potentiell höheres Metastaserisiko darstellen. Dieser Problematik steht allerdings die Tatsache gegenüber, dass nur ein Bruchteil der Tumorzellen in

der Lage ist, nach Verbreitung im Körper zur Ausbildung von Metastasen zu führen (Hypothese der Tumorstammzellen [Bonnet und Dick, 1997]). Ben K. Seon konnte dementsprechend mit seiner Arbeitsgruppe eine Unterdrückung der Metastasierung durch drei unterschiedliche  $\alpha$ Endoglin-Antikörper im Mausmodell zeigen [Uneda et al., 2009].

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass bei Pankreaskarzinomen nicht nur das versorgende Endothel, sondern zusätzlich die malignen Zellen selbst Endoglin verstärkt exprimieren. Diese Feststellung beruht auf einer immunhistologischen Analyse von sechs malignen Pankreasgewebeschnitten unterschiedlicher Spender, sowie eines Normalgewebes im Vergleich, wobei vier Gewebe positiv waren. Es konnte dabei gezeigt werden, dass über 60% aller analysierten Pankreastumoren zusätzlich Endoglin auf den Tumorzellen exprimieren. In einem solchen Fall könnte der Antikörper neben der Zerstörung der versorgenden Blutgefäße, sowie der potentiellen Begünstigung der Immunzell-Einwanderung, die Tumorzellen markieren und deren Lyse induzieren. Des Weiteren könnte ein potentielles Metastaserisiko durch diesen zusätzlichen Wirkmechanismus deutlich gesenkt werden. Das Pankreaskarzinom gilt als besonders schwer therapierbar. Im Jahr 2008 erkrankten ca. 15.000 Menschen in Deutschland an Bauchspeicheldrüsenkrebs, wobei die 5-Jahres-Überlebensrate bei nur 8% lag (Zentrum für Krebsregisterdaten, Robert Koch Institut). Neue Therapieansätze werden deshalb dringend benötigt. Für diesen Endoglin-positiven Tumortyp erscheint eine potentielle Behandlung mit dem neuen Therapeutikum  $\chi$ K-ro8SDIEM daher umso attraktiver.

Der parallele Angriff auf die Tumorzellen selbst wäre auch aus einem anderen Grund wünschenswert. Ein potentieller anti-vaskulärer Therapieansatz weist theoretische Limitationen auf. Der maligne Tumor kann maximal auf ein Volumen von 1-2 mm<sup>3</sup> reduziert werden. In dieser Größe ist ein Tumor ohne Blutversorgung lebensfähig und somit resistent gegenüber anti-angiogenetischen Ansätzen. Dieser weitere Faktor würde eine Kombination aus einem Tumorzell-spezifischen Reagenz mit dem  $\chi$ K-ro8SDIEM ebenfalls befürworten. Eine kombinatorische Behandlung solider Tumoren, welche selbst kein Endoglin exprimieren, wäre beispielsweise mit einer individualisierten Peptid-Vakzinierung oder aber der parallelen Applikation eines zweiten Tumor-spezifischen Antikörpers vorstellbar.

Es wäre jedoch auch möglich, dem Patienten eine Kombination aus zwei anti-angiogenetischen Medikamenten zu verabreichen. Es ist beschrieben, dass die Expression von Endoglin auf den Endothelzellen der Tumor-versorgenden Gefäße aufgrund der während einer Behandlung mit Bevacizumab auftretenden Hypoxie deutlich erhöht ist [Bockhorn et al., 2003]. Diese Tatsache, sowie die kürzlich beobachtete positive Wirkung des  $\alpha$ VEGF-Antikörpers auf die durch Mutation des Endoglin-Gens ausgelösten Symptome bei HHT-Patienten [Brinkerhoff et al., 2012; Lupu et al., 2013], lässt eine kombinierte Therapie sinnvoll erscheinen.

Im Rahmen einer anti-angiogenetischen Therapie stellen schwerwiegende Hämorrhagien potentielle Nebenwirkungen dar. Vergleicht man die Unverträglichkeiten der mit TRC105 behandelten Probanden einer kürzlich publizierten klinischen

Phase I-Studie, wurden keine überdurchschnittlich heftigen Reaktionen beschrieben [Rosen et al., 2012]. Die beiden Hauptnebenwirkungen (Grad 3 oder 4) waren auftretende Sofortreaktionen direkt nach der Infusion wie Rötung und Bluthochdruck, sowie Anämie. Ersteres konnte über eine medikamentöse Vorbehandlung mit Dexamethason deutlich verbessert werden, Zweiteres lässt sich aufgrund der Endoglin-Expression auf Proerythroblasten [Rokhlin et al., 1995] erklären und konnte ebenfalls gut behandelt werden.

Eine mögliche weitere Optimierung des  $\chi$ K-ro8SDIEM wäre die vollständige Humanisierung des Antikörpers. Durch eine mehrfache Applikation des chimären Moleküls könnte über einen längeren Behandlungszeitraum eine Immunabwehr gegenüber dem Therapeutikum induziert werden. Der Austausch der entsprechenden Mausequenzen könnte die hierbei entstehenden HAMAs (*engl.: human-anti mouse antibodies*) bzw. HACAs (*engl.: human-anti chimeric antibodies*), sowie die damit verbundene, potentiell auftretende Neutralisierung des applizierten Antikörpers verhindern. Die Bildung sogenannter anti-Idiotyp-Antikörper, welche die Wirksamkeit senken können, ist allerdings auch durch eine Humanisierung nicht zu verhindern.

Zusammengefasst erscheinen die Voraussetzungen für eine klinische Erprobung von  $\chi$ K-ro8SDIEM gegeben. Die Anwendungen des generierten  $\alpha$ Endoglin-Antikörpers in Pankreaskarzinom-Patienten im Rahmen von individuellen Heilversuchen, sowie in klinischer Phase I-Studie sind geplant.

## 4.2 W3C4E11 als anti-vaskulärer Antikörper

Die Suche nach weiteren anti-vaskulären Zielantigenen ergab für den bereits als  $\alpha$ FZD9-Antikörper beschriebenen W3C4E11 [Battula et al., 2007] unerwartete Ergebnisse. Das durch Dr. H.-J. Bühring generierte und charakterisierte Molekül zeigte ein deutliches gefäß-typisches Färbemuster auf den meisten malignen Gefrierschnitten der 14 getesteten Gewebetypen, wobei das Normalgewebe ausschließlich von Prostata, Uterus und Ovar stärker immunhistologisch angefärbt wurde. Eine Gegenüberstellung des W3C4E11 mit dem in dieser Arbeit mittels Hybridom-techni generierten Antikörpers K-zd1, ergab jedoch divergente Resultate. Die gefäß-typische Färbung des W3C4E11 konnte für K-zd1 nicht bestätigt werden. Der neu generierte Klon scheint ein anderes Zielantigen zu binden als W3C4E11. Um dieser Vermutung weiter nachzugehen, wurden die beiden Moleküle auf insgesamt 13 verschiedenen Zelllinien durchflusszytometrisch analysiert. Dazu zählten drei FZD9-transfizierte Zelllinien (Maus, Hamster und Mensch), entsprechende untransfizierte Kontrollen, sowie sieben mit den stark homologen FZD-Proteinen transfizierten Zellen. W3C4E11 führte auf allen getesteten Zelllinien zu positiven Signalen. Besonders starke Bindungen wurden auf der WERI-Rb1-Zelllinie, sowie auf FZD9<sup>+</sup>-Sp2/0-Ag14 und FZD9<sup>+</sup>-HEK 293 (nicht jedoch auf FZD9<sup>+</sup>-CHO) gefunden. Des Weiteren wurden deutliche Fluoreszenzindices auf den mit homologen FZD-Proteinen transfizierten Zelllinien detektiert. Der Antikörper K-zd1 zeigte hingegen ein relativ stringentes Profil. Es wurden starke Signale auf allen drei getesteten  $\alpha$ FZD9-Transfektanten gemessen. Lediglich ein schwaches Signal wurde auf den mit den hoch konservierten Vertretern der FZD-Familie transfizierten Zellen bestimmt. Diese Ergebnisse bestätigen somit die Spezifität des Antikörpers K-zd1 für das Antigen FZD9, jedoch mit einer schwachen Kreuzreaktivität für die sieben getesteten, hoch homologen FZD-Proteine. Interessanterweise konnte jedoch auf der zur Herstellung des W3C4E11 verwendeten Zelllinie WERI-Rb1 nur ein sehr schwaches Bindungssignal für K-zd1 detektiert werden. Dieses Resultat bestätigt die Annahme der unterschiedlichen Zielantigene beider Antikörper. FZD9 erscheint somit als neues anti-vaskuläres Zielantigen zur potentiellen anti-Tumorthherapie nicht geeignet.

Was die nunmehr unklare Spezifität des W3C4E11 angeht, konnte die Arbeitsgruppe um Dr. H.-J. Bühring mittels immunhistologischen Färbungen auf Gewebeschnitten von normalem Gehirn, sowie von Astrozytomen eine Bindung nachweisen [Zhang et al., 2006]. Des Weiteren konnte die Bindung des W3C4E11 auf naiven mesenchymalen Stammzellen der Chorionplazenta nachweisen. Der Klon wird daher als potentieller Marker zur Isolierung dieser Zellen diskutiert [Battula et al., 2008]. In dieser Arbeit konnten die variablen Domänen beider Antikörperketten des W3C4E11 erfolgreich identifiziert und anschließend mittels Massenspektrometrie verifiziert werden. Zur besseren Identifizierung des unklaren Zielantigens, konnte W3C4E11 anhand dieser Sequenzen chimärisiert und weiterhin mittels SDIEM-Modifikation optimiert werden.

# Kapitel 5

## Literaturverzeichnis

- Adam, P. J., Clesham, G. J., and Weissberg, P. L. (1998). Expression of endoglin mRNA and protein in human vascular smooth muscle cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 247(1):33–37.
- ALGIRE, G. H., Chakley, H. W., Legallais, F. Y., and Park, H. D. (1945). Vascular reactions of normal and malignant tumors in vivo. i. vascular reactions of mice to wounds and to normal and neoplastic transplants. Report.
- Baeuerle, P. A. and Reinhardt, C. (2009). Bispecific t-cell engaging antibodies for cancer therapy. *Cancer Res.*, 69(12):4941–4944.
- Barbara, N. P., Wrana, J. L., and Letarte, M. (1999). Endoglin is an accessory protein that interacts with the signaling receptor complex of multiple members of the transforming growth factor-beta superfamily. *J. Biol. Chem.*, 274(2):584–594.
- Battula, V. L., Bareiss, P. M., Treml, S., Conrad, S., Albert, I., Hojak, S., Abele, H., Schewe, B., Just, L., Skutella, T., and Buhring, H. J. (2007). Human placenta and bone marrow derived msc cultured in serum-free, b-fgf-containing medium express cell surface frizzled-9 and ssea-4 and give rise to multilineage differentiation 1. *Differentiation*, 75(4):279–291.
- Battula, V. L., Treml, S., Abele, H., and Buhring, H. J. (2008). Prospective isolation and characterization of mesenchymal stem cells from human placenta using a frizzled-9-specific monoclonal antibody 1. *Differentiation*, 76(4):326–336.
- Beers, S. A., French, R. R., Chan, H. T., Lim, S. H., Jarrett, T. C., Vidal, R. M., Wijayaweera, S. S., Dixon, S. V., Kim, H., Cox, K. L., Kerr, J. P., Johnston, D. A., Johnson, P. W., Verbeek, J. S., Glennie, M. J., and Cragg, M. S. (2010). Antigenic modulation limits the efficacy of anti-cd20 antibodies: implications for antibody selection 1. *Blood*, 115(25):5191–5201.
- Bellon, T., Corbi, A., Lastres, P., Cales, C., Cebrian, M., Vera, S., Cheifetz, S., Massague, J., Letarte, M., and Bernabeu, C. (1993). Identification and expression of two forms of the human transforming growth factor-beta-binding protein endoglin with distinct cytoplasmic regions. *Eur. J. Immunol.*, 23(9):2340–2345.

- Bellone, G., Solerio, D., Chiusa, L., Brondino, G., Carbone, A., Prati, A., Scirelli, T., Camandona, M., Palestro, G., and Dei, P. M. (2007). Transforming growth factor-beta binding receptor endoglin (cd105) expression in esophageal cancer and in adjacent nontumorous esophagus as prognostic predictor of recurrence 1. *Ann. Surg. Oncol.*, 14(11):3232–3242.
- Bhargava, P. and Robinson, M. O. (2011). Development of second-generation vegfr tyrosine kinase inhibitors: current status 1. *Curr. Oncol. Rep.*, 13(2):103–111.
- Blanco, F. J., Santibanez, J. F., Guerrero-Esteo, M., Langa, C., Vary, C. P., and Bernabeu, C. (2005). Interaction and functional interplay between endoglin and alk-1, two components of the endothelial transforming growth factor-beta receptor complex. *J. Cell Physiol*, 204(2):574–584.
- Bockhorn, M., Tsuzuki, Y., Xu, L., Frilling, A., Broelsch, C. E., and Fukumura, D. (2003). Differential vascular and transcriptional responses to anti-vascular endothelial growth factor antibody in orthotopic human pancreatic cancer xenografts 1. *Clin. Cancer Res.*, 9(11):4221–4226.
- Bonnet, D. and Dick, J. E. (1997). Human acute myeloid leukemia is organized as a hierarchy that originates from a primitive hematopoietic cell 1. *Nat. Med.*, 3(7):730–737.
- Bourdeau, A., Dumont, D. J., and Letarte, M. (1999). A murine model of hereditary hemorrhagic telangiectasia. *J. Clin. Invest*, 104(10):1343–1351.
- Brinkerhoff, B. T., Choong, N. W., Treisman, J. S., and Poetker, D. M. (2012). Intravenous and topical intranasal bevacizumab (avastin) in hereditary hemorrhagic telangiectasia 1. *Am. J. Otolaryngol.*, 33(3):349–351.
- Buhring, H. J., Muller, C. A., Letarte, M., Gougos, A., Saalmuller, A., van Agthoven, A. J., and Busch, F. W. (1991). Endoglin is expressed on a subpopulation of immature erythroid cells of normal human bone marrow 1. *Leukemia*, 5(10):841–847.
- BURNET, M. (1957). Cancer; a biological approach. i. the processes of control 1. *Br. Med. J.*, 1(5022):779–786.
- Burrows, F. J., Derbyshire, E. J., Tazzari, P. L., Amlot, P., Gazdar, A. F., King, S. W., Letarte, M., Vitetta, E. S., and Thorpe, P. E. (1995). Up-regulation of endoglin on vascular endothelial cells in human solid tumors: implications for diagnosis and therapy. *Clin. Cancer Res.*, 1(12):1623–1634.
- Calabro, L., Fonsatti, E., Bellomo, G., Alonci, A., Colizzi, F., Sigalotti, L., Altomonte, M., Musolino, C., and Maio, M. (2003). Differential levels of soluble endoglin (cd105) in myeloid malignancies 1. *J. Cell Physiol*, 194(2):171–175.
- Charpin, C., Dales, J. P., Garcia, S., Carpentier, S., Djemli, A., Andrac, L., Lavaut, M. N., Allasia, C., and Bonnier, P. (2004). Tumor neoangiogenesis by cd31 and cd105 expression evaluation in breast carcinoma tissue microarrays. *Clin. Cancer Res.*, 10(17):5815–5819.

- Cheifetz, S., Bellon, T., Cales, C., Vera, S., Bernabeu, C., Massague, J., and Letarte, M. (1992). Endoglin is a component of the transforming growth factor-beta receptor system in human endothelial cells. *J. Biol. Chem.*, 267(27):19027–19030.
- Cho, S. K., Bourdeau, A., Letarte, M., and Zuniga-Pflucker, J. C. (2001). Expression and function of cd105 during the onset of hematopoiesis from flk1(+) precursors. *Blood*, 98(13):3635–3642.
- David, L., Mallet, C., Mazerbourg, S., Feige, J. J., and Bailly, S. (2007). Identification of bmp9 and bmp10 as functional activators of the orphan activin receptor-like kinase 1 (alk1) in endothelial cells 1. *Blood*, 109(5):1953–1961.
- Dunn, G. P., Bruce, A. T., Ikeda, H., Old, L. J., and Schreiber, R. D. (2002). Cancer immunoediting: from immunosurveillance to tumor escape 1. *Nat. Immunol.*, 3(11):991–998.
- Dvorak, H. F. (1986). Tumors: wounds that do not heal. similarities between tumor stroma generation and wound healing. *N. Engl. J. Med.*, 315(26):1650–1659.
- EA., B. and S., K. (1890). Uber das zustandekommen der diphtherie- immunität und der tetanus-immunität bei thieren. Report.
- Ehrlich, P. (1900). On immunity with special reference to cell life. *Proc R Soc*, 66:424–428.
- Ehrlich, P. (1909). Ueber den jetzigen stand der karzinomforschung. *Ned Tijdschr Geneeskd*, 5:73–290.
- Falcon, B. L., Barr, S., Gokhale, P. C., Chou, J., Fogarty, J., Depeille, P., Miglarese, M., Epstein, D. M., and McDonald, D. M. (2011). Reduced vegf production, angiogenesis, and vascular regrowth contribute to the antitumor properties of dual mtorc1/mtorc2 inhibitors 1. *Cancer Res.*, 71(5):1573–1583.
- Fernandez-Ruiz, E., St-Jacques, S., Bellon, T., Letarte, M., and Bernabeu, C. (1993). Assignment of the human endoglin gene (end) to 9q34- $\dot{q}$ ter. *Cytogenet. Cell Genet.*, 64(3-4):204–207.
- Ferrara, N. (2010). Pathways mediating vegf-independent tumor angiogenesis 1. *Cytokine Growth Factor Rev.*, 21(1):21–26.
- Folkman, J. (1971). Tumor angiogenesis: therapeutic implications. *N. Engl. J. Med.*, 285(21):1182–1186.
- Folkman, J. (2006). Antiangiogenesis in cancer therapy—endostatin and its mechanisms of action. *Exp. Cell Res.*, 312(5):594–607.
- Folkman, J. (2007). Angiogenesis: an organizing principle for drug discovery? *Nat. Rev. Drug Discov.*, 6(4):273–286.

- Folkman, J. and Hanahan, D. (1991). Switch to the angiogenic phenotype during tumorigenesis. *Princess Takamatsu Symp.*, 22:339–347.
- Folkman, J. and Shing, Y. (1992). Angiogenesis. *J. Biol. Chem.*, 267(16):10931–10934.
- Fonsatti, E., Del, V. L., Altomonte, M., Sigalotti, L., Nicotra, M. R., Coral, S., Natali, P. G., and Maio, M. (2001). Endoglin: An accessory component of the tgf-beta-binding receptor-complex with diagnostic, prognostic, and bioimmunotherapeutic potential in human malignancies. *J. Cell Physiol*, 188(1):1–7.
- Fonsatti, E., Nicolay, H. J., Altomonte, M., Covre, A., and Maio, M. (2010). Targeting cancer vasculature via endoglin/cd105: a novel antibody-based diagnostic and therapeutic strategy in solid tumours. *Cardiovasc. Res.*, 86(1):12–19.
- Furstenberger, G., von, M. R., Lucas, R., Thurlimann, B., Senn, H. J., Hamacher, J., and Boneberg, E. M. (2006). Circulating endothelial cells and angiogenic serum factors during neoadjuvant chemotherapy of primary breast cancer 1. *Br. J. Cancer*, 94(4):524–531.
- Garcia-Pozo, L., Miquilena-Colina, M. E., Lozano-Rodriguez, T., and Garcia-Monzon, C. (2008). [endoglin: structure, biological functions, and role in fibrogenesis] 1. *Rev. Esp. Enferm. Dig.*, 100(6):355–360.
- Ge, A. Z. and Butcher, E. C. (1994). Cloning and expression of a cDNA encoding mouse endoglin, an endothelial cell tgf-beta ligand. *Gene*, 138(1-2):201–206.
- Gerber, H. P. and Ferrara, N. (2005). Pharmacology and pharmacodynamics of bevacizumab as monotherapy or in combination with cytotoxic therapy in pre-clinical studies 1. *Cancer Res.*, 65(3):671–680.
- Geyer, C. R., McCafferty, J., Dubel, S., Bradbury, A. R., and Sidhu, S. S. (2012). Recombinant antibodies and in vitro selection technologies 1. *Methods Mol. Biol.*, 901:11–32.
- Goodman, G. E., Beaumier, P., Hellstrom, I., Fernyhough, B., and Hellstrom, K. E. (1985). Pilot trial of murine monoclonal antibodies in patients with advanced melanoma. *J. Clin. Oncol.*, 3(3):340–352.
- Gougos, A. and Letarte, M. (1988). Identification of a human endothelial cell antigen with monoclonal antibody 44g4 produced against a pre-b leukemic cell line. *J. Immunol.*, 141(6):1925–1933.
- Gougos, A., St, J. S., Greaves, A., O’Connell, P. J., d’Apice, A. J., Buhning, H. J., Bernabeu, C., van Mourik, J. A., and Letarte, M. (1992). Identification of distinct epitopes of endoglin, an rgd-containing glycoprotein of endothelial cells, leukemic cells, and syncytiotrophoblasts. *Int. Immunol.*, 4(1):83–92.
- Guerrero-Esteo, M., Sanchez-Elsner, T., Letamendia, A., and Bernabeu, C. (2002). Extracellular and cytoplasmic domains of endoglin interact with the transforming growth factor-beta receptors i and ii. *J. Biol. Chem.*, 277(32):29197–29209.

- Hanahan, D. and Weinberg, R. A. (2000). The hallmarks of cancer 1. *Cell*, 100(1):57–70.
- Hanahan, D. and Weinberg, R. A. (2011). Hallmarks of cancer: the next generation 1. *Cell*, 144(5):646–674.
- Hartmann, F., Renner, C., Jung, W., Deisting, C., Juwana, M., Eichertopf, B., Kloft, M., and Pfreundschuh, M. (1997). Treatment of refractory hodgkin’s disease with an anti-cd16/cd30 bispecific antibody 1. *Blood*, 89(6):2042–2047.
- Haruta, Y. and Seon, B. K. (1986). Distinct human leukemia-associated cell surface glycoprotein gp160 defined by monoclonal antibody sn6. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 83(20):7898–7902.
- Hawinkels, L. J., Kuiper, P., Wiercinska, E., Verspaget, H. W., Liu, Z., Pardali, E., Sier, C. F., and ten, D. P. (2010). Matrix metalloproteinase-14 (mt1-mmp)-mediated endoglin shedding inhibits tumor angiogenesis 1. *Cancer Res.*, 70(10):4141–4150.
- Imai, K. and Takaoka, A. (2006). Comparing antibody and small-molecule therapies for cancer 1. *Nat. Rev. Cancer*, 6(9):714–727.
- Jain, R. K. (2001). Normalizing tumor vasculature with anti-angiogenic therapy: a new paradigm for combination therapy 1. *Nat. Med.*, 7(9):987–989.
- Jones, P. T., Dear, P. H., Foote, J., Neuberger, M. S., and Winter, G. (1986). Replacing the complementarity-determining regions in a human antibody with those from a mouse. *Nature*, 321(6069):522–525.
- Kerbel, R. S. (2008). Tumor angiogenesis. *N. Engl. J. Med.*, 358(19):2039–2049.
- Kohler, G. and Milstein, C. (1975). Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature*, 256(5517):495–497.
- Koleva, R. I., Conley, B. A., Romero, D., Riley, K. S., Marto, J. A., Lux, A., and Vary, C. P. (2006). Endoglin structure and function: Determinants of endoglin phosphorylation by transforming growth factor-beta receptors. *J. Biol. Chem.*, 281(35):25110–25123.
- Kugler, M., Stein, C., Kellner, C., Mentz, K., Saul, D., Schwenkert, M., Schubert, I., Singer, H., Oduncu, F., Stockmeyer, B., Mackensen, A., and Fey, G. H. (2010). A recombinant trispecific single-chain fv derivative directed against cd123 and cd33 mediates effective elimination of acute myeloid leukaemia cells by dual targeting 1. *Br. J. Haematol.*, 150(5):574–586.
- Lambrechts, D., Claes, B., Delmar, P., Reumers, J., Mazzone, M., Yesilyurt, B. T., Devlieger, R., Verslype, C., Tejpar, S., Wildiers, H., de, H. S., Carmeliet, P., Scherer, S. J., and Van, C. E. (2012). Vegf pathway genetic variants as biomarkers of treatment outcome with bevacizumab: an analysis of data from the avita and avoren randomised trials 1. *Lancet Oncol.*, 13(7):724–733.

- Lastres, P., Bellon, T., Cabanas, C., Sanchez-Madrid, F., Acevedo, A., Gougos, A., Letarte, M., and Bernabeu, C. (1992). Regulated expression on human macrophages of endoglin, an arg-gly-asp-containing surface antigen. *Eur. J. Immunol.*, 22(2):393–397.
- Lastres, P., Letamendia, A., Zhang, H., Rius, C., Almendro, N., Raab, U., Lopez, L. A., Langa, C., Fabra, A., Letarte, M., and Bernabeu, C. (1996). Endoglin modulates cellular responses to tgf-beta 1. *J. Cell Biol.*, 133(5):1109–1121.
- Lazar, G. A., Dang, W., Karki, S., Vafa, O., Peng, J. S., Hyun, L., Chan, C., Chung, H. S., Eivazi, A., Yoder, S. C., Vielmetter, J., Carmichael, D. F., Hayes, R. J., and Dahiyat, B. I. (2006). Engineered antibody fc variants with enhanced effector function 1. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 103(11):4005–4010.
- Lebrin, F., Goumans, M. J., Jonker, L., Carvalho, R. L., Valdimarsdottir, G., Thorikay, M., Mummery, C., Arthur, H. M., and ten, D. P. (2004). Endoglin promotes endothelial cell proliferation and tgf-beta/alk1 signal transduction. *EMBO J.*, 23(20):4018–4028.
- Letamendia, A., Lastres, P., Botella, L. M., Raab, U., Langa, C., Velasco, B., Atisano, L., and Bernabeu, C. (1998). Role of endoglin in cellular responses to transforming growth factor-beta. a comparative study with betaglycan. *J. Biol. Chem.*, 273(49):33011–33019.
- Li, C., Guo, B., Wilson, P. B., Stewart, A., Byrne, G., Bundred, N., and Kumar, S. (2000). Plasma levels of soluble cd105 correlate with metastasis in patients with breast cancer. *Int. J. Cancer*, 89(2):122–126.
- Li, C., Issa, R., Kumar, P., Hampson, I. N., Lopez-Novoa, J. M., Bernabeu, C., and Kumar, S. (2003). Cd105 prevents apoptosis in hypoxic endothelial cells 1. *J. Cell Sci.*, 116(Pt 13):2677–2685.
- Li, D. Y., Sorensen, L. K., Brooke, B. S., Urness, L. D., Davis, E. C., Taylor, D. G., Boak, B. B., and Wendel, D. P. (1999). Defective angiogenesis in mice lacking endoglin. *Science*, 284(5419):1534–1537.
- Lin, S. J., Hu, Y., Zhu, J., Woodruff, T. K., and Jardetzky, T. S. (2011). Structure of betaglycan zona pellucida (zp)-c domain provides insights into zp-mediated protein polymerization and tgf-beta binding 1. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 108(13):5232–5236.
- Llorca, O., Trujillo, A., Blanco, F. J., and Bernabeu, C. (2007). Structural model of human endoglin, a transmembrane receptor responsible for hereditary hemorrhagic telangiectasia. *J. Mol. Biol.*, 365(3):694–705.
- Lupu, A., Stefanescu, C., Treton, X., Attar, A., Corcos, O., and Bouhnik, Y. (2013). Bevacizumab as rescue treatment for severe recurrent gastrointestinal bleeding in hereditary hemorrhagic telangiectasia 1. *J. Clin. Gastroenterol.*, 47(3):256–257.

- Massague, J. (1998). Tgf-beta signal transduction 1. *Annu. Rev. Biochem.*, 67:753–791.
- Massague, J., Blain, S. W., and Lo, R. S. (2000). Tgfbeta signaling in growth control, cancer, and heritable disorders. *Cell*, 103(2):295–309.
- Matsuno, F., Haruta, Y., Kondo, M., Tsai, H., Barcos, M., and Seon, B. K. (1999). Induction of lasting complete regression of preformed distinct solid tumors by targeting the tumor vasculature using two new anti-endoglin monoclonal antibodies. *Clin. Cancer Res.*, 5(2):371–382.
- McAllister, K. A., Baldwin, M. A., Thukkani, A. K., Gallione, C. J., Berg, J. N., Porteous, M. E., Guttmacher, A. E., and Marchuk, D. A. (1995). Six novel mutations in the endoglin gene in hereditary hemorrhagic telangiectasia type 1 suggest a dominant-negative effect of receptor function. *Hum. Mol. Genet.*, 4(10):1983–1985.
- McAllister, K. A., Grogg, K. M., Johnson, D. W., Gallione, C. J., Baldwin, M. A., Jackson, C. E., Helmbold, E. A., Markel, D. S., McKinnon, W. C., Murrell, J., and . (1994). Endoglin, a tgf-beta binding protein of endothelial cells, is the gene for hereditary haemorrhagic telangiectasia type 1. *Nat. Genet.*, 8(4):345–351.
- Miller, D. W., Graulich, W., Karges, B., Stahl, S., Ernst, M., Ramaswamy, A., Sedlacek, H. H., Muller, R., and Adamkiewicz, J. (1999). Elevated expression of endoglin, a component of the tgf-beta-receptor complex, correlates with proliferation of tumor endothelial cells. *Int. J. Cancer*, 81(4):568–572.
- Miller, J. W., Adamis, A. P., Shima, D. T., D’Amore, P. A., Moulton, R. S., O’Reilly, M. S., Folkman, J., Dvorak, H. F., Brown, L. F., Berse, B., and . (1994). Vascular endothelial growth factor/vascular permeability factor is temporally and spatially correlated with ocular angiogenesis in a primate model. *Am. J. Pathol.*, 145(3):574–584.
- Moore, G. L., Chen, H., Karki, S., and Lazar, G. A. (2010). Engineered fc variant antibodies with enhanced ability to recruit complement and mediate effector functions 1. *MAbs.*, 2(2):181–189.
- Morrison, S. L., Johnson, M. J., Herzenberg, L. A., and Oi, V. T. (1984). Chimeric human antibody molecules: mouse antigen-binding domains with human constant region domains. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 81(21):6851–6855.
- Moulton, K. S., Vakili, K., Zurakowski, D., Soliman, M., Butterfield, C., Sylvin, E., Lo, K. M., Gillies, S., Javaherian, K., and Folkman, J. (2003). Inhibition of plaque neovascularization reduces macrophage accumulation and progression of advanced atherosclerosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 100(8):4736–4741.
- Mysliwiec, P., Pawlak, K., Bandurski, R., and Kedra, B. (2009). Soluble angiogenesis markers in gastric tumor patients 1. *Folia Histochem. Cytobiol.*, 47(1):81–86.

- Mysliwiec, P., Pawlak, K., Kuklinski, A., and Kedra, B. (2008). Combined perioperative plasma endoglin and vegf-a assessment in colorectal cancer patients 1. *Folia Histochem. Cytobiol.*, 46(4):487–492.
- Nagy, J. A., Chang, S. H., Shih, S. C., Dvorak, A. M., and Dvorak, H. F. (2010). Heterogeneity of the tumor vasculature 1. *Semin. Thromb. Hemost.*, 36(3):321–331.
- Nimmerjahn, F. and Ravetch, J. V. (2008). Fcγ receptors as regulators of immune responses 1. *Nat. Rev. Immunol.*, 8(1):34–47.
- Odegaard, E., Davidson, B., Engh, V., Onsrud, M., and Staff, A. C. (2008). Assessment of endoglin and calprotectin as potential biomarkers in ovarian carcinoma and borderline tumors of the ovary 1. *Am. J. Obstet. Gynecol.*, 199(5):533–538.
- Paul, W. E. (2003). Fundamental immunology. pages 685–700.
- Perez-Gomez, E., Eleno, N., Lopez-Novoa, J. M., Ramirez, J. R., Velasco, B., Letarte, M., Bernabeu, C., and Quintanilla, M. (2005). Characterization of murine s-endoglin isoform and its effects on tumor development. *Oncogene*, 24(27):4450–4461.
- Piek, E., Heldin, C. H., and ten, D. P. (1999). Specificity, diversity, and regulation in tgfbeta superfamily signaling. *FASEB J.*, 13(15):2105–2124.
- Qu, R., Silver, M. M., and Letarte, M. (1998). Distribution of endoglin in early human development reveals high levels on endocardial cushion tissue mesenchyme during valve formation. *Cell Tissue Res.*, 292(2):333–343.
- Quackenbush, E. J. and Letarte, M. (1985). Identification of several cell surface proteins of non-t, non-b acute lymphoblastic leukemia by using monoclonal antibodies. *J. Immunol.*, 134(2):1276–1285.
- Reichert, J. M. (2012). Marketed therapeutic antibodies compendium 1. *MAbs.*, 4(3):413–415.
- Rius, C., Smith, J. D., Almendro, N., Langa, C., Botella, L. M., Marchuk, D. A., Vary, C. P., and Bernabeu, C. (1998). Cloning of the promoter region of human endoglin, the target gene for hereditary hemorrhagic telangiectasia type 1. *Blood*, 92(12):4677–4690.
- Rokhlin, O. W., Cohen, M. B., Kubagawa, H., Letarte, M., and Cooper, M. D. (1995). Differential expression of endoglin on fetal and adult hematopoietic cells in human bone marrow. *J. Immunol.*, 154(9):4456–4465.
- Rosen, L. S., Hurwitz, H. I., Wong, M. K., Goldman, J., Mendelson, D. S., Figg, W. D., Spencer, S., Adams, B. J., Alvarez, D., Seon, B. K., Theuer, C. P., Leigh, B. R., and Gordon, M. S. (2012). A phase i first-in-human study of trc105 (anti-endoglin antibody) in patients with advanced cancer 1. *Clin. Cancer Res.*, 18(17):4820–4829.

- Sadick, H., Sadick, M., Gotte, K., Naim, R., Riedel, F., Bran, G., and Hormann, K. (2006). Hereditary hemorrhagic telangiectasia: an update on clinical manifestations and diagnostic measures. *Wien. Klin. Wochenschr.*, 118(3-4):72–80.
- Sanchez-Elsner, T., Botella, L. M., Velasco, B., Langa, C., and Bernabeu, C. (2002). Endoglin expression is regulated by transcriptional cooperation between the hypoxia and transforming growth factor-beta pathways. *J. Biol. Chem.*, 277(46):43799–43808.
- Schreiber, R. D., Old, L. J., and Smyth, M. J. (2011). Cancer immunoediting: integrating immunity's roles in cancer suppression and promotion 1. *Science*, 331(6024):1565–1570.
- Schuster, H. (2013). *Durchflusscytometrische Dissektion renaler Tumore*. Thesis/dissertation.
- Seon, B. K., Haba, A., Matsuno, F., Takahashi, N., Tsujie, M., She, X., Harada, N., Uneda, S., Tsujie, T., Toi, H., Tsai, H., and Haruta, Y. (2011). Endoglin-targeted cancer therapy. *Curr. Drug Deliv.*, 8(1):135–143.
- Seon, B. K., Matsuno, F., Haruta, Y., Kondo, M., and Barcos, M. (1997). Long-lasting complete inhibition of human solid tumors in scid mice by targeting endothelial cells of tumor vasculature with antihuman endoglin immunotoxin. *Clin. Cancer Res.*, 3(7):1031–1044.
- Shields, R. L., Lai, J., Keck, R., O'Connell, L. Y., Hong, K., Meng, Y. G., Weikert, S. H., and Presta, L. G. (2002). Lack of fucose on human igg1 n-linked oligosaccharide improves binding to human fc gamma riii and antibody-dependent cellular toxicity 1. *J. Biol. Chem.*, 277(30):26733–26740.
- Shields, R. L., Namenuk, A. K., Hong, K., Meng, Y. G., Rae, J., Briggs, J., Xie, D., Lai, J., Stadlen, A., Li, B., Fox, J. A., and Presta, L. G. (2001). High resolution mapping of the binding site on human igg1 for fc gamma ri, fc gamma rii, fc gamma riii, and fc gamma riii and design of igg1 variants with improved binding to the fc gamma r 1. *J. Biol. Chem.*, 276(9):6591–6604.
- Shiozaki, K., Harada, N., Greco, W. R., Haba, A., Uneda, S., Tsai, H., and Seon, B. K. (2006). Antiangiogenic chimeric anti-endoglin (cd105) antibody: pharmacokinetics and immunogenicity in nonhuman primates and effects of doxorubicin. *Cancer Immunol. Immunother.*, 55(2):140–150.
- Srivastava, A., Laidler, P., Davies, R. P., Horgan, K., and Hughes, L. E. (1988). The prognostic significance of tumor vascularity in intermediate-thickness (0.76-4.0 mm thick) skin melanoma. a quantitative histologic study. *Am. J. Pathol.*, 133(2):419–423.
- St-Jacques, S., Cymerman, U., Pece, N., and Letarte, M. (1994). Molecular characterization and in situ localization of murine endoglin reveal that it is a transforming growth factor-beta binding protein of endothelial and stromal cells. *Endocrinology*, 134(6):2645–2657.

- Stavenhagen, J. B., Gorlatov, S., Tuailon, N., Rankin, C. T., Li, H., Burke, S., Huang, L., Vjih, S., Johnson, S., Bonvini, E., and Koenig, S. (2007). Fc optimization of therapeutic antibodies enhances their ability to kill tumor cells in vitro and controls tumor expansion in vivo via low-affinity activating fcgamma receptors 1. *Cancer Res.*, 67(18):8882–8890.
- Szabo, S., Folkman, J., Vattay, P., Morales, R. E., Pinkus, G. S., and Kato, K. (1994). Accelerated healing of duodenal ulcers by oral administration of a mutein of basic fibroblast growth factor in rats. *Gastroenterology*, 106(4):1106–1111.
- Tabata, M., Kondo, M., Haruta, Y., and Seon, B. K. (1999). Antiangiogenic radioimmunotherapy of human solid tumors in scid mice using (125)i-labeled anti-endoglin monoclonal antibodies. *Int. J. Cancer*, 82(5):737–742.
- Takahashi, N., Haba, A., Matsuno, F., and Seon, B. K. (2001a). Antiangiogenic therapy of established tumors in human skin/severe combined immunodeficiency mouse chimeras by anti-endoglin (cd105) monoclonal antibodies, and synergy between anti-endoglin antibody and cyclophosphamide. *Cancer Res.*, 61(21):7846–7854.
- Takahashi, N., Kawanishi-Tabata, R., Haba, A., Tabata, M., Haruta, Y., Tsai, H., and Seon, B. K. (2001b). Association of serum endoglin with metastasis in patients with colorectal, breast, and other solid tumors, and suppressive effect of chemotherapy on the serum endoglin. *Clin. Cancer Res.*, 7(3):524–532.
- Tanaka, F., Otake, Y., Yanagihara, K., Kawano, Y., Miyahara, R., Li, M., Yamada, T., Hanaoka, N., Inui, K., and Wada, H. (2001). Evaluation of angiogenesis in non-small cell lung cancer: comparison between anti-cd34 antibody and anti-cd105 antibody. *Clin. Cancer Res.*, 7(11):3410–3415.
- Tanigawa, N., Amaya, H., Matsumura, M., and Shimomatsuya, T. (1997). Association of tumour vasculature with tumour progression and overall survival of patients with non-early gastric carcinomas. *Br. J. Cancer*, 75(4):566–571.
- Tian, H., Mythreye, K., Golzio, C., Katsanis, N., and Blobel, G. C. (2012). Endoglin mediates fibronectin/alpha5beta1 integrin and tgf-beta pathway crosstalk in endothelial cells 1. *EMBO J.*, 31(19):3885–3900.
- Torsney, E., Charlton, R., Parums, D., Collis, M., and Arthur, H. M. (2002). Inducible expression of human endoglin during inflammation and wound healing in vivo 1. *Inflamm. Res.*, 51(9):464–470.
- Tsujie, M., Tsujie, T., Toi, H., Uneda, S., Shiozaki, K., Tsai, H., and Seon, B. K. (2008). Anti-tumor activity of an anti-endoglin monoclonal antibody is enhanced in immunocompetent mice. *Int. J. Cancer*, 122(10):2266–2273.
- Tsujie, M., Uneda, S., Tsai, H., and Seon, B. K. (2006). Effective anti-angiogenic therapy of established tumors in mice by naked anti-human endoglin (cd105) antibody: differences in growth rate and therapeutic response between tumors growing at different sites. *Int. J. Oncol.*, 29(5):1087–1094.

- Uneda, S., Toi, H., Tsujie, T., Tsujie, M., Harada, N., Tsai, H., and Seon, B. K. (2009). Anti-endoglin monoclonal antibodies are effective for suppressing metastasis and the primary tumors by targeting tumor vasculature. *Int. J. Cancer*, 125(6):1446–1453.
- Venkatesha, S., Toporsian, M., Lam, C., Hanai, J., Mammoto, T., Kim, Y. M., Bdolah, Y., Lim, K. H., Yuan, H. T., Libermann, T. A., Stillman, I. E., Roberts, D., D'Amore, P. A., Epstein, F. H., Sellke, F. W., Romero, R., Sukhatme, V. P., Letarte, M., and Karumanchi, S. A. (2006). Soluble endoglin contributes to the pathogenesis of preeclampsia 1. *Nat. Med.*, 12(6):642–649.
- Wang, J. M., Kumar, S., Pye, D., Haboubi, N., and al Nakib, L. (1994a). Breast carcinoma: comparative study of tumor vasculature using two endothelial cell markers. *J. Natl. Cancer Inst.*, 86(5):386–388.
- Wang, J. M., Kumar, S., van, A. A., Kumar, P., Pye, D., and Hunter, R. D. (1995). Irradiation induces up-regulation of e9 protein (cd105) in human vascular endothelial cells. *Int. J. Cancer*, 62(6):791–796.
- Wang, J. M., Wilson, P. B., Kumar, S., Pye, D., and Hunter, R. D. (1994b). Quantitation of endothelial cell specific protein e-9 employing a single monoclonal antibody in an indirect sandwich elisa. *J. Immunol. Methods*, 171(1):55–64.
- Weidner, N., Folkman, J., Pozza, F., Bevilacqua, P., Allred, E. N., Moore, D. H., Meli, S., and Gasparini, G. (1992). Tumor angiogenesis: a new significant and independent prognostic indicator in early-stage breast carcinoma. *J. Natl. Cancer Inst.*, 84(24):1875–1887.
- Weidner, N., Semple, J. P., Welch, W. R., and Folkman, J. (1991). Tumor angiogenesis and metastasis—correlation in invasive breast carcinoma. *N. Engl. J. Med.*, 324(1):1–8.
- Weiner, L. M. (2006). Fully human therapeutic monoclonal antibodies 1. *J. Immunother.*, 29(1):1–9.
- Winter, G. and Milstein, C. (1991). Man-made antibodies 1. *Nature*, 349(6307):293–299.
- Wipff, J., Avouac, J., Borderie, D., Zerkak, D., Lemarechal, H., Kahan, A., Boileau, C., and Allanore, Y. (2008). Disturbed angiogenesis in systemic sclerosis: high levels of soluble endoglin 1. *Rheumatology. (Oxford)*, 47(7):972–975.
- Yamashita, H., Ichijo, H., Grimsby, S., Moren, A., ten, D. P., and Miyazono, K. (1994). Endoglin forms a heteromeric complex with the signaling receptors for transforming growth factor-beta. *J. Biol. Chem.*, 269(3):1995–2001.
- YOUNGNER, J. S. and ALGIRE, G. H. (1949). The effect of vascular occlusion on transplanted tumors 1. *J. Natl. Cancer Inst.*, 10(3):565–579.

- Zalevsky, J., Chamberlain, A. K., Horton, H. M., Karki, S., Leung, I. W., Sproule, T. J., Lazar, G. A., Roopenian, D. C., and Desjarlais, J. R. (2010). Enhanced antibody half-life improves in vivo activity 1. *Nat. Biotechnol.*, 28(2):157–159.
- Zhang, Z., Schittenhelm, J., Guo, K., Buhring, H. J., Trautmann, K., Meyermann, R., and Schluesener, H. J. (2006). Upregulation of frizzled 9 in astrocytomas 1. *Neuropathol. Appl. Neurobiol.*, 32(6):615–624.

# Kapitel 6

## Appendix

### 6.1 Abkürzungsverzeichnis

ABKÜRZUNG	DEFINITION
$\alpha$	anti
#	Nummer
ADCC	<i>antibody-dependent cellular cytotoxicity</i> , Antikörper-vermittelte zelluläre Zytotoxizität
ADCP	<i>antibody-dependent cellular phagocytosis</i> , Antikörper-vermittelte zelluläre Phagozytose
APC	Allophycocyanin
bp	Basenpaar
BSA	bovines Serumalbumin
CD	Cluster of differentiation
$C_H$	Konstante Domäne der schweren Kette ( <i>heavy</i> )
$C_L$	Konstante Domäne der leichten Kette ( <i>light</i> )
cDNA	<i>complementary</i> , komplementäre DNA
CDR	<i>complementarity-determining region</i> , hypervariable Region
CDC	<i>complement-dependent cytotoxicity</i> , Komplement-abhängige Zytotoxizität
CDCC	<i>complement-dependent cellular cytotoxicity</i> , Komplement-abhängige zelluläre Zytotoxizität
cpm	counts per minute
Cr	Chromium
Da	Dalton
DAB	3,3'-Diaminobenzidin
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonucleinsäure
dNTP	2'-Deoxynukleosid-5'-Triphosphat
DPBS	<i>Dulbecco's phosphate buffered saline</i>
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ELISA	<i>Enzyme-linked immunosorbent assay</i>

ABKÜRZUNG	DEFINITION
ENG	Endoglin
E:T	Verhältnis zwischen Effektor- und Zielzellen ( <i>target</i> )
FACS	<i>Fluorescence activated cell sorter</i>
FCS	fötales Kälberserum
FR	<i>framework region</i> , konformationsbildende Gerüstregion
FZD	frizzled
g	Gramm
°C	Grad Celsius
h	Stunde
HACA	<i>human anti-chimeric antibodies</i>
HAHA	<i>human anti-human antibodies</i>
HAMA	<i>human anti-mouse antibodies</i>
HAT	Hypoxanthin-Aminopterin-Thymidin
HRP	<i>horse radish peroxidase</i> , Meerrettichperoxidase
HT	Hypoxanthin-Thymidin
IMDM	<i>Iscove 's Modified Dulbecco 's Medium</i>
IPTG	Isporopyl-1-thio- $\beta$ -D-Galaktose
Karo/K-ro	Weiblicher Vorname, Spielkartenfarbe, kleiner Baum in Neuseeland, Volk und Sprache in Brasilien, geometrische Form, therapeutischer Antikörper
kb	Kilobasen
kDa	Kilodalton
L	Liter
M	Mol
$\mu$ Ci	Mikrocurie
MMP	Matrix-Metalloproteinase
mENG	Maus-Endoglin
MFI	mittlere Fluoreszenzintensität
mg	Milligramm
$\mu$ g	Mikrogramm
min	Minute
mL	Milliliter
$\mu$ l	Mikroliter
murin	zur Familie der <i>Muridae</i> gehöriges Nagetier
NK-Zelle	Natürliche Killerzelle
ng	Nanogramm
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i> , Polymerase-Ketten-Reaktion
PBMC	<i>peripheral blood mononuclear cells</i>
R-PE	R-Phycoerythrin
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute</i>
RT	Raumtemperatur
SDIEM	Modifikation des humanen Fc-Teils zur Steigerung der ADCC-Aktivität durch zwei Aminosäureaustausche an Position 239 (Serin (S) in Asparaginsäure (D)) und Position 332 (Isoleucin (I) in Asparaginsäure (E)) mit <i>c-myc-tag</i> -Protein

## 6.1. ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

---

ABKÜRZUNG	DEFINITION
SDS-PAGE	<i>Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis</i> , Natrium-Dodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese
sENG	<i>soluble endoglin</i> , lösliche Form von Endoglin
SFI	spezifischer Fluoreszenzindex
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TCR	T-Zell-Rezeptor
TMB	3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin
U	Unit
UV	Ultraviolett
VEGF(R)	<i>vascular endothelial growth factor (receptor)</i>
$V_H$	Variable Domäne der schweren Kette ( <i>heavy</i> )
$V_L$	Variable Domäne der leichten Kette ( <i>light</i> )
v/v	<i>volume per volume</i>
w/v	<i>weight per volume</i>
x g	Vielfaches der Gravitationsbeschleunigung
X-Gal	5-Brom-4-chlor-3-indoxyl- $\beta$ -D-Galaktopyranosid

## 6.2 Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich zunächst herzlichst bei Prof. Dr. Hans-Georg Rammensee für die freundliche Aufnahme in die Abteilung Immunologie, sowie die konstruktiven Anregungen und Diskussionen bedanken.

Mein besonderer Dank gilt Prof. Dr. Gundram Jung für die Übergabe des äußerst interessanten Promotionsthemas, sowie der hervorragenden Betreuung meiner Arbeit. Ich wurde stets mit wertvollen Ideen und konstruktiven Diskussionen unterstützt.

Des Weiteren möchte ich mich bei Dr. Ludger Große-Hovest für die Einführung in die Welt der Molekularbiologie, sowie für die Unterstützung während der Klonierungsarbeiten bedanken.

Dr. Hans-Jörg Bühring (Abteilung Innere Medizin, Universitätsklinikum Tübingen) danke ich für die Zusammenarbeit bzgl. des Antikörpers W3C4E11.

Ein herzliches Dankeschön geht auch an Dipl.-Biochem. Heiko Schuster, welcher mir maßgeblich bei den durchflusszytometrischen Analysen der primären Nierenzellen, sowie deren Aufarbeitung behilflich war.

Bei Beate Pömmerl möchte ich mich für die kompetente Unterstützung bei den tierexperimentellen Arbeiten herzlichst bedanken.

Nicht zuletzt gilt mein außerordentlicher Dank den Kollegen der AG Jung, sowie der kompletten Abteilung Immunologie für die hervorragende Arbeitsatmosphäre.

## 6.3 Curriculum Vitae

---

---

### PERSÖNLICHE DATEN

Name	Karolin Schwartz
Geburtsdatum	30. November 1982
Geburtsort	Babelsberg (Potsdam)
Staatsangehörigkeit	deutsch

---

### SCHULISCHE AUSBILDUNG

1989-1993	Grund- und Hauptschule, Bad Urach
1993-2002	Graf-Eberhard-Gymnasium, Bad Urach

---

### UNIVERSITÄRE AUSBILDUNG

10/2002-10/2007	<b>Diplomstudiengang Biologie, Universität Hohenheim</b> Hauptfach: <i>Physiologie</i> Nebenfächer: <i>Virologie, Zelluläre Mikrobiologie</i> Profilierende Lehreinheiten: <i>Allgemeine Genetik, Molekulare Genetik, Infektion und Immunität, Systematik der Bakterien</i>
04/2007-10/2007	<b>Diplomarbeit an der Universität Hohenheim, Institut für Ernährungsmedizin</b> (Leitung: Prof. Dr. Christiane Bode), Thema: „ <i>Regulierung von tight junction-Proteinen in intestinalen Epithelzellen durch probiotische und kommensale Bakterien</i> “
12/2007-02/2012	<b>Promotion an der Eberhard Karls Universität Tübingen, Institut für Zellbiologie, Abteilung Immunologie</b> (Leitung: Prof. Dr. Hans-Georg Rammensee), AG Experimentelle Antikörpertherapie (Leitung: Prof. Dr. Gundram Jung), Thema: „ <i>Generierung, präklinische Charakterisierung und Optimierung monoklonaler Antikörper zur anti-angiogenetischen Therapie solider Tumoren</i> “; <b>Disputation</b> am 16. Juli 2013

---

### BERUFSTÄTIGKEIT

ab 03/2012	<b>Synimmune GmbH, Tübingen</b> , Leitung der Qualitätskontrolle
------------	--

---

### PUBLIKATIONEN

Patent/Publikation	Eine Patentanmeldung und wissenschaftliche Publikation der Inhalte dieser Arbeit sind in Planung.
Publikation	<b>Generation, selection and preclinical characterization of an Fc-optimized FLT3 antibody for the treatment of myeloid leukemia</b> Hofmann M, Große-Hovest L, Nübling T, Pyz E, Bamberg ML, Aulwurm S, Bühring HJ, <u>Schwartz K</u> , Haen SP, Schilbach K, Rammensee HG, Salih HR, Jung G; <i>Leukemia</i> . 2012 Jun;26(6):1228-37. doi: 10.1038/leu.2011.372. Epub 2012 Jan 6

---

---