

INAUGURAL DISSERTATION

zur Erlangung der Doktorwürde
der Naturwissenschaftlich-Mathematischen
Gesamtfakultät
der Ruprecht-Karls-Universität Heidelberg

vorgelegt von

Dipl.-Ing. Biotechnologie (FH)

Silke Wolterink

aus Nordhorn

Tag der mündlichen Prüfung:

THERAPEUTISCHE ANTIKÖRPER GEGEN
L1CAM:
FUNKTIONELLE CHARAKTERISIERUNG UND PRÄKLINISCHE
ANALYSE IM OVARIALKARZINOM

Gutachter: Prof. Dr. Volker Schirmacher

Prof. Dr. Peter Altevogt

In Gedenken an meine Mutter

Die Spielregeln des Lebens verlangen von uns nicht,
dass wir um jeden Preis siegen,
wohl aber, dass wir den Kampf niemals aufgeben.

Dr. med. et Dr. phil. Viktor Frankl (1905 - 1997)

DANKSAGUNG

Ich möchte mich bei allen recht herzlich bedanken, die mit ihrer Unterstützung zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben. Insbesondere danke ich:

Herrn Prof. Dr. Peter Altevogt für die Bereitstellung des interessanten Themas, seine stete Diskussionsbereitschaft, seine Anregungen und die nicht ausgehenden Ideen während der Betreuung dieser Arbeit.

Herrn Dr. Gerhard Moldenhauer für die unersättliche Versorgung mit diversen Antikörpern und technischen Ratschlägen.

Herrn Prof. Dr. Volker Schirrmacher für die Übernahme des Erstgutachtens und die Möglichkeit, diese Arbeit in der Abteilung Zelluläre Immunologie anfertigen zu können.

Herrn Prof. Dr. Werner Buselmaier, der sich freundlicherweise bereit erklärt hat, den Vorsitz der Prüfungskommission zu übernehmen.

Frau Prof. Dr. Mina Fogel für die Durchführung einiger Mausexperimente und die IHC-Färbungen, die diese Arbeit sehr bereichern.

Unseren Kooperationspartner Medigene AG (München), insbesondere Dr. Ulrich Möbius, Dr. Yvonne Hirle und Dr. Jan Endell für die gute Zusammenarbeit im Rahmen des L1-Antikörper-Projektes.

Dr. Svenja Riedle für ein immer offenes Ohr bei fachlichen und weniger fachlichen Fragen, die schöne Zeit auf dem Rücken der Pferde und nicht zuletzt für ihre Korrekturbereitschaft.

Dem gesamten Team der Arbeitsgruppe Altevogt möchte ich für die tolle Arbeitsatmosphäre und den freundschaftlichen Umgang untereinander danken. Insbesondere danke ich Marco für seine außerordentliche Hilfsbereitschaft. Unsere morgendlichen Radfahrten vermisse ich jetzt schon. Außerdem danke ich Helena und Sascha für ihre hilfreichen Ratschläge fachlicher und computerspezifischer Art. Ferner bedanke ich mich auch bei Anne, Uwe, Niko, Sandra und Matthias sowie bei den ehemaligen Mitarbeitern Steffen, Christian und Yasmin für die fachlichen und erheiternden Gespräche und das ein oder andere Feierabendbier. Ebenso möchte ich mich bei Natalie bedanken, die durch ihre Arbeit für einen reibungslosen Laboralltag sorgt.

Meinen beiden Auszubildenden Tatjana Schmidt und Oksana Seibert danke ich für die engagierte und fleißige Unterstützung im Labor. Ich wünsche euch beiden weiterhin viel Erfolg für eure berufliche Zukunft.

Mein besonderer Dank gilt Stephan für die liebevolle und geduldige Unterstützung an so manchen schwierigen Punkten und für seine Stärke und sein Vertrauen.

Tom und Jacky danke ich für manche Ablenkung während des Schreibens. Wir drei werden wohl nicht in den „Mäusehimmel“ kommen.

Weiterhin möchte ich mich bei meiner Familie für die stete Unterstützung und den Rückhalt bedanken.

ERKLÄRUNG

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Dissertation selbst verfasst und mich dabei keiner anderen als der von mir ausdrücklich bezeichneten Quellen und Hilfen bedient habe.

Schriesheim, 12. Januar 2010

Silke Wolterink

ZUSAMMENFASSUNG

L1 wurde ursprünglich als Zelladhäsionsprotein des Nervensystems beschrieben. In den letzten Jahren wurde L1 außerdem als Marker für die Progression von Krebs identifiziert. L1 fördert die Tumorzellinvasion und die Motilität. Darüber hinaus kann es die Metastasierungsfähigkeit erhöhen und das Tumorwachstum *in vivo* steigern. Als Tumor-assoziiertes Antigen ist L1 daher zur Etablierung einer Antikörpertherapie prädestiniert.

Ziel der vorliegenden Arbeit war die präklinische Untersuchung verschiedener gegen L1 gerichtete Antikörper (Ak) zur Anwendung in der Therapie des Ovarialkarzinoms. Zunächst wurden hierfür die biochemischen und funktionellen Eigenschaften von neun neugenerierten Ak untersucht. Alle mAk reagierten spezifisch gegen L1, wobei sie unterschiedliche Epitope erkannten. Eine Kreuzreaktivität mit dem L1-homologen CHL1 konnte dabei ausgeschlossen werden. L1-38.12 erkannte spezifisch die neuronale Form von L1 über ein Epitop im Bereich des Exon 2. Antikörper gegen die erste Ig-Domäne blockierten die homophilische L1-Interaktion. Einige dieser mAk (L1-9.3 und L1-OV198.5) führten zu einer Tumor- und Aszitesreduktion im SKOV3ip-Xenograft-Maus-Modell. Überraschenderweise zeigte nur der IgG2a Isotyp eine signifikant verbesserte Überlebensrate der therapierten Mäuse. L1/IgG2a-Antikörper konnte über die Rekrutierung von Makrophagen in den Tumorbereich, vermutlich über die Interaktion mit aktivierenden Fcγ-R, eine Tumor-reduzierende Wirkung hervorrufen. Eine genomweite Expressionsanalyse der behandelten Tumoren *ex vivo* ergab einen Zusammenhang zwischen der L1-9.3/IgG2-Behandlung und apoptotischen, angiogenetischen und chemoattraktiven Signal- und Effektormechanismen. Ein weiterer Teil dieser Arbeit beschäftigte sich mit der Generierung humanisierter mAk. Ein chimärisierter ChiL1-9.3 und humanisierte HuL1-9.3 mAk zeigten vergleichbare Bindungseigenschaften und -affinitäten zu L1, wie deren parentaler muriner L1-9.3 mAk. *In vivo* Behandlungen mit diesen Antikörpern wiesen eine deutliche Reduktion des Tumorwachstums im Maus-Xenograft-Modell auf. Jedoch wurde *in vitro* kein Zusammenhang mit der antikörper-abhängigen Toxizität gezeigt. Ursache ist vermutlich die Glykosylierungsstruktur am Asn-297 des konstanten Bereichs des mAk. Durch Veränderungen des Expressionssystems wurde ein modifizierter mAk (HuL1-9.3/F2N) generiert, welcher eine konzentrationsabhängige zelluläre Zytotoxizität *in vitro* zeigte. Diese Ergebnisse begründen, dass eine L1 Antikörpertherapie über immunologische und nicht-immunologische Effektor-Mechanismen agiert. Die hier charakterisierten Antikörper könnten damit ein geeignetes Mittel zur erfolgreichen Behandlung L1-positiver Tumore darstellen.

ABSTRACT

L1 is a cell adhesion molecule which was originally found in the nervous system. Recent work has identified L1 additionally as a prognostic marker in several human carcinomas. L1 promotes tumor cell invasion and motility, augments tumor growth in nude mice and facilitates experimental tumor metastasis. As a tumor-associated antigen it is therefore a suitable target molecule for tumor therapy.

Aim of this study was the preclinical investigation of a series of L1 antibodies against human ovarian carcinoma. Nine different murine monoclonal antibodies were produced and characterized for biochemical and functional means. The antibodies recognized different epitopes of L1 but did not react with the closely related protein CHL1. L1-38.12 specifically bound the neuronal form of L1 because it recognizes an epitope inside the exon 2 region. Several antibodies could react with the first Ig domain and were able to inhibit the L1 homophilic binding. Among these antibodies L1-9.3 and L1-OV198.5 were selected and analyzed for their therapeutic potential in a SKOV3ip xenograft mouse model. Only antibodies containing the IgG2a isotype were able to prolong survival efficiently. This was accompanied by the recruitment of macrophages into the tumor site. The antibody interaction with macrophages resulted in decreased tumor growth. Depletion of monocytes by clodronate pretreatment of tumor bearing mice abolished the therapeutic effect. Genome-wide analysis of tumor derived mRNA revealed that L1-9.3/IgG2a therapy induces altered expression of cellular genes associated with apoptosis, angiogenesis and chemotaxis.

Further a humanized HuL1-9.3 and a chimerized ChiL1-9.3 antibody were generated, which showed similar binding characteristics compared to the paternal murine antibody L1-9.3. Both antibodies were able to significantly reduce tumor burden in vivo, but failed to show ADCC function in vitro. Alterations in the expression system were made to produce a modified antibody. This HuL1-9.3/F2N antibody could significantly increase antibody-dependent tumor cell lysis. The effect is most likely due to its modified glycosylation structure.

These results establish that anti-L1 mAb therapy acts via immunological and non-immunological effector mechanisms to block tumor growth. The novel antibodies targeted against L1 could become helpful tools for the therapy of L1 expressing human carcinomas.

INHALTSVERZEICHNIS

1.	Einleitung	1
1.1	Antikörper-basierte Strategien in der Karzinombehandlung	1
1.2	Antikörper	2
1.2.1	Antikörperstruktur	2
1.2.2	Antikörperfunktion.....	3
1.2.3	Das Fc-Rezeptor System	5
1.2.4	Modifikationen von Antikörpern.....	8
1.2.5	Herstellung therapeutischer Antikörper	12
1.2.5.1	Hybridomzelltechnik.....	12
1.2.5.2	Rekombinante Antikörper	12
1.3	Das Ovarialkarzinom	16
1.3.1	Epidemiologie.....	16
1.3.2	Ätiologie	16
1.3.3	Histologie, Verlauf und Symptomatik	16
1.3.4	Therapie und Prognose	17
1.4	Die L1-Rezeptoren der Immunglobulin-Superfamilie	19
1.4.1	Allgemeines	19
1.4.2	Das Zelladhäsionsprotein L1-CAM (CD171).....	20
1.4.2.1	Struktur und Vorkommen von L1-CAM.....	20
1.4.2.2	Funktion und Bindungseigenschaften von L1	22
1.4.2.3	Therapeutische Aspekte	27
1.5	Zielsetzung der Arbeit	28
2.	Material	29
2.1	Chemikalien und molekularbiologische Reagenzien	29
2.2	Verbrauchsmaterial	30
2.3	Kommerzielle Kits	31
2.4	Medien und Medienzusätze	31
2.5	Geräte	32
2.6	Software.....	32
2.7	Datenbanken	32
2.8	Antikörper	33

Inhaltsverzeichnis

2.8.1	Unkonjugierte humane primäre Antikörper	33
2.8.2	Konjugierte Antikörper.....	33
2.8.3	Konjugierte Zweitantikörper	33
2.8.4	Isotypkontrollen	33
2.9	Mausstämme.....	34
2.10	Primer	34
2.10.1	Realtime Primer.....	34
2.10.2	Primer zur Herstellung von Fusionsproteinen	34
2.11	Zelllinien.....	35
2.12	Vektoren und Plasmide	35
2.13	Allgemeine Puffer und Lösungen	36
3.	Methoden	37
3.1	Molekularbiologische Methoden.....	37
3.1.1	RNA Methoden.....	37
3.1.1.1	Gesamt RNA Isolierung aus Zellen.....	37
3.1.1.2	Gesamt RNA Isolierung aus Tumorgeweben.....	37
3.1.1.3	Bestimmung der Qualität von Gesamt RNA.....	38
3.1.1.4	cDNA-Synthese aus mRNA (Reverse Transkription)	38
3.1.1.5	Messung von DNA/RNA/cDNA Konzentration im NanoDrop Spektrometer	38
3.1.1.6	Quantitative Echtzeit-Polymerasekettenreaktion (qRT-PCR)	39
3.1.2	Genexpressionsanalyse	41
3.1.2.1	Probenvorbereitung und Durchführung der Hybridisierung.....	41
3.1.2.2	Computerunterstützte Datenanalyse	41
3.1.3	Herstellung von Fc-Fusionsproteinen	42
3.1.3.1	Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	43
3.1.3.2	Agarose-Gelelektrophorese von Nukleinsäuren	44
3.1.3.3	Restriktionsverdau von DNA.....	44
3.1.3.4	DNA-Isolierung aus einem Agarose-Gel	45
3.1.4	Klonierung	45
3.1.4.1	Vektor-Dephosphorylierung	45
3.1.4.2	Ligation.....	45
3.1.4.3	Chemische Transformation kompetenter Bakterien	46
3.1.5	Lagerung von Bakterienkulturen.....	46
3.1.6	Präparation von Plasmid-DNA.....	47
3.1.6.1	Minipräparation von Plasmid-DNA	47

3.1.6.2	Maxi-Präparation von Plasmid-DNA	47
3.2	Zellbiologische Methoden	48
3.2.1	Kultivierung von Zellen.....	48
3.2.2	Einfrieren und Auftauen von Zellen	48
3.2.3	Bestimmung von Zellzahl und Vitalität.....	48
3.2.4	Transfektion mittels jetPEI™	49
3.2.5	Durchflusszytometrie	49
3.2.6	Isolierung von peripheren mononukleären Zellen (PBMC).....	50
3.2.7	⁵¹ Chrom-Zytotoxizitätsmessung	51
3.2.8	Zelladhäsion auf gereinigtem Substrat	51
3.3	Biochemische und immunologische Methoden	52
3.3.1	Herstellung von Zelllysaten	52
3.3.2	Proteinbestimmung.....	52
3.3.3	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese von Proteinen (SDS-PAGE)	52
3.3.4	Western Blot	54
3.3.5	Biacore-Analyse von Antikörper-Antigen Wechselwirkungen	55
3.3.6	ELISA	55
3.3.7	Lektin-ELISA	56
3.3.8	Immunohistologie von Tumorproben	56
3.4	Murine Tumorwachstumsexperimente.....	57
3.4.1	Tierhaltung	57
3.4.2	Wachstumsexperimente im Maus-Xenograft-Modell	57
3.4.3	In vivo Biolumineszenz-Messung von Tumoren.....	58
3.4.4	Blutentnahme bei der Maus	60
3.4.4.1	Intrakranielle Blutentnahme durch Herzpunktion.....	60
3.4.4.2	Blutentnahme aus der Submandibularvene	60
3.4.5	Erythrozytenlyse.....	60
3.4.6	Isolierung der Milzzellen	61
3.4.7	Enzymatische Aufarbeitung von solidem Tumor	61
3.4.8	Makrophagendepletion während der therapeutischen Behandlung in vivo	61
3.5	Ethikvoten	62
3.6	Angaben zur Statistik	62
4.	Ergebnisse	63
4.1	Expression von L1 im menschlichen Organismus	63
4.1.1	Analyse der L1 Expression im humanen Tumor und auf Tumorzelllinien.....	63

4.1.2	Vorkommen von löslichem L1 (sL1) in Ovarialkarzinom-Patientinnen	64
4.2	Herstellung und Charakterisierung spezifischer Antikörper gegen L1	67
4.2.1	Produktion und Selektion von Antikörpern gegen humanes L1	67
4.2.2	Nachweis der spezifischen Bindung an humanen Zelllinien	67
4.2.2.1	Analyse der Bindungsspezifität von mAk in der Durchflusszytometrie	67
4.2.2.2	Untersuchung der Bindungsreaktivität von mAk im Western Blot	69
4.2.2.3	Analyse der Isoformspezifität von L1-38.12	70
4.2.3	Bestimmung der Epitope verschiedener mAk.....	71
4.2.3.1	Synthese von L1-Fc-Fusionproteinen	72
4.2.3.2	Bestimmung der Epitope mittels Western Blot und ELISA	74
4.2.4	Funktionalität der mAk in der Immunhistologie	76
4.2.5	Bestimmung der Bindungsassoziation K_D mittels Oberflächen-Plasmonresonanz.	77
4.2.5.1	Kinetik und Bindungskonstanten der mAk	78
4.2.5.2	Kreuzblockierendes Verhalten verschiedener L1-Antikörper.....	81
4.2.6	Kreuzreaktivität der L1-Antikörper mit CHL1	83
4.2.7	Analyse der Kreuzreaktivität zu CHL1 mit zytoplasmatischen L1-Antikörpern.....	86
4.2.8	Zusammenfassung der Charakteristika von monoklonalen Antikörpern gegen L1	88
4.3	Funktionelle Analyse monoklonaler L1-Antikörper in vitro	90
4.3.1	Inhibition der L1 homophilische Bindung durch L1-Ak	90
4.4	Funktionelle Untersuchung von L1-Antikörpern in vivo	92
4.4.1	L1-IgG2a Antikörpervarianten können die Überlebensrate in vivo verlängern	92
4.4.2	L1-IgG2a-Antikörper reduzieren das Tumorwachstum in vivo	95
4.4.3	Analyse der Makrophageninfiltration nach L1-Antikörpertherapie	101
4.4.4	Aufhebung der Therapieeffekte mit L1-IgG2a Antikörpern durch Makrophagendepletion.....	104
4.4.5	Analyse differentiell regulierter Gene nach L1-IgG2a Antikörpertherapie.....	108
4.5	Charakterisierung und funktionelle Analyse humanisierte L1-Antikörper.....	114
4.5.1	Herstellung eines chimärisierten und eines humanisierten Antikörpers.....	114
4.5.2	Charakterisierung der humanisierte L1-9.3 Varianten.....	114
4.5.3	Untersuchung der Antikörpertherapie mit humanisierten L1-9.3 Varianten in vivo.. ..	115
4.5.4	Analyse der ADCC-Fähigkeit	117
4.5.5	Bestimmung der Glykosilierungsstruktur der humanisierten Antikörper.....	118
4.5.6	Untersuchung der ADCC-Effekte eines modifizierten HuL1-9.3 Antikörpers.....	121
5.	Diskussion	125
5.1	Charakteristische Eigenschaften der L1-Antikörper	126

5.1.1	L1-Antikörper in der Diagnostik	128
5.1.2	Funktionalität von L1-Antikörpern in vitro.....	129
5.1.3	Antikörper-Kreuzreaktivität mit Zelladhäsionsmolekülen der L1-Ig-Superfamilie	131
5.2	Funktionalität der L1-Antikörper in vivo	133
5.2.1	Überlebensanalysen und Tumorwachstum	133
5.2.2	Mechanismen der Tumor-reduzierenden Funktion von IgG2a-Antikörpern	134
5.2.3	Einfluss der Antikörper auf das Tumor-Mikromillieu.....	136
5.3	Humanisierte Antikörper.....	137
5.4	Die Rolle der Glykosylierung am mAk	139
5.5	Ausblick.....	140
6.	Literaturverzeichnis	143
7.	Abkürzungsverzeichnis.....	161
8.	Anhang.....	167
8.1	Liste der regulierten Gene nach L1/IgG2a mAk Behandlung mittels Genexpressionsanalyse.....	167
8.2	Publikationen und Patente.....	171

1. EINLEITUNG

1.1 Antikörper-basierte Strategien in der Karzinombehandlung

Vor mehr als 100 Jahren formulierte Paul Ehrlich in seiner Seitenkettentheorie das Prinzip der Rezeptor-gesteuerten Immunreaktion, welches die Grundlage für die Antigen-Antikörper-Reaktion legte. 75 Jahre später konnte durch die Entdeckung der Hybridomtechnologie von Köhler und Milstein eine unbegrenzte Menge an monoklonalen Antikörpern (mAk) hergestellt werden (Köhler und Milstein, 1975). Bald wurde erkannt, dass sich mAk für die Therapie von Krankheiten eignen. Es folgte eine intensive Forschung im Bereich therapeutischer Antikörper, so dass im Jahre 1986 der erste monoklonale murine Antikörper von der FDA zu Therapie Zwecken zugelassen werden konnte. Hierbei handelt es sich um den murinen CD3 mAk Muromonab (Orthoclone OKT3®), der für die Suppression einer akuten Abstoßungsreaktion nach Organtransplantationen eingesetzt wird. 10 Jahre später erhielt erstmals ein in der Tumorthherapie verwendeter mAk die Zulassung. Dieser CD20 mAk (Rituximab) wird seit 1997 zur Behandlung des folliculären Non-Hodgkin-Lymphoms (NHL), nach Versagen der Chemotherapie oder in Kombination zur Erstbehandlung, eingesetzt. Die hohe Wirksamkeit dieses nativen Antikörpers ist auf die Tatsache zurückzuführen, dass Rituximab nach Bindung an die Zielzelle nicht nur Apoptose vermittelt, sondern insbesondere auch ADCC (antibody-dependent-cellular-cytotoxicity) und CDC (complement-dependent cytotoxicity) induziert (Reff et al., 1994; Shan et al., 1998; Shan et al., 2000). Catumaxomab (Removab®) ist ein chimärer bispezifischer Antikörper, welcher zur Behandlung des Aszites beim fortgeschrittenen Ovarialkarzinom eingesetzt wird. Er wurde erst kürzlich (2009) von der EMEA in Europa zugelassen. Für die Therapie des Ovarialkarzinoms ist dies der erste zugelassene Antikörper. Zurzeit durchlaufen weitere monoklonale Antikörper Phase I-III Studien.

Derzeit sind 21 therapeutische Antikörper von der FDA (Food and Drug Administration, USA) für die klinische Behandlung zugelassen. Mehr als 100 Antikörper befinden sich in verschiedenen Phasen der klinischen Erprobung. In der Tabelle 1.1 sind die Antikörper gelistet, welche bisher in der Krebstherapie zugelassen sind. Weitere Anwendungen erfolgen jedoch auch bei Autoimmunerkrankungen durch Humira® (anti-TNF α) und Xolair® (anti-IgE) oder bei chronischen Entzündungskrankheiten mit Hilfe von Remicade® (anti-TNF α) oder Tysabri® (anti- α 4-Integrin). Außerdem wurden Zenepax® (anti-CD25) und Simulect® (anti-CD25) für Transplantationen zugelassen. Kardiovaskuläre Indikationen können mit ReoPro® (Blockierung des Fibrinogenrezeptors) behandelt werden.

Tabelle 1.1: Therapeutische Antikörper mit Marktzulassung in der Onkologie

Therapeutikum	Handelsname	Isotyp	Typ	Indikation	Antigen	Zulassung
Rituximab	Rituxan®, Mabthera®	IgG1	Chimär	NHL	CD20	1997 USA
Trastuzumab	Herceptin®	IgG1	Humanisiert	Mamma-Ca	Her-2/neu	1998 USA, 2000 EU
Alemtuzumab	MabCampath®	IgG1	Humanisiert	CLL	CD52	2001 USA, 2001 EU
Bevacizumab	Avastin®	IgG1	Humanisiert	Kolon-Ca	VEGF	2004 USA, 2005 EU
Cetuximab	Erbix®	IgG1	Chimär	Kolon-Ca/ Hals und Kopf Ca	EGFR	2004 USA, 2004, EU
Panitumumab	Vectibix	IgG2	Human	Kolon-Ca	EGFR	2006 USA, 2007 EU
Capromab pendetide	Prostascint	IgG1	Murin ; konj. mit Pendetide (Chelator)	NHL	PSA	1996 USA
Gemtuzumab ozogamicin	Mylotarg	IgG4	Humanisiert ; konj. mit Calicheamicin (Toxin)	AML	CD33	2000 USA
Ibritumomab tiuxetan	Zevalin®	IgG1	Murin; konj. mit Tiuxetan (Chelator)	NHL	CD20	2002 USA, 2004 EU
Tositumomab iodine ¹³¹ I	Bexxar®	IgG2a	Murin; konj. mit ¹³¹ I	NHL	CD20	2003 USA
Catumaxomab	Removab®	IgG2a	Chimär Maus/Ratte; trifunktional	Maligne Aszites, Ovarial-Ca	EpCAM xCD3	2009 EU

VEGF vascular endothelial growth factor; EGFR epidermal growth factor receptor; PSA prostate specific antigen; NHL Non-Hodgkin Lymphom; CLL Chronische lymphatische Leukämie; AML Akute myeloische Leukämie; EU Zulassung in Europa durch die EMEA; USA, Zulassung in den USA durch die FDA.

1.2 Antikörper

1.2.1 Antikörperstruktur

Im Hinblick auf den strukturellen Aufbau sind Antikörper (Ak) sehr gut bekannt. In den letzten 30 Jahren lieferten kristallographische Untersuchungen detaillierte, dreidimensionale Darstellungen von Antikörpern und ihren Fragmenten, zusammengefasst u.a. in (Padlan, 1994; Ramsland und Farrugia, 2002). Antikörper sind Heterodimere und besitzen zwei identische leichte und zwei identische schwere Ketten. Die Ketten werden durch mehrere Disulfid-Brücken und nicht kovalenten Bindungen zusammengehalten (Abb. 1.1).

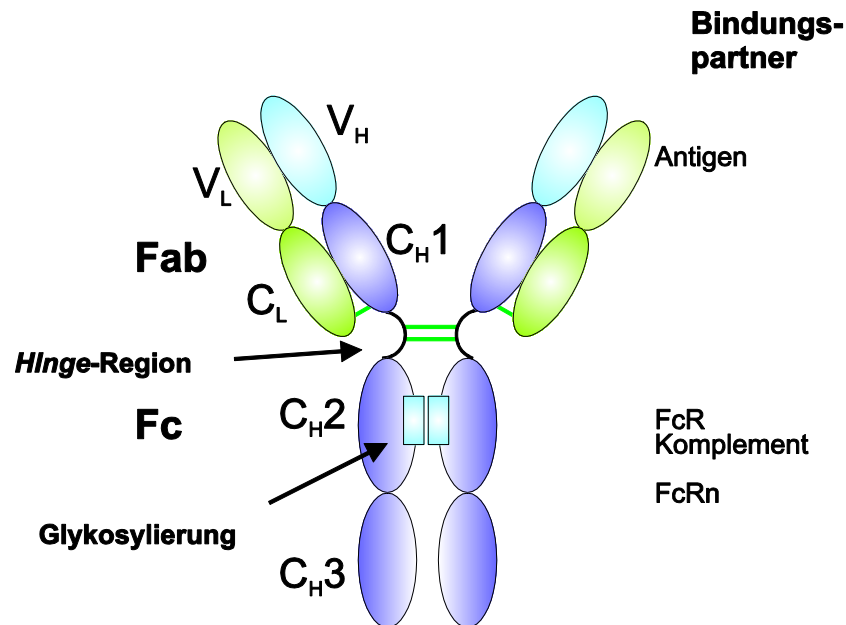


Abbildung 1.1: IgG Antikörperstruktur. Der IgG-Antikörper besteht aus zwei leichten und zwei schweren Ketten. Die variable Region ist für die Bindung an das Antigen zuständig, und setzt sich aus der V_L und V_H Struktur zusammen. Der konstante Teil besitzt je zwei C_H1-3 Strukturen sowie zwei C_L Strukturen. Hier können Fc-Rezeptoren und Komplement binden. Die Hinge-Region trennt den Fab-Teil vom Fc-Teil.

Die einzelnen Domänen der schweren und die leichten Ketten bestehen aus je zwei antiparallelen β -Faltblättern, welche durch eine konservierte Disulfidbrücke zusammengehalten werden. Durch diese Ig Domänen kommt es zu einem modularen Aufbau des Antikörpermoleküls. Zusätzlich besitzt das Antikörpermolekül eine Hinge-Region, welche die Flexibilität des Moleküls erhöht. Sie trennt den Fab- (Fragment antigen binding) vom Fc-Teil (Fragment crystalline). Die hypervariablen Sequenzen (5-15 AS) im variablen Bereich bilden die complementary-determining regions (CDR). Aufgrund der dreidimensionalen Struktur des Antikörpers lagern sich jeweils die drei CDRs der leichten Kette mit den CDRs der schweren Kette zusammen und interagieren mittels gegenseitiger Komplementarität mit den Aminosäuren der Antigene, welche das Epitop darstellen (Kabat und Wu, 1991). Überdies besitzen humane IgG-Antikörper in ihrem Fc-Teil zwei N-gekoppelte zweifach verzweigte Oligosaccharide (N-linked biantennary oligosaccharides). Die Mehrheit der Oligosaccharide ist dabei core-fukosyliert (Mizuochi et al., 1982).

1.2.2 Antikörperfunktion

In der Therapie zeigen Antikörper ihre Wirkung über verschiedene Mechanismen. Zum einen gibt es den Wirkmechanismus, welcher durch den Fab (Fragment antigen binding) Anteil ausgelöst wird (direkte Effekte). So binden Ak spezifisch an Strukturen auf der Oberfläche von Viren, Bakterien und Toxinen. Durch die Antigen-Antikörper Bindung kommt es zur Neutralisierung, welche das Eindringen der Pathogene in die Zielzelle verhindert. Überdies

kann es aber auch zur Blockade von Oberflächenrezeptoren kommen, wodurch Liganden nicht mehr binden können. Ferner kann der therapeutische Antikörper aber auch direkt den Liganden binden. Diese Funktionen sind insbesondere in der Tumortherapie von Bedeutung. Durch Bindung können Signalwege aktiviert oder auch inhibiert werden. Dies wiederum hat beispielsweise Einfluss auf das Zellwachstum. Des Weiteren können hierdurch Zellinteraktionen mit der extrazellulären Matrix und anderen Zellen beeinflusst werden (Abb. 1.2). Trastuzumab (Herceptin®) verhindert die Bindung von Liganden an Her2/neu. Hierdurch kommt es zur Verhinderung der wachstumsfördernden Signale und somit zur Proliferationsinhibition der Tumorzelle (Harries und Smith, 2002). Über die Inhibition der Proliferation durch Blockieren des EGFR (epidermal-growth-factor-receptor), wirken Cetuximab (Erbix®) und Panitumumab (Vectibix®). Bevacizumab (Avastin®) bindet an den VEGF-Rezeptor (vascular-endothelial-growth-factor-receptor) und verhindert dadurch die Bindung von VEGF. Dieser monoklonale Antikörper (mAk) wirkt anti-angiogenetisch und verhindert somit die Neubildung von Blutgefäßen zur Versorgung des Tumors.

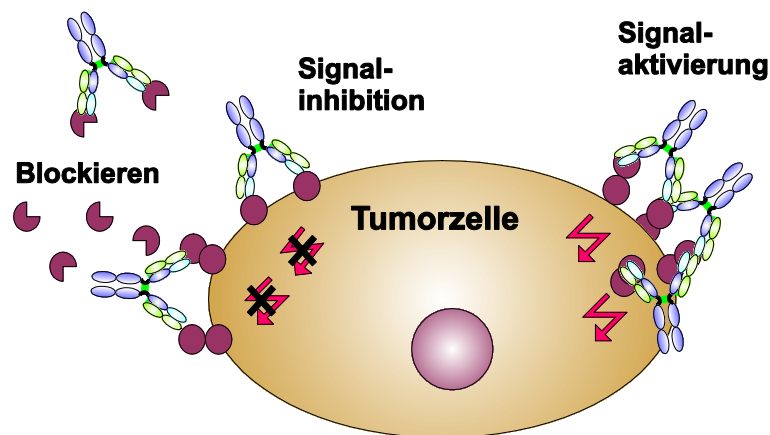


Abbildung 1.2: Direkte Wirkmechanismen therapeutischer Ak. Antikörper können Tumorzellen direkt bekämpfen, indem sie Wachstumsfaktoren, Zytokine oder andere Moleküle an der Bindung an ihre Rezeptoren hindern, oder die Rezeptoren selbst blockieren. Darüber hinaus kann auch die Zell-Zell-Interaktion durch Blockierung des Rezeptors bzw. des membranständigen Liganden verhindert werden. Ak können Kreuzvernetzung von Rezeptoren vermitteln und dadurch anti-proliferative oder pro-apoptische Signale in der Zelle auslösen.

Die volle Wirkung der Ak wird aber erst durch den Fc-Teil ausgelöst. Diese werden als indirekte Effekte bezeichnet (Abb. 1.3). Nach Bindung an das Antigen können zwei Wirkmechanismen zur Eliminierung des infektiösen Materials bzw. der Tumorzellen ausgelöst werden.

Die Opsonisierung der antikörpermarkierten Pathogene erfolgt durch Makrophagen und Neutrophile. Diese Effektorzellen tragen isotypspezifische Rezeptoren, die mit den konstanten Antikörperdomänen interagieren. Durch die Interaktion kommt es zur Aktivierung der Effektorzellen und schließlich zur Phagozytose und Eliminierung des Pathogens/der

Tumorzelle. Aber auch natürliche Killerzellen (NK-Zellen) können über die Interaktion des Fc-Teils mit ihren FcγRIII-Rezeptoren (CD16) aktiviert werden. Es kommt dabei zu einer Ausschüttung toxischer Substanzen, darunter proteolytische und DNA-abbauende Enzyme sowie porenformende Proteine. Diesen Vorgang nennt man Antikörper-abhängige-zelluläre-Zytotoxizität (antibody-dependent-cellular-cytotoxicity; ADCC) (Iannello und Ahmad, 2005).

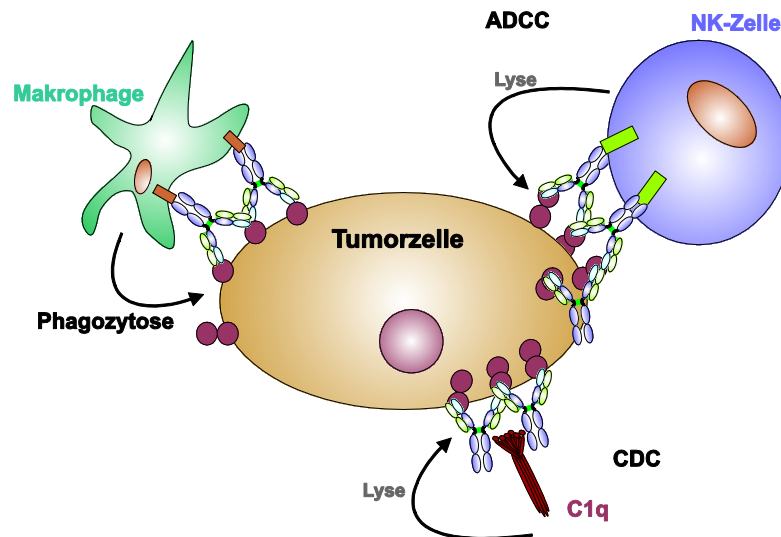


Abbildung 1.3: Indirekte Wirkmechanismen therapeutischer Antikörper. Ak opsonieren Tumorzellen durch Bindung an ihr Zielantigen. Gebundene Antikörper vermitteln Effektorfunktionen wie Phagozytose durch Makrophagen. Auch kann durch Bindung von C1q an die Antikörper, die Komplementkaskade aktiviert werden. CDC: Komplement-abhängige Zytotoxizität; ADCC: Antikörper-abhängige zelluläre Zytotoxizität.

Ferner kann sich der Komplementfaktor C1q an die Fc-Region der Antikörper anlagern und Komplement-abhängige Zytotoxizität (complement-dependent cytotoxicity; CDC) auslösen. Als Folge der proteolytischen Komplementkaskade wird der sogenannte membrane-attack complex (MAC) ausgebildet, der die Lyse der Antikörper-beladenen Zelle vermittelt. C3b, welches im Laufe dieser Reaktionen gebildet wird, wirkt opsonisierend, indem es über die C3b-Rezeptoren Makrophagen oder NK-Zellen rekrutiert, die dann die Fremdkörper phagozytieren.

1.2.3 Das Fc-Rezeptor System

Für monoklonale Antikörper (mAk) konnten verschiedene Wirkmechanismen mit Auslösung der Apoptose von Tumorzellen, der Inhibition oder Aktivierung spezifischer Signalwege und der Blockierung von Rezeptoren und Liganden beschrieben werden (u.a. für Cetuximab, Panitumumab, Rituximab). Unter anderem zeigen Studien mit Bevacuzumab, ein mAk gegen VEGF-A, dass eine Therapie alle VEGF-A Isoformen neutralisiert, und somit zur Hemmung der Tumorangiogenese führt (Gerber et al., 2007). Ebenso leitet ein anti-Fas Antikörper die Apoptose in CD95+ Zellen ein (Debatin und Kramer, 1995). Trotz dieser nachweisbaren

Funktionalitäten werden den bislang zugelassenen therapeutischen Antikörpern die wirksamsten Effekte durch die Fc-vermittelten Funktionen zugeschrieben. Die klinische Bedeutung von CDC wird hierbei kontrovers diskutiert (Manches et al., 2003; Weng und Levy, 2001). Hingegen ist die klinische Relevanz für die ADCC-Funktion der therapeutischen Ak nachgewiesen (Nimmerjahn und Ravetch, 2007).

Es gibt zwei funktionelle Klassen von Fc-Rezeptoren. So können aktivierende Rezeptoren (ITAM; immunoreceptor tyrosine-based activation motif) durch eine Tyrosin-abhängige Signalkaskade Zellen aktivieren. Zu dieser Gruppe gehören die humanen FcγRIA, FcγRIIA und FcγRIIIA und deren Mausortholog FcγRI, FcγRIII und FcγRIV. Der inhibierende Rezeptor (ITIM; immunoreceptor tyrosine-based inhibition motif) FcγRIIB führt nach Interaktion zu inhibitorischen Effekten (Ravetch und Lanier, 2000).

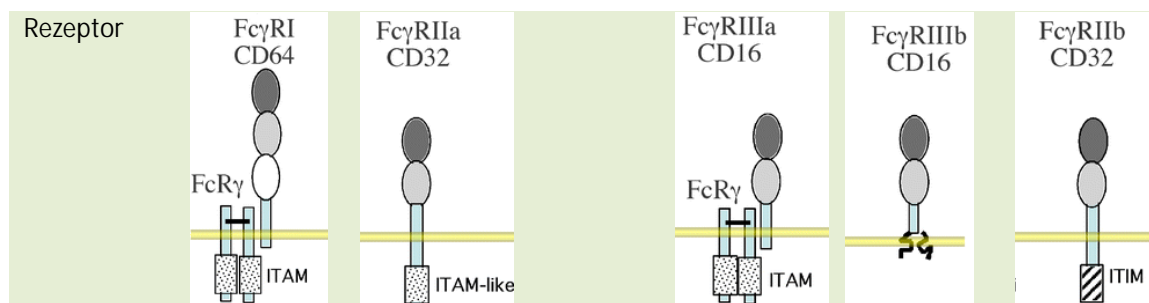
FcRs befinden sich auf hämatopoetischen Zellen wie Makrophagen, Neutrophile, NK-Zellen, Mastzellen, B-Zellen und dendritische Zellen (DC). Mit Ausnahme von NK-Zellen und B-Zellen sind inhibitorische und aktivierende Rezeptoren gleichzeitig auf diesen Zellen co-exprimiert. Durch das Verhältnis kann die Zellaktivierung reguliert werden. Auf B-Zellen befinden sich nur inhibitorische FcγRIIB Rezeptoren, weshalb sie im Hinblick auf die antikörperaktivierenden Eigenschaften uninteressant sind. NK-Zellen exprimieren nur den FcγRIII Rezeptor. In der Tabelle 1.2 sind die funktionellen Eigenschaften von humanen und murinen Fcγ Rezeptoren zusammengefasst.

Unter normalen Bedingungen dominiert der inhibitorische Rezeptor entweder durch die Quantität der Rezeptoren, oder durch seine hohe Affinität zu monomeren Antikörpern. Dies verhindert unspezifische Reaktionen des Immunsystems. Durch die Bindung der therapeutischen Ak an die Tumorzelle kommt es zur Ausbildung eines Immunkomplexes (immune complex; IC). Nur dieser kann an die schwach affinen aktivierenden Rezeptoren binden und dadurch ADCC und Phagozytose auslösen. Daher ist die Effektivität der Immunantwort sehr stark vom Isotyp des Antikörpers abhängig. Die Ausnahme bildet FcγRI, welcher neben ICs mit gleicher Affinität monomere Ak binden kann. Dadurch kommt es schon vor der Bildung von ICs zur Abdeckung des Rezeptors mit monomeren IgG wodurch keine Anti-Tumorantwort mehr ausgelöst werden kann (Clynes et al., 2000; Hamaguchi et al., 2006; Nimmerjahn und Ravetch, 2005). Dennoch berichten einige Forscher über einen aktiven Effekt in der Antikörper-induzierten Krebstherapie durch den FcγRI (Barnes et al., 2002; Bevaart et al., 2006). Der inhibitorische FcγRIIB hat zusätzlich eine Bedeutung bei der Präsentation von Immunkomplexen auf dendritischen Zellen. DCs können über den inhibitorischen Rezeptor IC-Komplexe erkennen, internalisieren und somit B-Zellen zur Aktivierung präsentieren (Bergtold

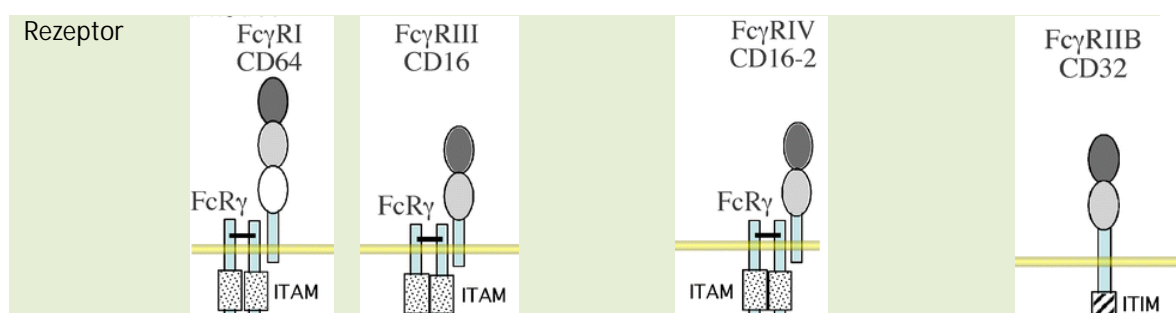
et al., 2005). Durch eine Bindung von IC-Komplexen an aktivierende Rezeptoren der DCs hingegen kommt es nach Internalisierung zur Aktivierung von zytotoxischen T-Zellen (Boruchov et al., 2005).

Tabelle 1.2 **Humane und murine Fcγ-Rezeptoren.**

Klasse (Human)	FcγRI (CD64)	FcγRIIa (CD32)	FcγRIIc (CD32)	FcγRIIIa (CD16)	FcγRIIIb (CD16)	FcγRIIb (CD32)
Ligand	IgG1=3>4 (monomerisch)	IgG3>1=2		IgG1=3>>>2=4	IgG1=3>>>2=4	IgG3>1>>2>4
Affinität	hoch	gering	gering	mittel	gering	gering
Signalmotif	ITAM	ITAM ähnlich	ITAM ähnlich	ITAM	(-GPI)	ITIM
Expression	Mo/Mac, DC, Neu (stim), Eo (stim)	Mo/Mac, DC, Neu, Tb, Langerhans	Mo/Mac, Neu, B	NK, Mo/Mac, DC, T,	Neu und Eo (stim)	Mo/Mac, B, DC, Neu



Klasse (Maus)	FcγRI	FcγRIII	FcγRIV	FcγRIIb
Ligand	IgG2a>>1,2b,3 (monomerisch)	IgG1=2a=2b>>3	IgG2a= IgG2b	IgG1=IgG2a= IgG2b>>IgG3
Affinität	hoch	gering	mittel	gering
Signalmotif	ITAM	ITAM	ITAM	ITIM
Expression	Mo/Mac, DC, Neu (stim), Eo (stim)	NK, Mo/Mac, DC, T,	Mo/Mac, Neu, DC	Mo/Mac, B, DC, Neu



ITAM immunoreceptor tyrosine-based activating motif; ITIM immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motif; MO Momozyten; Mac Makrophagen, NK natürliche Killerzellen; DC dendritische Zellen; T T-Zellen; B B-Zellen; Tb Trombozyten; Neu Neutrophile; Eo Eosinophile.

Abhängig vom Effektorzelltyp und dem verwendeten Antikörperisotyp können die Therapieeffekte variieren. Murine IgG2a und IgG2b greifen effektiver in die Immunabwehr (u.a. Pathogenabwehr, Tumorlyse) ein als IgG1 oder IgG3. Der Grund hierfür sind die unterschiedlichen Affinitäten zu den Fcγ-Rezeptoren. So konnte eine IgG1 Aktivität nur in

Verbindung mit Fc γ RIII/Fc γ RIIB nachgewiesen werden. Durch die hohe Affinität von IgG1 zu Fc γ RIIB ist die Aktivierung von Effektorzellen sehr gering. IgG2a und IgG2b Aktivität hingegen ist im Besonderen von Fc γ RIV/Fc γ RIIB abhängig (Nimmerjahn und Ravetch, 2005). Abhängig von der Tumor- und der Antikörpermenge wirkt auch der hochaffine Fc γ RI in der IgG2a Aktivierung mit (Bevaart et al., 2006). IgG2a und IgG2b sind weniger durch Fc γ RIIB reguliert, und wirken somit effektiver. Besonders interessant ist auch die Erkenntnis, dass der Einfluss der NK-Zellen im Hinblick auf ADCC-Effekte limitiert ist. Murine NK-Zellen besitzen weder den inhibierenden Fc γ RIIB noch den aktivierenden Fc γ RIV, welche für ein effektives Zusammenspiel in der antikörperabhängigen Zytotoxizität nötig sind. Daher sind höchstwahrscheinlich Makrophagen durch ihre Rezeptorexpression von Fc γ RIIB und Fc γ RIV die bedeutendsten Effektorzellen für die ADCC-Funktion (Nimmerjahn und Ravetch, 2007).

Im Menschen sind IgG1 und IgG3 die am stärksten inflammatorischen Isotypen. Sie zeigen eine stärkere Interaktion mit den Fc γ Rs wie IgG2 oder IgG4. Insbesondere binden sie an dem hochaffinen Fc γ RI und Fc γ RIIIA, wohingegen IgG2 und IgG4 Fc γ RIIA und Fc γ RIIB binden.

1.2.4 Modifikationen von Antikörpern

Neben der Humanisierung von therapeutischen Antikörpern zur Vermeidung der Immunogenitäten gibt es noch zusätzliche Möglichkeiten, über die Antikörperstruktur die Effektivität des Antikörpers zu verbessern (Abb. 1.4). Durch eine höhere Affinität zu aktivierenden Fc γ -Rezeptoren führen Therapien mit humanem IgG1 und IgG3 Isotypen bzw. murinen Orthologen IgG2a und IgG2b zu einer verbesserten, gegen den Tumor gerichteten, Antwort. Die Affinität vom Fc-Teil kann überdies durch eine veränderte Glykosylierungsstruktur zusätzlich erhöht werden. Dies ist besonders wichtig bei der Herstellung rekombinanter Antikörper. Die Interaktion von Fc-Rezeptoren mit IgG Antikörpern findet an der C_H2 und C_H3 Domäne des konstanten Teils des Antikörpers statt. Diese Domänen bilden eine Hufeisenstruktur, in deren Zentrum die Zuckerreste liegen, welche am Asparagin (Asn-297) N-glykosyliert vorliegen. Veränderungen in der Zusammensetzung der Zuckerstrukturen können zu Konformationsänderungen des Antikörpers und somit zu einer veränderten Affinität zum Rezeptor führen (Jefferis et al., 1998). Die Abwesenheit von Fukose am N-Acetylglukosamin führt mit einem humanen IgG1-Antikörper gegen Her2/neu zu einer 50-fachen Erhöhung der Affinität zu Fc γ RIIIA und folglich zu einer 50-fachen Erhöhung der ADCC-Aktivität in vitro (Shields et al., 2002). Ebenso korreliert ein hoher Gehalt an Sialinsäure mit einem reduzierten ADCC-Effekt bei der Rituximab-Anwendung (Scallon et al., 2007). Glykosylierungsstrukturen können insbesondere von der Wahl der Expressionszelle abhängen, in der der Ak hergestellt wird. Somit können indirekt über Modifikationen am

Expressionssystem die Antikörpereffekte beeinflusst werden. Um die gewünschte Glykosylierung der rekombinant exprimierten Ak zu erhalten, wurde die Expression von Glykosyltransferasen beeinflusst. Daraus resultierende Veränderungen im Gehalt an Galaktose, Fucose, Sialinsäure oder bisecting N-Acetylglucosamin (GlcNAc) zeigten Auswirkungen auf die Vermittlung von Effektorfunktionen (Davies et al., 2001; Kumpel et al., 1994; Schuster et al., 2005; Shields et al., 2002; Shinkawa et al., 2003). Die Modifikation betrifft insbesondere zwei Enzyme, wobei das Resultat bei beiden Veränderungen zu einem unfukosylierter Antikörper führt. Eine Überexpression von **β 1-4** N-Acetylglucosaminyl-Transferase-III (**β 1-4 GnTIII**) katalysiert das Anfügen von GlcNAc zwischen die Verzweigungsstelle (bisecting). Durch dieses Produkt wird die **α 1-6** Fucosyl-Transferase gehemmt, wodurch ein nicht-fukosylierter Ak entsteht (Ferrara et al., 2006). Die derart modifizierten Rituximab mAks zeigten in ADCC-Versuchen eine gesteigerte Lyse (Davies et al., 2001; Umana et al., 1999). Zusätzlich wurden auch CHO Zelllinien verwendet, bei denen das FucT8 Gen ausgeschaltet wurde (knock-out). Diese Zellen besitzen somit keine **α 1-6** Fucosyltransferase (**α 1-6 FucT**) und bilden folglich nur unfukosylierte Antikörper. Ein CD20 Antikörper, welcher in diesem System produziert wurde, zeigte aufgrund des Fucosemangels eine 100-fach gesteigerte ADCC-Aktivität (Schuster et al., 2005). Das Fehlen der Fucose am Oligosaccharid führt zu einer verstärkten Affinität des Antikörpers zum Fc γ RIIIa (Iida et al., 2006). Durch Modifikationen in der Oligosaccharidzusammensetzung können auch die CDC-Effekte eines Antikörpers beeinflusst werden. So zeigte ein modifizierter Alemtuzumab ohne endständige Galaktosemoleküle reduzierte CDC-Effekte (Boyd et al., 1995).

Neben der Glykosylierungsstruktur haben auch weitere Aminosäuren in der C_{H2} Region Einfluss auf die Konformität (u.a. Asp265, Asp270, Ala327, Pro329 und Lys338). Mutationsanalysen in diesem Bereich führten zur Veränderung der Affinität des Antikörpers. So resultierten dreier Substitutionen von Aminosäuren in Rituximab, Cetuzimab und Trastuzumab in vitro zu einer erhöhten Affinität zu Fc γ RIIIA, aber nicht zu Fc γ RIIB, und daraus resultierend zu einer verstärkten ADCC-Funktion (Shields et al., 2001). Zusätzlich können Substitutionen im Fc-Teil von humanen IgG1 und IgG3 auch Einfluss auf die Komplementaktivierung nehmen (Liu et al., 2008). Ferner kann die Bindung an den neonatale **Fc γ** -Rezeptor (FcRn) beeinflusst werden, welcher die Konzentration der Antikörper im Serum beeinflussen kann. IgG, welche nicht an FcRn binden, werden lysosomal degradiert. Durch eine Verbesserung der Bindung an FcRns kann also die Halbwertszeit der Antikörper im Organismus erhöht werden, wodurch die Wirkzeit verlängert und somit deren Therapieeffekt verbessert wird (Liu et al., 2008). Im Gegensatz dazu ist bei immunkonjugierten Antikörpern keine Verlängerung der Halbwertszeit erwünscht. Vielmehr wird hier eine verkürzte

Verweildauer bevorzugt, um die Nebenwirkungen zu minimieren. Durch eine verkürzte Form des Fc-Teils wird die FcRn-Interaktion vermieden, welches zu einer niedrigeren Verweildauer im Körper führt (Adams et al., 2004; Olafsen et al., 2005). Somit kann die Halbwertszeit auf weniger als 30 Stunden verkürzt werden. Insbesondere eignen sich hierfür Minibodies, F(ab)₂ oder um C_{H2} verkürzte Antikörper. scFv und Fab sind durch ihr geringes Molekulargewicht (<70 kDa) nierengängig und werden daher zu schnell ausgeschieden (Brouwers et al., 2004; Burvenich et al., 2007).

Durch eine Konjugation des Antikörpers kann eine gezielte Wirkung des Konjugats direkt am Tumor erfolgen. Hierbei dient der Antikörper als Vehikel. Über die Möglichkeit der gezielten Tumorthherapie durch Radionukleotide und Zytostatika können Nebenwirkungen vermieden werden, sowie die Menge des verwendeten Toxins auf ein Minimum reduziert werden. Radioimmunkonjugate stellen dabei die am weitesten entwickelte Gruppe dar. Diese Ak werden nicht nur in der Tumordiagnostik (PET Imaging) verwendet, sondern zeigen auch in der Therapie gute Erfolge. Bei der Behandlung mit radioaktiven Isotopen z.B. ¹³¹Iod- oder ⁹⁰Yttrium- gekoppelten Antikörpern ist keine Internalisierung des Antigens notwendig. Besonders bei heterogenen Tumoren ist diese Behandlung besonders wirksam. Durch die Strahlung werden auch Tumorzellen therapiert, welche das Zielantigen nicht exprimieren, sich aber in direkter Nachbarschaft befinden. Von der FDA sind bisher nur ¹³¹I-Tositumomab und ⁹⁰Y-Ibritumomab zugelassen, welche gekoppelte CD20 Ak sind. Die Lymphom-Patienten zeigten hohe Ansprechraten, obwohl sie bereits gegen Chemotherapie refraktär waren (Davis et al., 2004; Witzig et al., 2002). Ferner können aber auch Chemotherapeutika gekoppelt werden (Wu und Senter, 2005). Der Gemtuzumab-Ozogamycin (anti-CD33) mAk Myotarg® ist im Jahr 2000 für die Therapie rezidivierter AML Patienten von der FDA zugelassen worden (Bross et al., 2001). Myotarg® ist ein Immunkonjugat, welches aus einem bakteriellen Toxin und einem humanisierten CD33 mAk besteht. Durch Bindung an das Zielantigen kommt es zur Internalisierung des Komplexes. In der EU wurde jedoch eine Zulassung 2008 aufgrund des ungünstigen Nutzen-Risiko-Verhältnisses abgelehnt. Zusätzlich werden aber auch indirekte Kopplungsmechanismen untersucht. Über die ADEPT-Methode (antibody-directed enzyme prodrug therapy) wird ein enzymgekoppelter Antikörper an den Tumorherd gebracht. Im Anschluss wird ein Protoxin gespritzt, welches am Tumor mithilfe des Enzyms aktiviert wird. Für diese Anwendung laufen erste klinische Studien. Außerdem werden Kopplungen mit Immuntoxinen wie Ricin A, Diphtherietoxin und Pseudomonas Exotoxin-A (ETA) untersucht. Nach Internalisierung des Immuntoxins greifen sie meist in die Protein-Biosynthese ein und induzieren darüber Apoptose. Um weit größere Mengen an Zytostatika oder giftige Toxine zum Tumor zu transportieren, werden gefüllte Liposomen an die Antikörper gekoppelt. Über

Endozytose werden die Liposomen vom Tumor aufgenommen. Auch die Kopplung von Zytokinen an Antikörper zeigte durch das lokal begrenzte Auslösen von Immunreaktionen potente Effekte.

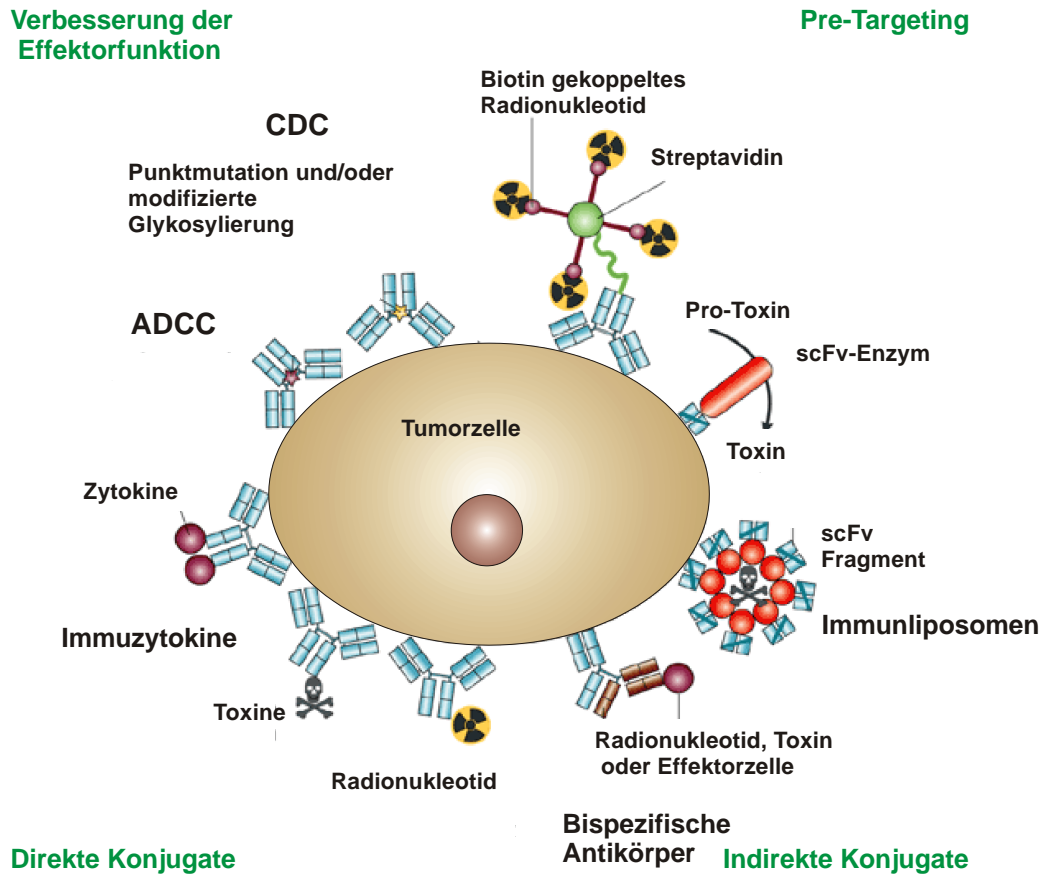


Abbildung 1.4: Strategien zur Verbesserung der Antikörperwirkung. Es gibt verschiedene Möglichkeiten, die Antikörperwirkungen zu verbessern. Dies betrifft insbesondere die ADCC- und CDC-Funktion des mAk durch Modifizierungen der Glykosylierung oder Punktmutationen im Fc-Teil. Direkte Konjugation der Ak mit Toxinen oder Radionukleotiden kann zur direkten Abtötung der Zelle führen. Durch Zytokin-konjugate können Effektorzellen angezogen werden. Auch durch indirekte Konjugate können mit Hilfe von bispezifischen mAk Effektorzellen angelockt werden. Zusätzlich können auch scFv gebundene Liposomen verwendet werden, welche Toxine in die Tumorzelle transportieren können. Aber auch Vorstufen von Toxinen können an mAk gebunden werden. Durch enzymatische Spaltung kann das aktive Toxin direkt am Tumor wirken. Angelehnt an (Carter, 2001).

Weitere Formen von modifizierten mAk stellen die bispezifischen Antikörper (bsAk) dar. Derartige Antikörper besitzen zwei unterschiedliche Bindungsspezifitäten innerhalb eines Moleküls und sind somit in der Lage, zwei Zielmoleküle miteinander zu verbinden. Durch ihre Bindung an tumorassoziierte Antigene können sie im Tumor durch zusätzliche Bindung von Effektorzellen über die zweite Antigenbindungsstelle zytotoxisch auf die Tumorzelle wirken. Ein erster bispezifischer mAk (Catumaxomab/Removab®) ist kürzlich von der FDA zugelassen worden (Shen und Zhu, 2008). Dieser trifunktionelle bispezifische mAk kombiniert einen anti-EpCAM (epithelial cell adhesion molecule) mit einem anti-CD3 (T-Lymphozyten spezifisch)

Antikörper. Er wird zur intravenösen und intraperitonealen Behandlung des malignen Aszites bei Ovarialkarzinomen verwendet. In aktuellen klinischen Studien wird auch seine Wirksamkeit bei Aszitesbildung beim Kolonkarzinom, sowie Pleuraergüssen beim Mammakarzinom untersucht.

1.2.5 Herstellung therapeutischer Antikörper

1.2.5.1 Hybridomzelltechnik

Das therapeutische Potential von Antikörpern als „Wundermittel“ (magic bullets) wurde von Paul Ehrlich bereits 1908 beschrieben. Die klassische Methode zur Herstellung von Antikörpern beruht auf der Immunisierung von Versuchstieren. 1975 gelang Köhler und Milstein der Durchbruch in der Herstellung von monoklonalen Antikörpern mit der Hybridomtechnologie (Kohler und Milstein, 1975). Nach Entwicklung einer Immunantwort im Versuchstier werden die B-Lymphozyten in vitro mit Myelomzellen fusioniert. Die so gewonnenen Hybridomzellen produzieren mAk in unbegrenzter Menge. Der Anti-CD3 Antikörper (Muromonab-CD3) ist ein mAk der ersten Generation, der mit dieser Technik hergestellt wurde. Er wird zur Therapie der akuten Transplantationsabstoßung eingesetzt und wurde als erster mAk für die Behandlung beim Menschen zugelassen.

Eine Antikörpertherapie mit murinen mAk stellte sich als problematisch heraus, da das Immunsystem eines Patienten innerhalb weniger Tage nach der Verabreichung dieser Antikörper humane anti-Maus-Antikörper bildet (HAMA-Immunantwort). Bei wiederholter Behandlung führt die Bildung von humanen Antikörpern gegen die therapeutischen Mausantikörper zur Blockade und zur Neutralisation der therapeutischen mAk, sodass es in wenigen Stunden zur Eliminierung des Antikörpers aus der Zirkulation kommt. Als Folge bleibt die Behandlung unwirksam, bzw. kann es sogar zu hypersensitiven Reaktionen kommen.

1.2.5.2 Rekombinante Antikörper

Rekombinante mAk sind gentechnologisch hergestellte Antikörper. Zunächst wurden hierfür vorhandene mAk verwendet, welche durch Mutationen in ihren molekularen Eigenschaften (z.B. zur Humanisierung oder zur Funktionsverbesserung) verändert wurden, und in heterologen Expressionssystemen produziert werden konnten. In den neunziger Jahren konnten zusätzlich Methoden etabliert werden, welche die Selektion der spezifischen Antigenbindestellen vollständig in vitro ermöglichen (Phagen-Display Methode). Die Polypeptidketten von Antikörpern und ihren Fragmenten können an andere Proteine gekoppelt werden, indem man beide Gene fusioniert und anschließend rekombinant exprimiert. Dies führt zu einer großen Vielfalt an rekombinanten Antikörpervariationen.

Chimäre Antikörper besitzen einen humanen konstanten Teil und einen murinen variablen Teil zur Antigenerkennung (Morrison et al., 1984). Durch die Verwendung chimärer mAk sollten die zuvor beschriebenen HAMA-Effekte verhindert werden. Doch auch gegen den murinen variablen Bereich können sogenannte Anti-Idiotyp Antikörper im humanen Organismus gebildet werden. Verschiedene chimäre mAk wie z.B. Rituximab oder Cetuximab induzieren selten Anti-Antikörper. Im Gegensatz dazu werden HAMA aber in bis zu 61% der Patienten gefunden, welche mit dem chimären mAk Infliximab therapiert wurden (Anderson et al., 2005). Die Bildung von HAMA bleibt deshalb trotz der Etablierung von chimären monoklonalen Antikörpern ein potentiell signifikantes Problem, welches eine ständige Kontrolle, oder auch unter gewissen Umständen eine Therapie mit Cortikosteroiden nötig werden lässt.

Als konsequente Weiterentwicklung folgte daher die Herstellung humanisierter Antikörper. Humanisierte mAk besitzen einen konstanten humanen Teil und zusätzlich ist der variable Teil zu 90% durch humane Sequenzen ersetzt, sodass nur noch die CDR-Region aus Mauskomponenten besteht (Jones et al., 1986) (Abb. 1.5). Die Aminosäuresequenzen zwischen den CDR tragen aber in vielen Fällen zur Antikörperaffinität bei. Um eine ausreichende Affinität verschiedener humanisierter mAk zu gewährleisten, war es daher nötig, weitere murine Sequenzen auch zwischen den CDR zu erhalten. Die Immunogenität durch HAMA, welche bei der Anwendung von chimären Antikörpern auch auftreten konnte, wurde weitgehend durch eine Humanisierung verhindert. Problematisch bleibt aber weiterhin die Sensibilisierung der Patienten. Durch die Anwendung der humanisierten mAk können HAHA (Human-anti-human Antikörper) Reaktionen induziert werden. Eine geringe Inzidenz konnte hier bei der Therapie mit Alemtuzumab (1,9%) und Transtuzumab (0,1%) nachgewiesen werden. Stärkere Reaktionen wurden aber mit Daclizumab mit 34% detektiert (Weiner, 2006).

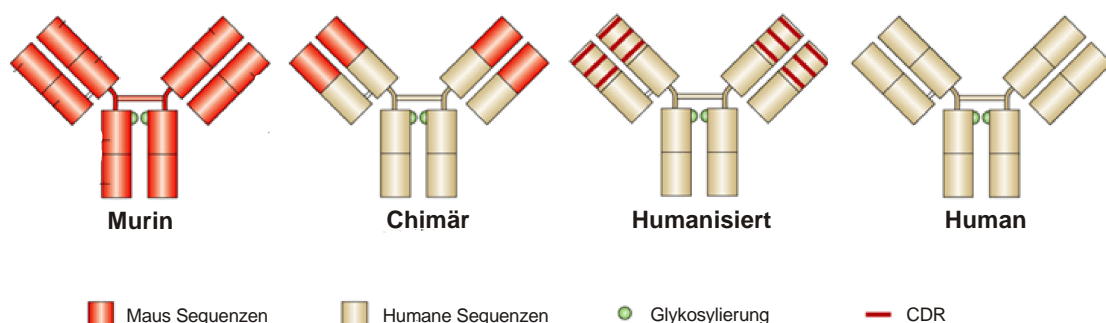


Abbildung 1.5: Rekombinante monoklonale Antikörper. Sequenzen der Maus sind rot dargestellt, humane Anteile braun. Angelehnt an (Carter, 2001).

Um eine Sensibilisierung der Patienten vollkommen zu vermeiden, werden derzeit voll humane Antikörper etabliert. Die Entwicklung kann hierbei auf verschiedenen Wegen

erfolgen. Im Hinblick auf die ursprüngliche Hybridomtechnologie beschäftigten sich erste Studien mit der Entwicklung von humanen Hybridomzellen. Die Etablierung dieser Methode erwies sich jedoch als schwierig. Der Austausch der Maus B-Zellen mit humanen B-Zellen führte zu einer schwachen Fusionsreaktion mit humanen Myelomzellen und die resultierenden Hybridomzellen waren instabil und produzierten nur sehr geringe Antikörpermengen. Des Weiteren ist der Zugang zu menschlichen B-Zellen limitiert. Auch die Nutzung von sogenannten Heteromyelomen (Human-Maus chimäre Myelomzellen) hat sich nicht durchsetzen können (Funaro et al., 1996). Die Herstellung der Immunisierung ist *in vitro* noch nicht möglich, da durch das Fehlen der Affinitätsentwicklung keine „zweite Antwort“ entstehen kann. Die Technik der Immortalisierung von humanen Memory B-Lymphozyten durch einen Epstein-Barr Virus (EBV) ist schon seit 30 Jahren bekannt. Doch auch hier ist die Ausbeute an produzierenden Zellen sehr gering und im Laufe des Kultivierungsprozesses kommt es häufig zu Veränderungen der Antikörperspezifität (Kozbor und Roder, 1981). In den letzten Jahren wurde diese Methode aber wieder aufgegriffen. So berichten (Lanzavecchia et al., 2007), dass durch eine Modifizierung dieser Methode erfolgreich humane mAk gegen SARS und H5N1 Influenza Viren entwickelt werden können.

Ein erster Fortschritt in der Produktion humaner Antikörper gelang durch die Erzeugung von transgenen Mäusen. Hierbei wurden immundefiziente Mäuse (SCID; severe combined immune deficiency) mit humanem fetalem Gewebe rekonstruiert (Green et al., 1994). So wurden Mäuse hergestellt, deren eigener Immunglobulin-Genlocus inaktiviert und durch maßgebliche Teile des humanen Immunglobulin-Genlocus ersetzt wurde (Jakobovits, 1995). Durch Immunisierung dieser Mäuse werden humane Antikörper generiert. Ähnlich wie bei der Hybridomtechnik können anschließend die antikörperproduzierenden B-Zellen selektiert und durch Fusion immortalisiert werden. Allerdings beruht dieses System auf herkömmlicher Immunisierung. Somit ist die Herstellung von Antikörpern gegen wenig immunogene, toxische oder hochpathogene Antigene damit kaum möglich. Neueste Fortschritte können jedoch durch eine *in vitro* Methode erzielt werden. Mit Hilfe der Phagen-Display Methode werden heutzutage die meisten humanen mAk hergestellt (Barbas et al., 1991; Breitling et al., 1991). Humira® ist einer der ersten Antikörper, welcher mit Hilfe dieser Methode hergestellt wurde. 2002 wurde er erstmals von der FDA zur Behandlung von chronischen Endzündungskrankheiten wie Morbus Crohn zugelassen. Es werden hierbei verschiedene Antikörperfragmente der variablen Region auf den Oberflächen von Phagen exprimiert. Anschließend erfolgt die Selektion des spezifischen Phagen, welcher die passende Antikörperregion präsentiert, über eine Antigen-Antikörperreaktion. Aus dem so selektierten, "monoklonalen" Antikörper-Phagen können die zugehörigen Antikörpergene

einfach isoliert und sequenziert werden. Im Anschluss kann dann über Klonierungsschritte der Antikörper generiert und in Expressionssystemen produziert werden.

1.3 Das Ovarialkarzinom

1.3.1 Epidemiologie

Das Ovarialkarzinom stellt eine bösartige Neoplasie des Epithels der ovariellen Oberfläche dar. Der Tumor ist in Europa die sechsthäufigste Krebserkrankung bei Frauen. Laut Angaben des Robert Koch Instituts erkranken allein in Deutschland jährlich 9.000 Frauen an Eierstockkrebs. Das durchschnittliche Alter beträgt zum Zeitpunkt der Erkrankung zirka 65 Jahre, doch häufig sind auch jüngere Frauen betroffen. Aktuell stellt das Ovarialkarzinom die Hauptursache der Todesfälle als Folge gynäkologischer Erkrankungen in Deutschland dar. Viele Patientinnen befinden sich aufgrund des zunächst asymptomatischen Verlaufs der Erkrankung zum Zeitpunkt der Diagnosestellung bereits in einem fortgeschrittenen Stadium. Die 5-Jahres-Überlebensprognose beträgt lediglich 30%. Wenn der Tumor im frühen Stadium festgestellt wird, liegen die Heilungschancen bei etwa 90%, jedoch wird ein Ovarialkarzinom nur sehr selten in diesem Stadium diagnostiziert.

1.3.2 Ätiologie

Trotz weitgehend unklarer molekulargenetischer Ätiologie sind zahlreiche epidemiologische Risikofaktoren bekannt. Neben der genetischen Prädisposition (5-10% der Fälle) (Lynch et al., 1993) nimmt die Inzidenz mit steigendem Lebensalter zu und wird durch frühe Menarche und späte Menopause noch begünstigt. Zusätzlich sind Umwelt- und Ernährungsfaktoren (Fleisch und Fett) sowie reproduktive Parameter wie z.B. das Ovulationsalter als Risikofaktoren bekannt. Kinderlose und Spätgebärende haben gegenüber der Normalbevölkerung ein 2,5-fach erhöhtes Risiko, am Ovarialkarzinom zu erkranken. Hingegen erweisen sich orale Kontrazeptiva und häufige Schwangerschaften als protektive Faktoren (Hortsch et al., 2009; Lukanova und Kaaks, 2005).

1.3.3 Histologie, Verlauf und Symptomatik

Fast 90% der primären Ovarialkarzinome sind epithelialen Ursprungs (Bell, 2005; Feeley und Wells, 2001). Man unterscheidet nach dem vorwiegenden Zelltyp seröse (Vorkommen: 40%) von muzinösen (10%), endometrioiden (20%) und Klarzellkarzinomen (5%). Die restlichen 25% sind Mischformen oder nicht-klassifizierbare Karzinome. Eine Klassifizierung in Krankheitsstadien ist nach neuesten Erkenntnissen aufgrund der Reproduzierbarkeit und Definierbarkeit problematisch (Cho und Shih le, 2009). Trotzdem gilt die generelle Einteilung nach FIGO (International Federation of Gynecology and Obstetrics) bis heute. FIGO klassifiziert die Stadien des Ovarialkarzinoms nach den operativen und pathologischen Befunden (Tabelle 1.3).

Tabelle 1.3: FIGO Klassifizierung des Ovarialkarzinoms.

Stadium 0	Carcinoma in situ
Stadium I	Tumor auf das Ausgangsorgan begrenzt
Stadium II	Tumor auf das angrenzende Gewebe ausgebreitet
Stadium III	Ausdehnung bis zum nächsten Organ
Stadium IV	Einbruch in angrenzendes Organ, Fernmetastasen

1.3.4 Therapie und Prognose

Aktuelle Studien zeigen, dass in den letzten Jahren die 5-Jahres-Prognose für Ovarialkarzinom-Patientinnen um ca. 5% verbessert werden konnte ((Jemal et al., 2007). Als Ursache kann die Einführung besserer Therapien gesehen werden. Die heute allgemein akzeptierte Therapie besteht aus tumorreduktiver Operation mit anschließender kombinierter Chemotherapie (Carboplatin und Paclitaxel) (Ozols et al., 2003), sowie Maßnahmen zur Erhaltung der Lebensqualität. Art und Umfang der chirurgischen Therapie hängt vom Tumorstadium ab. Bei der adjuvanten Therapie schafft eine vollständige Entfernung allen Tumorgewebes die Voraussetzung für einen optimalen Wirkungsgrad der Chemotherapie. Durch die späte Diagnose des Ovarialkarzinoms kann der Tumor bei ca. 50% der Patientinnen operativ nicht vollständig entfernt werden. Studien haben gezeigt, dass jedoch bei unvollständiger operativer Entfernung Resttumore kleiner 2 cm mit anschließender chemotherapeutischer Behandlung die besseren Überlebensraten haben (Mutch, 2002). Patientinnen in einem späten Stadium werden häufig nach der neoadjuvanten Therapie behandelt (Park und Kuhn, 2004). Hier erfolgt erst nach der chemotherapeutisch Behandlung die operative Entfernung des Tumors (Berek et al., 1999). Die Erfolge sind mit denen der adjuvanten Therapie vergleichbar (Colombo et al., 2006).

80% der Ovarialkarzinom-Patientinnen sprechen auf eine kombinierte Chemotherapie an, wobei 40-60% der behandelten Patientinnen positive Ergebnisse zeigen (Ozols et al., 2003; Sandercock et al., 2002). Trotzdem erleiden zwei Drittel der Patientinnen ein Rezidiv oder bilden Resistenzen gegen das verwendete Chemotherapeutikum (Greenlee et al., 2001). Daher besteht ein dringender Bedarf an neuen therapeutischen Ansätzen. Neueste Erkenntnisse setzen, aufgrund des heterogenen Auftretens der Tumore, auf eine stärkere individuelle Therapie. Große Hoffnung liegt dabei auf der Molecular Targeted Therapy of Cancer (MTTC). Diese versucht mit Hilfe molekularer Methoden neue Therapieformen zu entwickeln. Inhibitorische Moleküle (small inhibitory molecules), die in intrazelluläre Signalwege der Tumorzellen eingreifen, werden zurzeit in Phase-II-Studien getestet. Hierzu gehören Gefitinib (Iressa®) und Erlotinib (Tarceva®) (Inhibitoren des EGFR), mit denen bei 11 bzw. 44% der

Ovarialkarzinom-Patientinnen eine Stabilisierung der Krankheit in Phase-II-Studien beobachtet werden konnte. Lediglich bei 4% der Patientinnen konnte eine Regression festgestellt werden (Gordon et al., 2005; Schilder et al., 2005). Ferner wird die Wirksamkeit präventiver Tumor-Vakzinierungen untersucht. Auch Antikörpertherapien spielen eine immer grössere Rolle. Einige therapeutische Antikörper haben Phase-II-Studien alleine oder in Kombination mit Chemotherapeutika mit geringen bis mäßigem Erfolgen durchlaufen (Yap et al., 2009). Bevacizumab (Avastin®; Genentech-Roche) ist ein VEGF-A Antikörper, und wird zur anti-angiogenetischen Behandlung verwendet. In Phase-II konnten 25% der behandelten Ovarialkarzinom-Patientinnen einen positiven Erfolg der Therapie verzeichnen. Bei 40% konnte das Fortschreiten der Krankheit über einen längeren Zeitraum verzögert werden (Burger et al., 2007). Problematisch bleiben aber die gastrointestinalen Nebenwirkungen bedingt durch eine Perforation der Darmwand. Des Weiteren beschäftigt sich die Forschung mit der Gentherapie des Ovarialkarzinoms, jedoch bis zur heutigen Zeit nur mit mäßigem Erfolg. Durch das Einbringen von Fremdgenen, wie etwa p53 über Adenoviren, wird versucht, die Zellempfindlichkeit gegenüber Zytostatika zu erhöhen. Adp53 (Advexin®; Introgen) wurde in Phase-III an Patientinnen getestet, konnte aber im Ovarialkarzinom keine besonderen Erfolge erzielen (Zeimet und Marth, 2003).

1.4 Die L1-Rezeptoren der Immunglobulin-Superfamilie

1.4.1 Allgemeines

Aufgrund der Strukturähnlichkeit werden vier Immunglobulin (Ig)-Zelladhäsionsmoleküle dieser Familie zugeordnet. Zu ihnen gehören L1, CHL1 (close homologue of L1), NrCAM (Neuron-glia (Ng) related cell adhesion molecule) und Nfasc (Neurofascin). Sie werden hauptsächlich auf neuronalen Zellen exprimiert sowie auf Zellen während der Entwicklung des Nervensystems. Zusätzlich wurden sie auf einigen nicht-neuronalen Zellen nachgewiesen. Strukturelles Kennzeichen dieser Gruppe sind sechs Ig-Domänen, vier bis fünf Fibronektin Typ III ähnliche (FN-III)-Domänen, ein Transmembranteil und eine hochkonservierte zytoplasmatische Region von ca. 110 Aminosäuren (Hortsch, 1996) (s. Abb. 1.6).

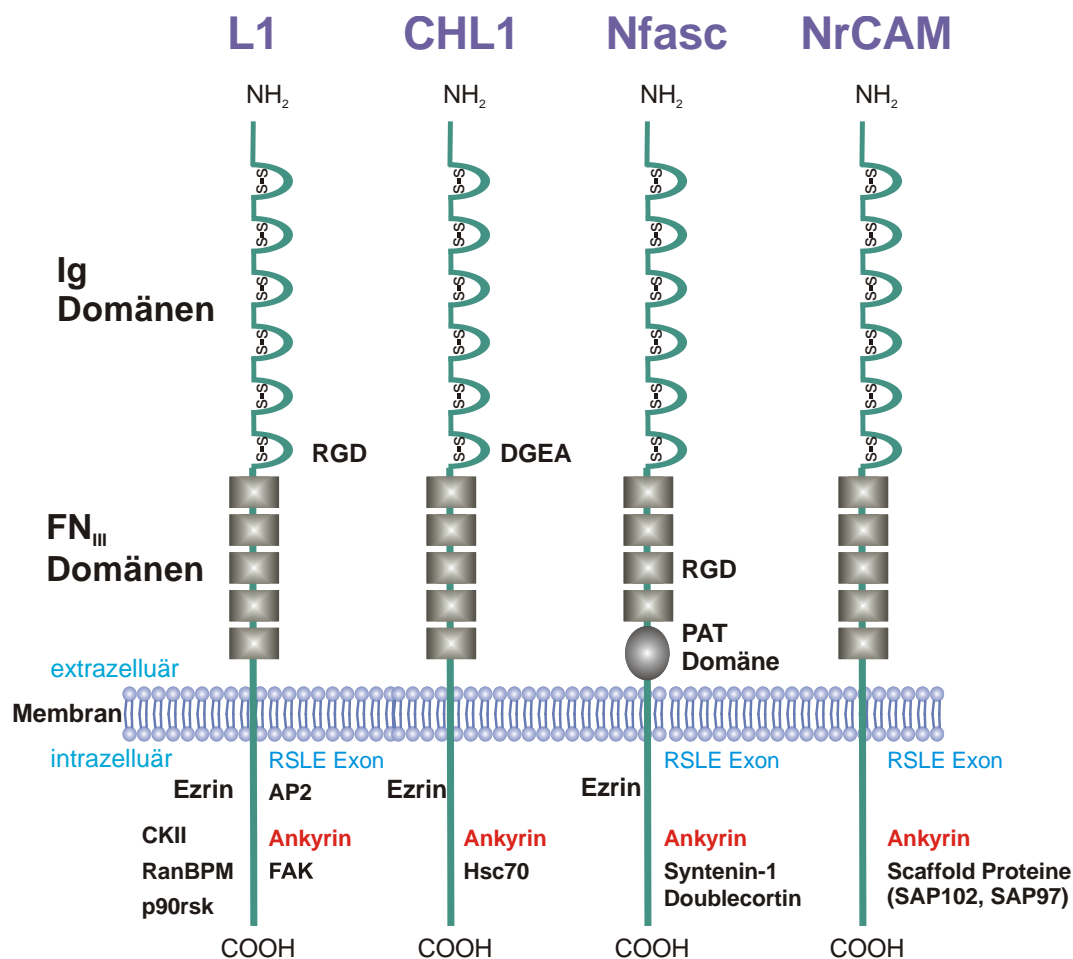


Abbildung 1.6: Mitglieder der L1-CAM Ig Superfamilie. Im Bereich der Ektodomäne besitzen die Zelladhäsionsmoleküle unterschiedliche Ig Strukturen gefolgt von Fibronektin-III Sequenzen. Nfasc besitzt zusätzlich eine Mucin-ähnliche Domäne (PAT Prolin/Alanin/Threonin haltig). L1 und Nfasc haben jeweils eine RGD-Sequenz. CHL1 besitzt in der sechsten Ig-Domäne eine Integrin-bindende DGEA-Sequenz. Im zytoplasmatischen Bereich besitzen sie alle eine Ankyrin-Bindestelle und mit Ausnahme von NrCAM eine Ezrin Binderegion. Zusätzlich gibt es je nach Molekül weitere Bindungspartner. So kann L1 zum Beispiel AP2, CKII, p90rsk und RanBPM binden. CHL1 hat eine Bindestelle für Hsc70. Nfasc kann Syntenin-1 und Doublecortin binden und NrCAM verschiedene Scaffold Proteine. Angelehnt an (Herron et al., 2009).

Alle Familienmitglieder besitzen eine Ankyrin-Bindesequenz (Brummendorf und Rathjen, 1996; Davis und Bennett, 1994), welche eine Assoziation mit dem Zytoskelett ermöglicht (Garver et al., 1997). Besonders bedeutend ist ihre Funktion in der Zell-Zell Interaktion.

1.4.2 Das Zelladhäsionsprotein L1-CAM (CD171)

1.4.2.1 Struktur und Vorkommen von L1-CAM

L1-CAM, oder auch kurz L1, ist ein 200-220 kDa großes Zelladhäsionsmolekül. Erste Publikationen charakterisierten das Glykoprotein L1 in der Maus (Lindner et al., 1983). Murines L1 weist homologe Formen im Menschen (Wolff et al., 1988), in der Ratte (NILE) (Lee et al., 1981), im Huhn (NgCAM) (Grumet et al., 1984) und in Drosophila (Neuroglian) (Bieber et al., 1989) auf.

Neben der konstitutiven Expression im Nervensystem findet man L1 auch auf einigen murinen hämatopoetischen Zellen wie Granulozyten, reifen Thymozyten und der Mehrheit der peripheren B- und T-Lymphozyten (Kowitz et al., 1992; Kowitz et al., 1993). Im humanen Immunsystem wird L1 auf CD4⁺-T-Lymphozyten, peripheren B-Lymphozyten und monozytären Zellen schwach exprimiert (Ebeling et al., 1996; Pancook et al., 1997). In menschlichen Organen kann eine L1 Expression außerhalb des Nervensystems nur in den Sammelrohren der humanen Niere (Helbert et al., 2001), sowie auf peripheren Nervenzellen nachgewiesen werden (Huszar et al., 2006). Eine schwache Expression findet man auf endothelialen Zellen (Felding-Habermann et al., 1997; Pancook et al., 1997), welche nicht nur nach inflammatorischer Reaktion erhöht wird, sondern auch in Tumor-Endothelzellen des Pankreas und anderen Tumoren, stärker auftritt (Issa et al., 2009; Maddaluno et al., 2009). In Abbildung 1.7 ist die L1 Expression durch immunhistochemische Färbungen einiger humaner Organe dargestellt.

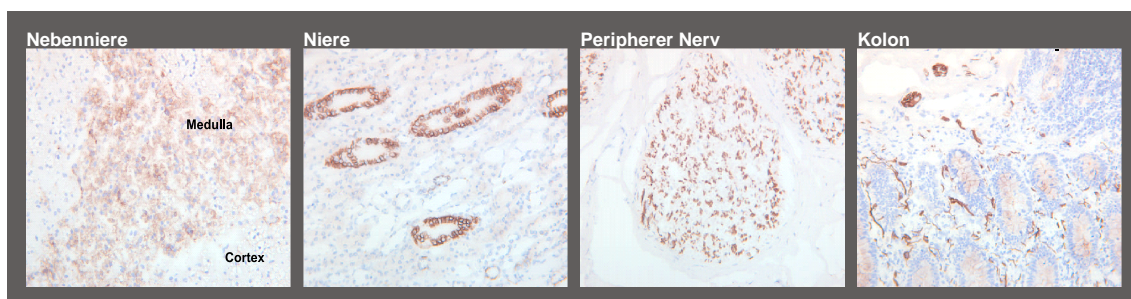


Abbildung 1.7: Immunhistologischer Nachweis von L1 in humanem Gewebe. Humane Gewebsschnitte wurden mit einem L1 mAk inkubiert. Im Anschluss erfolgte ein Nachweis mit einem Enzym gekoppelten Zweitantikörper. Eine L1 Färbung ist in braun dargestellt. Originalvergrößerung 200x. (In Zusammenarbeit mit Yvonne Hirle, Medigene AG, München)

Die Expression von L1 auf Tumorgewebe ist in einigen Publikationen beschrieben. Eine L1 Expression kann in Gliomen (Senner et al., 2002), Lungenkarzinomen (Katayama et al., 1997), Nierenkarzinomen (Allory et al., 2005; Meli et al., 1999), sowie in Kolonkarzinomen (Kaifi et al., 2006) nachgewiesen werden.

L1 besteht aus sechs Ig-Domänen gefolgt von fünf FN III Strukturen (Hortsch, 1996) (Abb. 1.8). Es besitzt 22 potentielle N-Glykosylierungsstellen (Moos et al., 1988). In der extrazellulären Domäne enthält die sechste Ig-Domäne ein RGD-Motiv. Ein zweites RGD-Motiv, welches im murinen L1 vorkommt, fehlt durch einen Aminosäureaustausch. Neurofascin als weiteres Mitglied der L1-Ig-Superfamilie besitzt eine RGD-Sequenz in der dritten FN-III Domäne. Ferner hat die murine CHL1 Sequenz ein RGD-Motif in der zweiten Ig Domäne, welches jedoch in der humanen Sequenz fehlt.

Alternatives Spleißen tritt bei Zelladhäsionsmolekülen häufig auf. L1 besitzt zwei alternativ gespleißte Mini-Exons. In der extrazellulären Domäne besitzt neuronales L1 das Exon 2, bestehend aus der Aminosäure-Sequenz YEGHH. Im zytoplasmatischen Teil kann durch alternatives Spleißen das Aminosäuremotiv RSLE (Exon 27) eingefügt werden. Dieses Motiv führt durch Phosphorylierung eines Tyrosins direkt vor dem RSLE-Motiv zu einer erhöhten Clathrin-vermittelten Endozytose von L1 (Kamiguchi et al., 1998) und dadurch zu einer verminderten Zelladhäsion (Long et al., 2001). Beide Exons konnten bisher nur in neuronalen Zellen nachgewiesen werden, wohingegen sie im L1 Molekül von nicht-neuronalen Zellen wie humanen B-Zellen (Jouet et al., 1995b), Schwann-Zellen, Astrozyten und Oligodendrozyten (Takeda et al., 1996) nicht exprimiert werden. Differenzialer Gebrauch von Exon 2 und 27 in neuronalen versus nicht-neuronalen Zellen ist in Nagetieren mit orthologem L1 konserviert (Coutelle et al., 1998; Jouet et al., 1995b; Miura et al., 1991).

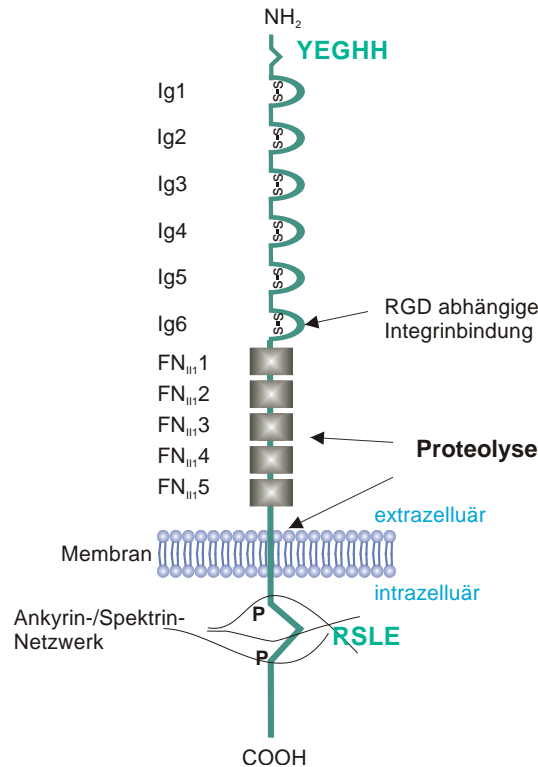


Abbildung 1.8: Schematische Struktur des L1 Moleküls. Dargestellt sind die sechs Ig-Domänen mit den sich anschließenden fünf FN-III-ähnlichen Strukturen. Einem kurzen transmembranen Bereich folgt die konservierte zytoplasmatische Struktur. Eine proteolytische Spaltung kann an zwei Stellen des extrazellulären Bereichs erfolgen. Alternatives Spleißen kann am Exon 2 (YEGHH Sequenz) und am Exon 27 (RSLE Sequenz) stattfinden. In der sechsten Ig-Domäne befindet sich eine RGD-Integrin-Bindungsstelle. Das Molekül ist über Ankyrin mit dem Zytoskelett verbunden. Die zytoplasmatische Domäne enthält darüber hinaus zahlreiche Phosphorylierungsstellen.

1.4.2.2 Funktion und Bindungseigenschaften von L1

1.4.2.2.1 Neuronale Funktionen

Genetisch ist L1 in der Maus X-chromosomal lokalisiert. Im menschlichen X-Chromosom konnte es im Xq28 Bereich detektiert werden (Djabali et al., 1990). Ursprünglich wurde L1 als ein Zelladhäsionsmolekül des Nervensystems identifiziert und ist primär auf Axonen und Wachstumskegeln sich entwickelnder Neuronen exprimiert. Die essentielle Rolle von L1 bei der Entwicklung des Gehirns und des Nervensystems wird durch verschiedene Funktionen bedingt. Neuronales L1 ist an der Migration, Adhäsion (Keilhauer et al., 1985), am Auswachsen von Neuriten (Chang et al., 1987; Doherty et al., 1995) sowie an der Bündelung (Fischer et al., 1986) und Myelinisierung von Neuriten (Wood et al., 1990) beteiligt. Mehr als 150 identifizierte Mutationen im L1 Gen korrelieren mit einer Reihe von neurologischen Missbildungen und Fehlfunktionen (Vos et al., 2009; Weller und Gartner, 2001). Dazu gehören X-chromosomal vererbter Hydrocephalus, MASA-Syndrom (mental retardation, aphasia, shuffling gait and adducted thumbs) oder spastische Paraplegie Typ I (SPG1) (Fransen et al., 1994; Jouet et al., 1994; Rosenthal et al., 1992; Van Camp et al., 1993; Vits et al., 1994). All

diese Krankheiten wurden als CRASH Syndrom (Corpus callosum hypoplasia, Retardation, Adducted thumbs, Spasticity and Hydrocephalus) zusammengefasst (Fransen et al., 1995).

1.4.2.2.2 Spaltung von L1

Obwohl L1 ein transmembranes Molekül ist, kann es durch Abspaltung in löslicher Form von Zellen abgegeben werden (Gutwein et al., 2000; Mechtersheimer et al., 2001). Dieses Ectodomain Shedding ist auch für viele andere Transmembran-Moleküle bekannt, z.B. für TGF- α (Fan und Derynck, 1999) oder Her2/neu (Codony-Servat et al., 1999). An der proteolytischen Prozessierung sind unterschiedliche Proteine beteiligt. Eine konstitutive membranproximale Spaltung von L1 kann durch ADAM10 (A Disintegrin And Metalloproteinase) erfolgen. Zusätzlich kann die Abspaltung mit Hilfe verschiedener Stimuli herbeigeführt werden. Hierzu gehören Ionomycin, PMA (Phorbol 12-Myristate 13-Acetate) und MCD (*Methyl β -Cyclodextrin*). Die aktivierte Spaltung wird primär durch ADAM17 durchgeführt (Gutwein et al., 2003; Maretzky et al., 2005; Mechtersheimer et al., 2001; Stoeck et al., 2006a). Eine Spaltung findet dabei nicht nur an der Zelloberfläche statt, sondern kann auch in intrazellulären Kompartimenten oder Exosomen vorkommen (Gutwein et al., 2003; Gutwein et al., 2005). Die lösliche extrazelluläre Domäne (sL1) bleibt intakt und kann aktiv in weitere Zellprozesse eingreifen. sL1 kann eine heterophile Bindung an Integrine über autokrine und parakrine Mechanismen eingehen. Durch diese Bindung an die RGD-Sequenz von L1 können verschiedene Prozesse aktiviert werden. So stimuliert sL1 die Zellmigration durch Interaktion mit Integrinen (Mechtersheimer et al., 2001). Außerdem zeigten Gutwein et al., 2005 eine ERK-Aktivierung. Die Aktivierung von ERK durch $\alpha\beta 5$ Intergrin-Bindung resultiert in einem Schutz der Tumorzellen vor Apoptose (Stoeck et al., 2007). Im Nervensystem fördert lösliches L1 das Neuritenwachstum und beeinflusst die neuronale Differenzierung (Dihne et al., 2003; Kalus et al., 2003; Sugawa et al., 1997). Erst kürzlich konnte gezeigt werden, dass sL1 die Tumorangiogenese fördert (Friedli et al., 2009).

Der Abspaltung des extrazellulären Teils von L1 durch membran-assoziierte Proteinasen folgt eine Presinilin/ γ -Sekretase abhängige Spaltung des in der Membran verbliebenen C-terminalen Teils (Maretzky et al., 2005). Diese intramembrane Proteolyse (regulated intramembrane proteolysis, RIP) resultiert in ein kleines lösliches zytoplasmatisches Fragment (L1-ICD). Der RIP-Prozess ist essentiell für eine Vielzahl von Signalkaskaden (Landman und Kim, 2004). Nach der Spaltung kann L1-ICD in den Kern gelangen und L1-abhängige Gene regulieren (Riedle et al., 2009).

Neben der metalloproteolytischen Spaltung in der Nähe der Membran spalten auch Serinproteinasen Plasmin und Trypsin in der dritten FN-III Domäne von L1 (Nayeem et al., 1999; Sadoul et al., 1988). Die Schnittstelle ist gekennzeichnet durch ein dibasisches Aminosäure-Motiv mit der Sequenz $_{839}\text{QRKHSKRHH}_{848}$.

1.4.2.2.3 Funktionen von L1 in der Tumorprogression

Die Rolle von L1 in der neuronalen Entwicklung ist ausführlich charakterisiert worden. Zur Funktion von L1 außerhalb des Nervensystems ist weniger bekannt. (Di Sciuillo et al., 1998) hatten berichtet, dass L1 wichtige Funktionen für die Erhaltung der normalen Lymphknotenarchitektur besitzt. Ferner ist L1 sowohl bei der Morphogenese der Nierentubuli (Debiec et al., 1998) als auch bei der Entwicklung der Milz beteiligt. In L1-knockout Mäusen konnte gezeigt werden, dass es durch das Ausschalten von L1 zu einer selektiven Missbildung in den Randbereichen der weißen Pulpa der Milz kommt. Die Randbereiche der weißen Pulpa waren unregelmäßig geformt und unterbrochen (Wang et al., 2000). Außerdem kann L1 als co-stimulatorisches Molekül bei der T-Zellaktivierung wirken (Balaian et al., 2000).

L1 besitzt eine besondere Bedeutung in der Tumorprogression von Karzinomen. In kolorektalen Karzinomen, Melanomen und Karzinomen des Ovars und des Endometriums korreliert die Expression von L1 mit einer schlechten Prognose für die Patienten (Allory et al., 2005; Boo et al., 2007; Fogel et al., 2003a; Fogel et al., 2003b; Kaifi et al., 2006; Thies et al., 2002; Zecchini et al., 2008). Die Expression von L1 ist besonders in der invasiven Front des Tumors ausgeprägt (Gast et al., 2005; Gavert et al., 2005). Es konnte gezeigt werden, dass eine L1 Expression die Zellproliferation fördert. Überdies kann eine Expression die Zellmigration und die Invasivität begünstigen (Meier et al., 2006). L1 konnte als ein Zielgen des Wnt/ β -Catenin Signalwegs detektiert werden (Gavert et al., 2005). Die Wnt-Signalkaskade ist in der Entwicklung vieler Kolonkarzinome und anderer Tumore durch Mutationen hyperaktiviert (Polakis, 2007). Dies führt zur konstitutiven Expression von Zielgenen, unter anderem L1 (Gavert et al., 2005). Des Weiteren ist L1 in der Tumorprogression und Metastasierung involviert (Gavert et al., 2005; Gavert et al., 2007). In DNA-Mikroarray-Analysen von Kolonkarzinomen konnte L1 insbesondere mit der Bildung von Mikrometastasen im Knochenmark und in den Lymphknoten in Verbindung gebracht werden (Boo et al., 2007; Kaifi et al., 2007). Außerdem konnte auf Tumorstammzellen (cancer stem cell; CSC) nach Isolierung aus Gliomatumoren eine Co-Expression von L1 mit dem Stammzellmarker CD133 gefunden werden. Eine Inhibition der L1 Expression durch short hairpin (sh) RNA macht diese Zellen weniger karzinogen (Bao et al., 2008). In Brustkarzinom-Zelllinien führt eine L1 Expression zu einer reduzierten Expression von E-Cadherin und zu einer Erhöhung der β -Catenin Aktivität im

Nukleus (Shtutman et al., 2006). Ebenso wird im Endometrialkarzinom durch einen TGF- β 1-vermittelten mesenchymalen Übergang die Expression von L1 erhöht, wohingegen E-Cadherin reduziert wird (Huzar et al., 2010). Zusätzlich zeigte sich auch eine erhöhte Expression des EMT-Transkriptionsfaktors Slug (Huzar et al., 2010). Die Regulation der L1 Expression durch Slug wurde auch am Beispiel einer Pankreas-Zelllinie nachgewiesen (Geismann et al., 2009). Somit ist L1 im Übergang vom epithelialen zum mesenchymalen Zustand (EMT) involviert. Weiterhin hat L1 Einfluss auf verschiedene Stoffwechselwege, welche möglicherweise das Tumorwachstum fördern. Durch die Eigenschaft als Transmembranmolekül kann hierbei die extrazelluläre, wie auch die zytoplasmatische Domäne, eine Rolle spielen. So kann der zytoplasmatische Teil von L1 eine konstitutive ERK-Aktivierung hervorrufen (Schaefer et al., 1999), nach der Gene exprimiert werden, welche in der Zellmigration und -invasion, insbesondere Integrine, eine Rolle spielen (Silletti et al., 2004). Mutationen im zytoplasmatischen Bereich von L1 hemmen das Tumorwachstum und die ERK-abhängige Genregulation (Gast et al., 2008; Schaefer et al., 1999). RanBPM kann im Zytoplasma mit L1 interagieren und reguliert die L1 abhängige ERK-Aktivierung (Cheng et al., 2005). Neben Förderung der Zellproliferation, Migration, Invasion und Metastasierung scheint L1 auch vor der Zytostatika-vermittelten Apoptose zu schützen. Eine L1 Expression führt nach chemotherapeutischer Behandlung zur Resistenz von Ovarial- und Pankreas-Karzinomzellen und somit zur Hemmung von Kaspasen (Sebens Muerkoster et al., 2007; Stoeck et al., 2007; Zecchini et al., 2008).

1.4.2.2.4 Bindungsinteraktionen

Die Interaktionen von L1 mit extrazellulären und intrazellulären Liganden sind hauptsächlich für die Funktionalität von L1 verantwortlich. Interaktionen können in cis, innerhalb der selben Zellmembran, oder in trans, zwischen benachbarten Zellen, stattfinden. L1 kann eine homophilische Bindung insbesondere für die Zelladhäsion eingehen. Eine Reihe von Publikationen beschäftigt sich mit dem Zustandekommen dieser Bindung. Ende der 90er Jahre wurde gezeigt, dass die Ig2 Domäne ausreicht, um eine Interaktion in trans einzugehen (Yip und Siu, 2001; Zhao und Siu, 1995; Zhao et al., 1998). Später postulierte (Silletti et al., 2000), dass die Fn-III-Domäne die L1-L1 Interaktion in cis vermittelt. Da hier ein bakterielles Expressionssystem verwendet wurde, zeigten eukaryotische Expressionssysteme andere Ergebnisse. So sind in einer trans Interaktion mehrere Domänen involviert, insbesondere die Domänen Ig 1-6 und Fn-III 1-2 (De Angelis et al., 1999; De Angelis et al., 2002). Andererseits reichen nach Haspel und Kollegen (Haspel et al., 2000) schon Ig 1-4 für eine homophilische Bindung aus. Alle Ig-Domänen (Ig 1-6) sind für ein optimales Neuritenwachstum nötig.

Hingegen zeigten kürzlich Untersuchungen, dass die Domänen Ig 1-4 für eine L1-L1 Interaktion in trans nötig und ausreichend sind (Gouveia et al., 2008).

Neben einer homophilen Bindung kann L1 auch heterophile Interaktionen eingehen. Diese Bindung kann einerseits mit weiteren neuronalen IgCAM (Nr-CAM, Axonin-1) zustande kommen oder andererseits mit einer Reihe von Proteinen der extrazellulären Matrix (Laminin, Phosphacan, Neurocan), Rezeptoren (z.B. NRP-1, EGFR, FGFR) oder Integrinen. Neuronale IgCAMs nutzen die Ig 1-4 Domäne für ihre Interaktion mit L1 (Fitzli et al., 2000; Rader et al., 1996). Daher scheinen die Ig 1-4 Domänen eine hoch konservierte Region für die funktionelle Interaktion zwischen IgCAMs zu sein. Interaktionen mit Axonin-1 oder F3/Contactin induzieren das initiale Auswachsen der Axone (Brummendorf et al., 1993; Kuhn et al., 1991). Dieses wird durch die Bindung an Neurocan blockiert (Friedlander et al., 1994; Rauch et al., 2001). Neurocan und Neuophilin-1 binden an die Ig1 Domäne von L1. NRP-1 Bindung führt zur Repulsion von Axonen durch Semaphorin3a (Sem3A) (Castellani, 2002; Castellani et al., 2000; Castellani et al., 2002). In cis kommt es zur Bildung des Rezeptorkomplexes für Sema3A, was zur Repulsion von Axonen führt. Eine Bindung mit sL1 in trans hingegen kehrt diese Repulsion um. Die Bindung von Sema3A an NRP-1 führt zudem zu einer Internalisierung von L1 durch einen Clathrin-abhängigen Mechanismus (Castellani et al., 2004).

Die L1-abhängige Zellmotilität kann entweder durch eine Interaktion mit löslichem L1 (Mechtersheimer et al., 2001), oder durch membranständiges L1 mit Integrinen hervorgerufen werden (Thelen et al., 2002). Die meisten Integrine binden innerhalb der Ig6 Domäne von L1 an die RGD-Sequenz. Dies trifft für $\alpha\beta5$, $\alpha5\beta1$, $\alpha\beta1$, $\alpha\beta3$ und das thrombozytenspezifische Integrin $\alpha(\text{IIb})\beta3$ zu. Das $\alpha9\beta1$ Integrin interagiert mit einer Sequenz in der dritten FN-III-Domäne (Blaess et al., 1998; Ebeling et al., 1996; Montgomery et al., 1996; Oleszewski et al., 1999; Silletti et al., 2000). L1 scheint durch die Interaktion der Zelle mit der extrazellulären Matrix (ECM) ein Tumorstadium und die Metastasierung zu fördern. Neben den Integrin-Interaktionen zeigt L1 auch Wechselwirkungen mit Rezeptoren von Wachstumsfaktoren (receptor tyrosine kinase; RTK). Eine Interaktion der FN-III Domänen von L1 mit dem Fibroblasten-Wachstumsfaktors (FGFR) führt zur Phosphorylierung von FGFR, wodurch das Auswachsen der Neuriten stimuliert wird (Kulahin et al., 2008; Kulahin et al., 2009). Ferner zeigte diese Interaktion einen Einfluss auf die L1 vermittelte Zellproliferation und Invasion (Thelen et al., 2002; Zecchini et al., 2008). Zusätzlich scheinen die Wachstumsfaktoren EGF und HGF (hepatocyte-growth-receptor) in der Tumorprogression durch L1 eine Rolle zu spielen (Novak-Hofer et al., 2008).

1.4.2.3 Therapeutische Aspekte

Die Funktion von L1 als tumor-assoziiertes Antigen, durch seine restriktive Expression im gesunden Gewebe außerhalb des Gehirns, macht L1 zu einem idealen Antigen in der Krebsdiagnose und -therapie. Durch eine Antikörpertherapie besteht die Möglichkeit, dass die pro-tumorigene Funktion von L1 im Karzinom blockiert wird. Bisher gibt es jedoch noch keinen mAk gegen L1, der zur Krebstherapie zugelassen ist bzw. systematisch untersucht wurde. In den letzten Jahren wiesen aber schon einige unabhängige Studien einen positiven Einfluss von Antikörpern gegen L1 in Karzinomen nach. In der Radioimmuntherapie zeigt der radioaktiv konjugierte chimärisierte L1 mAk chCE7 nicht nur diagnostische sondern auch therapeutische Wirkung. So wurden Tumor und Metastasen in Neuroblastom-Patienten und im Neuroblastoma-Xenograft-Modell der Maus sichtbar gemacht. Im gesunden Gewebe hingegen wurde nur ein Minimum an Radioaktivität detektiert. Durch die Fähigkeit der Internalisierung dieses Antikörpers führte die Therapie im Neuroblastom-Xenograft-Modell zu einer Reduktion des Tumors und einer verlängerten Überlebensrate (Grunberg et al., 2005; Hoefnagel et al., 2001; Knogler et al., 2007; Novak-Hofer et al., 1992; Novak-Hofer et al., 1997). Außerdem inhibiert eine Therapie mit unkonjugiertem L1-Antikörper die Proliferation von Ovarialkarzinomzellen *in vitro* und Tumorwachstum *in vivo* und führt zur reduzierten Proliferating Cell Nuclear Antigen (PCNA) Aktivität in Tumorzellen (Arlt et al., 2006). *In vitro* zeigt eine kombinierte Behandlung mit einem L1 mAk (chCE7) eine potenzierende Wirkung auf die Inhibition und den apoptotischen Effekt von Genistein (Novak-Hofer et al., 2008) oder Etoposid (Sebens Muerkoster et al., 2007). Zusätzlich konnte in einer kürzlich veröffentlichten Studie gezeigt werden, dass mAk chCE7 eine sL1 induzierte Proliferation, sowie die Matrigel-Invasion und Gefäßausbildung *in vitro* hemmen kann. In einem chicken-chorioallantoic-membrane (CAM) Assay zeigte die Behandlung mit chCE7 eine anti-angiogenetische Wirkung (Friedli et al., 2009). Die Inhibition der Gefäßbildung *in vitro* über L1 exprimierende Tumorendothelzellen zeigte sich auch mit L1-11A (Issa et al., 2009). Eine anti-proliferative Wirkung *in vitro* resultierte mit verschiedenen extrazellulären Antikörpern gegen L1 (L1-11A und L1-5G3) (Arlt et al., 2006; Primiano et al., 2003). In Vorarbeiten unserer Arbeitsgruppe führt eine Antikörperbehandlung mit L1 mAk (L1-11A, L1-14.10, L1-9.3) *in vitro* zu einer Inhibition der ERK-Aktivierung, einer Invasionsinhibition und einer Hemmung des Tumorwachstums auf einer Ovarialkarzinom-Zelllinie *in vivo*. Zusätzlich scheint die Behandlung zu einer veränderten Genexpression in diesen Zellen zu führen (Gast et al., 2008).

1.5 Zielsetzung der Arbeit

Mehr als 190.000 Frauen erkranken jährlich weltweit am Ovarialkarzinom. Für die hohe Mortalitätsrate ist ein ungünstiger Verlauf dieser Karzinogenese verantwortlich. Viele Faktoren machen es schwierig, diese Erkrankung erfolgreich zu bekämpfen. Aufgrund fehlender eindeutiger Symptome erfolgt die Diagnose bei den meisten Patientinnen erst im fortgeschrittenen Stadium. Die kombinierte Chemotherapie stellt zwar eine Verbesserung dar, aber durch auftretende Resistenzen gegen die verwendeten Chemotherapeutika kommt es bei mehr als 65% der Patientinnen zur Bildung von Rezidiven. Problematisch ist besonders die Heterogenität des Ovarialkarzinoms. Multiple genetische und epigenetische Veränderungen spielen bei der Tumorprogression eine Rolle. Daher steht zurzeit die Entwicklung moderner molekulargenetischer Methoden im Fokus der Wissenschaft. Der Einsatz von Inhibitoren zeigte in klinischen Studien einige Fortschritte, hat aber bisher zu keiner Zulassung einer Therapie gegen Ovarialkarzinome geführt. Die zugelassenen therapeutischen mAk werden zwar erfolgreich für verschiedene Tumorarten angewandt, verzeichnen aber im Hinblick auf ovarielle Karzinome noch keine großen Errungenschaften. L1 ist auf 80% der Ovarialkarzinome als tumorassoziiertes Antigen präsent und kann daher als Zielmolekül für eine Antikörpertherapie verwendet werden. In Vorarbeiten unserer und weiteren Arbeitsgruppen konnten schon erste therapeutische Wirkungen von L1-Antikörpern *in vitro* und *in vivo* nachwiesen werden.

Diese Arbeit befasst sich mit der Charakterisierung und präklinischen Evaluierung einer Serie neu generierter monoklonaler Antikörper gegen L1. Im ersten Teil sollten die Antikörper auf ihre Bindungsaffinitäten und -spezifitäten untersucht werden. Dazu wurden zunächst die Epitope der verschiedenen L1 mAk bestimmt. Eine weitere Charakterisierung erfolgte über funktionelle Eigenschaften *in vitro*. Einzelne ausgewählte Antikörper konnten anschließend *in vivo* getestet werden. Im SKOV3ip Maus-Xenograft-Modell sollten die Erfolge bezüglich der Überlebensrate und der Tumor- und Aszitesreduktion dokumentiert werden.

Ein weiterer Teil dieser Arbeit beschäftigte sich mit den funktionellen Wirkmechanismen der Antikörper. Dazu sollten *in vivo* die beteiligten Effektorzellen definiert werden. Zusätzlich erfolgte eine Gesamtanalyse der Antikörper-Wirkung auf die Tumorzellen *in vivo* mittels Genexpression.

Der letzte Teil befasste sich mit der Humanisierung der Antikörper. Hierzu sollten aus einem ausgewählten Antikörper humanisierte Varianten produziert werden. Im Anschluss erfolgte dann die Charakterisierung und Evaluierung *in vivo*.

2. MATERIAL

2.1 Chemikalien und molekularbiologische Reagenzien

Bezeichnung	Bezugsquelle
⁵¹ Chrom (Natriumchromat)	Perkin Elmer, Rodgau
Acrylamidlösung (Acrylamid 30% N,N'-Methylbisacrylamid 0,8%)	Carl Roth, Karlsruhe
Agar	Carl Roth, Karlsruhe
Alkalische Phosphatase FastAP®	Fermentas, St. Leon-Rot
Ampicillin	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
APS (Ammoniumpersulfat)	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Bactotrypton	Carl Roth, Karlsruhe
BSA Type H1 (Bovines Serumalbumin)	Gerbu Biotechnik, Gaiberg
CASY®ton Isotone Salzlösung	Innovatis, Reutlingen
Clodronat-Liposomen/PBS-Liposomen	Nick van Rooijen, Amsterdam, N
Collagenase-IV	PAN Biotech, Aidenbach
ddH ₂ O	PAA, Pasching, A
DEPC	Carl Roth, Karlsruhe
D-Luciferin	Synchem, Felsberg
DMSO (Dimethylsulfoxid)	Merck, Darmstadt
DNA-Marker: 100 bp DNA Ladder Plus	Fermentas, St. Leon.Rot
DNA-Marker: λ DNA/Eco911	Fermentas, St. Leon-Rot
DNA-Polymerase PfuUltra™ High-Fidelity	Stratagene, La Jolla, USA
DNA-Polymerase Precise	BioCat, Heidelberg
Dnase I	AppliChem, Darmstadt
dNTP (10mM)	Fermentas, St. Leon-Rot
ECL (Enhanced Chemiluminescence Substrate)	Amersham Bioscience, Freiburg
EDTA	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Eisessig	Carl Roth, Karlsruhe
Endobulin	Baxter, Unterschleißheim
Fibronektin	Biosource, Nivelles, B
Ficoll	Biochrom, Berlin
Glucose D (+)	Merck, Darmstadt
Glutaraldehyd	Carl Roth, Karlsruhe
Glyzerin	Carl Roth, Karlsruhe
Glyzin	Gerbu Biotechnik, Gaiberg
H ₂ SO ₄ 1 M	Carl Roth, Karlsruhe
HCl (Salzsäure)	Carl Roth, Karlsruhe
Hefeextrakt	Carl Roth, Karlsruhe
Isobutanol	Riedl-de Haen, Seelze
Isofluran	Baxter, Unterschleißheim
jetPEI	Polyplus, NY, USA
KCl (Kaliumchlorid)	Merck, Darmstadt
Ketanest®S	S Pfizer, Karlsruhe
KH ₂ PO ₄ (Kaliumdihydrogenphosphat)	Carl Roth, Karlsruhe
KHCO ₃ (Kaliumhydrogencarbonat)	Carl Roth, Karlsruhe
Lektine (LTA, UEA, MPA, ConA, SNA) (POX gekoppelt)	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Methanol	Fluka Biochemika, Deisenhofen
MgCl ₂ (Magnesiumchlorid)	Fluka Biochemika, Deisenhofen
MgSO ₄ (Magnesiumsulfat)	Merck, Darmstadt

Material

Bezeichnung	Bezugsquelle
Milchpulver	Merck, Darmstadt
Na ₂ CO ₃	Carl Roth, Karlsruhe
Na ₂ HPO ₄ (Dinatriumhydrogenphosphat)	AppliChem, Darmstadt
NaCl (Natriumchlorid)	Riedl-de Haen, Seelze
NaHCO ₃	Carl Roth, Karlsruhe
NaN ₃ (Natriumazid)	AppliChem, Darmstadt
NH ₄ Cl (Ammoniumchlorid)	Carl Roth, Karlsruhe
NuPAGE Sample Puffer 4x	Invitrogen, Karlsruhe
PMSF (Phenylmethylsulfonylchlorid)	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Ponceau-S Lösung	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Propidium Iodid	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Protease Inhibitoren Complete Mini	Roche, Mannheim
Protein A-Sepharose CL-4B	GE Healthcare, Freiburg
Protein G Sepharose	Pharmacia Biotech, Wien
Proteinmarker High-Range Rainbow™	Amersham Bioscience, Freiburg
Restriktionsenzym: EcoRI, HindIII	Fermentas, St. Leon-Rot
RNA Marker	Fermentas, St. Leon-Rot
RNA-Probenpuffer	Fermentas, St. Leon-Rot
RNase Away	VWR International, Darmstadt
Rompun® (Xylazinhydrochlorid)	Bayer, Leverkusen
SDS (Sodiumdodecylsulfat)	Gerbu Biotechnik, Gaiberg
SOP Medium	Invitrogen, Karlsruhe
Streptavidin (Peroxidase gekoppelt)	Jackson ImmunoResearch,
T4 DNA Ligase	Fermentas, St. Leon-Rot
TEMED (N, N, N, N – Tetramethyl-Ethylenediamine)	Carl Roth, Karlsruhe
Tetrazyklin	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
TMB Reagenz	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Tris/HCl	Biomol, Hamburg
Triton X-100	Gerbu Biotechnik, Gaiberg
Trizma Base	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Trypanblau	Carl Roth, Karlsruhe
Tween-20	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
β-Mercaptoethanol, 99%	Carl Roth, Karlsruhe

2.2 Verbrauchsmaterial

Bezeichnung	Bezugsquelle
25, 75, 150 cm ² Zellkulturflaschen	TPP, Trasadingen CH
40µm /100 µm Cell-Strainer	BD Falcon, Heidelberg
50, 100, 150 mm Zellkulturplatten	TPP, Trasadingen, CH
6-, 96-Loch Zellkulturplatten	Nunc, Wiesbaden
8 Loch Glaskammer Objektträger	Nunc, Wiesbaden
96 Loch Rundbodenplatten	Nunc, Wiesbaden
Eppendorf-Reaktionsgefäß (0,5, 1,5,2,0 ml)	Eppendorf, Hamburg
FACS-Röhrchen	Greiner, Frickenhausen
Immobilon-PVDF-Membran	Millipore, Eschborn
Kanülen	BD Biosciences Pharmingen, Hamburg
Luma-Platten	Packard Bioscience
MicroAmp Optical 96-Loch Platte	Applied Biosystems, Darmstadt

Bezeichnung	Bezugsquelle
MicroAmp Optical Adhesive Film	Applied Biosystems, Darmstadt
Pipettenspitzen, 0-10, 10-200, 200-1000µl ±Filter	Nunc, Wiesbaden
Polypropylen-Zentrifugenröhrchen	TPP, Trasadingen, CH
Röntgenfilm Hyperfilm ECL	Amersham Bioscience, Braunschweig
Spritzen: 1 ml, 5 ml, 10 ml, 50 ml	BD Biosciences Pharmingen, Hamburg
Sterilfilter, 0,22µm	Millipore, Eschborn
SuperFrost Plus Glasobjektträger	Menzel-Glaeser, Braunschweig
Whatman® Gel Blotting Filter	Whatman USA
Zentrifugenröhrchen (15ml, 50 ml)	Corning, Schiphol-Rijk, NL

2.3 Kommerzielle Kits

Bezeichnung	Bezugsquelle
BCA Protein Kit	Pierce, Rockford, UA
First Strand cDNA Synthesis Kit	Fermentas, St. Leon-Rot
Gel Extraktionskit	Qiagen, Hilden
Illumina BeadChip® Human Sentrix-6 V3	Illumina, San Diego, USA
L1 ELISA	DRG, Marburg
Microspin G50 Columns	Qiagen, Hilden
One Shot®TOP10/P3 Kompetente Zellen	Invitrogen, Karlsruhe
Plasmid Maxi	Qiagen, Hilden
Plasmid Mini	Qiagen, Hilden
QIAshredder-Säulen	Qiagen, Hilden
RNA 6000 Nano Chip	Agilent, Böblingen
RNeasy Mini Kit	Qiagen, Hilden
SYBR®GreenPCR Master Mix	Applied Biosystems, Darmstadt
VECTORSTAIN ABC Elite Kit	Vector Labs, USA

2.4 Medien und Medienzusätze

Bezeichnung	Bezugsquelle
DMEM	PAA Laboratories, Pasching; A
DMEM/F12	PAA Laboratories, Pasching; A
FCS (fetal calf serum, Fetales Kälberserum)	Life Technologies, Carlsbad, USA
G418	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Glutamin	PAA Laboratories, Pasching; A
Hepes 1M	PAA Laboratories, Pasching; A
Hygromycin B	Cayla,, Toulouse, F
L-Arginin	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
L-Asparagin	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
PBS-Pulver	GIBCO, Karlsruhe
Penicillin/Streptomycin 100x	GIBCO, Karlsruhe
RPMI 1640	PAA Laboratories, Pasching; A
Trypsin/EDTA 10 x	GIBCO, Karlsruhe

2.5 Geräte

Bezeichnung	Hersteller
ABI 7300 Real-Time PCR System	Applied Biosystem, Darmstadt
Agilent 2100 Bioanalyzer	Agilent, Böblingen
Brutschrank	Heraeus, Hanau
CASY®1	Innovatis, Reutlingen
Dismembrator MM301	Retsch, Haas
Durchflusszytometer: FACSCanto	Becton Dickinson, Heidelberg
Elektrophoreseapparatur Mini Protean II	Biorad, München
ELISA-Meßgerät	Tecan, Crailsheim
Geldokumentationsystem	PeQLab, Erlangen
geregeltes Netzteil für Elektrophorese	Biorad, München
Großzentrifuge: Einsatz SS34	Beckman Coulter, Krefeld
Heizblock	Grant Instruments, GB
IVIS® Imaging System 100	Xenogen, USA
NanoDrop ND-1000 Spectrophotometer®	NanoDrop Technologies, USA
Semi-dry Transferkammer für Western Blot	Renner, Darmstadt
Spektralphotometer	Biochrom, Berlin
Sterilwerkbank	Heraeus, Hanau
Thermo Cycler PTC-200 DNA Engine	Mj Research, Waltham , USA
Tischzentrifuge Biofuge Fresco	Heraeus, Hanau
Top Count Microplate Scintillation Counter	Packard Instruments, USA
Venti-Rack Käfige	BioZone, Oberusel
Waage	Mettler-Toledo, Giessen

2.6 Software

Bezeichnung	Hersteller
Beadstudio Version 3.0	Illumina, San Diego, USA
CellQuest Pro	Becton Dickinson, Heidelberg
Chipster	CSC, FI
Corel Draw X3	Corel, USA
FlowJo 4.3	TreeStar San Carlo, USA
GraphPadPrism 5.0	GraphPad Software Inc., USA
Illustrator CS3	Adobe, USA
IVIS Living Image 2.5	Xenogen, USA
Magellan 5	Tecan, CH
Office 2007	Microsoft, USA
Photoshop CS3	Adobe, USA
PrimerQuest SM	Integrated DNA Technologies (IDT), USA
Vector NTI	Invitrogen, Karlsruhe

2.7 Datenbanken

Bezeichnung	Internetadresse
DAVID	http://david.abcc.ncifcrf.gov/
ExpASY Proteomics Server	www.expasy.ch
Information Hyperlinked over Proteins	www.ihop-net.org
NCBI	www.pubmed.de
Gene Expression Omnibus (GEO) (NCBI)	www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/

2.8 Antikörper

2.8.1 Unkonjugierte humane primäre Antikörper

Spezifität	Spezies	Name/Klon	Isotyp	Referenz oder Firma
L1	Maus	5G3	IgG2a	BD Biosciences Pharmingen, Hamburg
L1	Maus	L1-11A	IgG1	Invivo, Henningsdorf
Her2/neu	humanisiert	Herceptin®	IgG1	Roche, Mannheim
β-Aktin	Maus	β-Aktin	IgG1	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
L1/NgCAM	Maus	2C2	IgG1	Abcam, Cambridge, USA
L1	Maus	745H7	monoklonal	V. Lemmon, Cleveland
L1	Kaninchen	pcytL1	polyklonal	V. Lemmon, Cleveland
CHL1	Ziege	CHL1	polyklonal	R&D Systems, Wiesbaden
V5	Maus	V5	IgG2a	Invitrogen, Karlsruhe

2.8.2 Konjugierte Antikörper

Spezifität	Konjugat	Spezies	Name/Klon	Isotyp	Referenz oder Firma
Gr1 (Maus)	APC	Ratte	Ly-6G, Ly-6C	IgG2b	BD Biosciences Pharmingen, Hamburg
F4/80 (Maus)	FITC	Ratte	Cl: A3-1	IgG2b	Serotec, Düsseldorf

2.8.3 Konjugierte Zweitantikörper

Spezifität	Konjugat	Spezies	Referenz oder Firma
Humanes IgG (H+L)	FITC	Ziege	Dianova, Hamburg
Murines IgG1	FITC	Ziege	Dr. G. Moldenhauer
Murines IgG2a	FITC	Ziege	Dr. G. Moldenhauer
Murines IgG2b	FITC	Ziege	Dr. G. Moldenhauer
Murines IgG (H+L)	PE	Ziege	Dianova, Hamburg
Humanes IgG (H+L)	POX	Ziege	Dianova, Hamburg
Kaninchen IgG (H+L)	POX	Ziege	Dianova, Hamburg
Murines IgG (H+L)	POX	Ziege	Dianova, Hamburg
Murines IgG1	POX	Ziege	Dr. G. Moldenhauer
Murines IgG2a	POX	Ziege	Dr. G. Moldenhauer
Murines IgG2b	POX	Ziege	Dr. G. Moldenhauer
Ziege IgG (H+L)	POX	Kaninchen	Dianova, Hamburg

2.8.4 Isotypkontrollen

Isotyp	Spezies	Klon	Referenz
IgG1	Maus	APH266.3	Dr. G. Moldenhauer
IgG2a	Maus	ALH419	Dr. G. Moldenhauer

2.9 Mausstämme

Bezeichnung	Genotyp	Bezugsquelle
CD1 Nude	CrI:CD1-Foxn1nu	Charles River Laboratories Inc.
BALB/c Nude	CAnN.Cg-Foxn1 /CrI	Charles River Laboratories Inc.

2.10 Primer

Die Primer wurden von der Firma MWG (Eurofins MWG Operon, Ebersberg, Deutschland) gemäß eigener Vorgaben synthetisiert und mittels der HPSF-Methode (high purity salt free) gereinigt.

2.10.1 Realtime Primer

Gen	Primer ID	Primersequenz 5' à 3'
ANGPTL4	ANGPTL4 for	TCAGCATCTGCAAAGCCAGTTTGG
	ANGPTL4 rev	ATCGTGCGCCTCTGAATTACTGT
APOE	APOE for	GCCAATCACAGGCAGGAAGATGAA
	APOE rev	ACCCAGCGCAGGTAATCCCAA
APOLD1	APOLD1 for	AAATGGGAGACTGCTGAGGCTCTT
	APOLD1rev	TAAACTCAGCTCCTGGTCTTGCCA
APP	APP for	AGCAATGATCTCCCGCTGGTACTT
	APP rev	TGTGTCAAAGTTGTTCCGGTTGCC
CXCR4	CXCR4 for	AGGGAACCTGAACATTCCAGAGCGT
	CXCR4 rev	AAACGTTCCACGGGAATGGAGAGA
DDIT	DDIT for	AGGGACTGATTCTGTGGTTGGAA
	DDIT rev	CGCACACAACCTCAATGAGCTTCT
ITGB2	ITGB2 for	TCCACTCTGACTGGCACAGTCTTT
	ITGB2 rev	TTGCACAGGAAACACGCACCTAAC
TNFα	TNF α for	ACCCTCAACCTCTTCTGGCTCAAA
	TNF α rev	AATCCCAGTTTTCGAAGTGGTGGT
TRAIL	TRAIL for	TTTGGGAACCCAAGGTGGGTAGAT
	TRAIL rev	TGATCTCACCACACTGCAACCTCT
WISP2	WISP2 for	TATGGCAGAGGTGCAAGACCTAGT
	WISP2 rev	AAGGGACTGCTTGTCCCATCTCTT
β-Aktin	β -Aktin for	ACAAGATGAGATTGGCATGGC
	β -Aktin rev	GCCACATTGTGAACCTTGGGG

2.10.2 Primer zur Herstellung von Fusionsproteinen

Konstrukt	Primer ID	Primersequenz 5' à 3'	Enzym
CHL1-Fc	CHL1-Fc for	GACAAGCTTATAATGGAGCCGCTTTTA	HindIII
	CHL1-Fc rev	GGGAATTCAACTTACCTTCGTCCGTGATCGG	EcoRI
L1/Ig1-Fc	L1/Ig1-Fc for	GACAAGCTTCATAATGGTCCGTGGCGCTGCGG	HindIII
	L1/Ig1-Fc rev	AATGAATTCATAACTTACCTGGCCACTTGGGGGCACC	EcoRI
L1/Ig1-2-Fc	L1/Ig1-2-Fc rev	AATGAATTCATAACTTACCTTCTTCTGAATGATGGT	EcoRI
L1/Ig1-3-Fc	L1/Ig1-3-Fc rev	AATGAATTCATAACTTACCTGCAGCCTCCACGGTGAC	EcoRI
L1/Ig1-4-Fc	L1/Ig1-4-Fc rev	AATGAATTCATAACTTACCTGGCAGCTGGACAACGTA	EcoRI
L1/Ig1-5-Fc	L1/Ig1-5-Fc rev	AATGAATTCATAACTTACCTTTAACCTTCAGGTTAGC	EcoRI
L1/Ig1-6-Fc	L1/Ig1-6-Fc rev	AATGAATTCATAACTTACCTGGCACCAGCCAGGGCT	EcoRI
L1/Ig1-FN2-Fc	L1/Ig1-FN2-Fc rev	AATGAATTCATAACTTACCTCCAGAGTAGCCGATAGT	EcoRI

2.11 Zelllinien

Zelllinien	Herkunft	Referenz
SKOV3ip	Humanes Ovarialkarzinom	Prof. Ellen Vitetta, USA
OVMz	Humanes Ovarialkarzinom	Prof. Achim Krüger, München
OVCA2774	Humanes Ovarialkarzinom	Prof. Zeilinger, Wien
OVCAR3	Humanes Ovarialkarzinom	Prof. Zeilinger, Wien
Caov3	Humanes Ovarialkarzinom	Prof. Zeilinger, Wien
Hoc-7	Humanes Ovarialkarzinom	DKFZ-Tumorbank
IK	Humanes Endometrialkarzinom	DKFZ-Tumorbank
Ecc-1	Humanes Endometrialkarzinom	DKFZ-Tumorbank
Hec1A	Humanes Endometrialkarzinom	ATCC
MCF-7	Humanes Mammakarzinom	DKFZ-Tumorbank
SKBR3	Humanes Mammakarzinom	DKFZ-Tumorbank
Capan-1	Humanes Pankreaskarzinom	DKFZ-Tumorbank
Panc-1	Humanes Pankreaskarzinom	Dr. Sebens-Mürköster, Kiel
PT45res	Humanes Pankreaskarzinom	Dr. Sebens-Mürköster, Kiel
Colo357	Humanes Pankreaskarzinom	Dr. Sebens-Mürköster, Kiel
HTC112	Humanes Kolonkarzinom	DKFZ-Tumorbank
HCT119	Humanes Kolonkarzinom	DKFZ-Tumorbank
SW948	Humanes Kolonkarzinom	DKFZ-Tumorbank
SW480	Humanes Kolonkarzinom	DKFZ-Tumorbank
SW707	Humanes Kolonkarzinom	DKFZ-Tumorbank
CX-1	Humanes Kolonkarzinom	DKFZ-Tumorbank
CHO	chinesische Hamster-Ovarial-Zelllinie	DKFZ-Tumorbank
HT1080	Humanes Fibrosarkom	Prof. Achim Krüger, München
HT1080-L1	Humanes Fibrosarkom	Prof. Achim Krüger, München
HT1080-L1 Δ 2 Δ 27	Humanes Fibrosarkom	Prof. Achim Krüger, München
COS-7	Affennieren-Zelllinie	DKFZ-Tumorbank
J558-L1	Maus Myeloma Zelllinie hL1 transfiziert	V. Lemmon; Miami, USA

2.12 Vektoren und Plasmide

Name	Herkunft	Eigenschaften
pIG1	Simmons, 1993	Modifizierter pCDM8 Vektor mit supF Gen, codiert Fc-Teil des humanen IgG1
pCDNA3.1 Luciferase	Yingzi Ge; AG Beckhove, DKFZ	pCDNA3 ist ein Vektor zur Transfektion eukaryotischer Zellen; CMV; codiert Luciferase
pcDNA 3.1-CHL1	Medigene AG, München	Zur Expression von humanem CHL1 in eukaryotischen Zellen geeignet
L1 pcDNA3	AG Altevogt, DKFZ	pCDNA3 ist ein Vektor zur Transfektion eukaryotischer Zellen; CMV; codiert humanes L1
GST Fusionskonstrukte	Helena Kiefel, AG Altevogt, DKFZ	Zur Herstellung von zytoplasmatischen L1 und CHL1 GST Proteinen

2.13 Allgemeine Puffer und Lösungen

Puffer/Lösung	Zusammensetzung
Karbonatpuffer	0,05 M Na ₂ CO ₃ 0,05 M NaHCO ₃ ; pH 9,6
FACS-Puffer	5% FCS in PBS
PBS	137 mM NaCl 2,6 mM KCl 1,5 mM KH ₂ PO ₄ 8,1 mM Na ₂ HPO ₄ x 2H ₂ O; pH 7,2 Lagerung 4°C
PBS/EDTA	5 mM EDTA in PBS
TBS	10 mM Tris/HCL pH 8,0 150 mM NaCl
TBST	0,5% Tween20 in TBS

3. METHODEN

3.1 Molekularbiologische Methoden

3.1.1 RNA Methoden

Alle verwendeten Reagenzien und Inhaltsstoffe waren RNase frei. Alle Oberflächen und Materialien wurden mit RNase Away vorbehandelt, um eine RNase-freie Arbeit zu gewährleisten. Alle Puffer und Gele wurden mit DEPC behandeltem ddH₂O angesetzt.

3.1.1.1 Gesamt RNA Isolierung aus Zellen

Die Extraktion von Gesamt-RNA basiert auf der „single step“ Methode. Dabei wird das untersuchende Material mit einem GITC-haltigen Puffer (Guanidiniisothiocyanat) lysiert, wobei gleichzeitig auch enthaltene RNasen inaktiviert werden. Anschließend werden Proteine und kleine DNA Fragmente entfernt und die Gesamt-RNA isoliert. Für die Präparation von Gesamt-RNA wurde der RNeasy Mini Kit (Qiagen) verwendet. Dafür wurden zwischen 1×10^6 und 1×10^7 Zellen eingesetzt. Die Zellen wurden pelletiert und in 600 μ l RLT Puffer lysiert, dem zuvor 10 μ l β -Mercaptoethanol frisch hinzugefügt wurden. Das entstandene Lysat wurde auf eine QIAshredder-Säule überführt und für 2 min bei 16000 x g zentrifugiert, wodurch das Lysat homogenisiert und genomische DNA in Fragmente zerkleinert wurde. Anschließend wurden 600 μ l 70%igen Ethanol zugegeben, um die notwendigen Konditionen für eine RNA-Bindung an die Säulen-Matrix herzustellen. Der Ansatz wurde dann auf eine Qiagen-RNeasy Mini Säule überführt und für 1 min bei 16.000 x g zentrifugiert. Dabei wurde die RNA an das Säulenmaterial gebunden. Danach wurde die Säule mit 750 μ l Puffer RW1 und anschließend zweimal mit 500 μ l Puffer RPE gewaschen. Die RNA wurde mit 40 μ l RNase-freiem H₂O eluiert und bei -80°C gelagert.

3.1.1.2 Gesamt RNA Isolierung aus Tumorgeweben

Zur Isolierung der RNA aus Tumorgeweben der Maus wurden die Tumore zuvor homogenisiert. Frisch isolierte Tumore wurden in Flüssigstickstoff schockgefroren und danach bis zur Weiterverarbeitung bei -80°C gelagert.

Teflon-Schüttelbehälter und Metallkugeln wurden mit RNase Away Spray behandelt und anschließend mit Aqua bidest und Ethanol gespült und getrocknet. Zur Vorbereitung wurden alle Materialien wie Tumore aber auch Teflonbehälter, Metallkugeln und kleine Spatel in Flüssigstickstoff gekühlt. Ca. 3x3 mm große Tumorgewebsstücke wurden in den Teflonbehälter

zusammen mit einer Metallkugel gegeben und in einen Dismembrator gespannt. Eine Pulverisierung erfolgte nach ein bis zweimaliger Behandlung/Schüttlung für 30 s bei 30 Impulsen pro Sekunde. Das sorgfältig homogenisierte Gewebe wurde sofort in 500 µl RLT Puffer überführt. Dabei war darauf zu achten, dass die Gewebeproben nicht auftauen, da Temperaturschwankungen die Qualität der RNA erheblich beeinträchtigen können. Im Anschluss erfolgte eine Gesamt RNA Extraktion mit dem RNeasy Mini Kit (Qiagen) wie unter Kapitel 3.1.1.1.

3.1.1.3 Bestimmung der Qualität von Gesamt RNA

Die Qualität der Gesamt RNA wurde über eine Agarose-Gel-Extraktion bestimmt. Hierzu wurden 1 µl Gesamt RNA mit 4µl RNase freiem Aqua dest und 5µl 2x RNA Probenpuffer gemischt. Die Proben wurden für 10 min bei 70°C erhitzt und anschließend auf Eis gekühlt. Die RNA wurden auf ein ethidiumbromidhaltiges 1%iges Agarosegel geladen. Zusätzlich wurden 5 µl eines RNA-Standards mitgeführt. Das Gel wurde bei 80 V für 45 min angeschlossen. Im Anschluss erfolgte die Visualisierung und photographische Aufnahme unter UV Licht. Intakte 28S und 18S ribosomale RNA-Banden, in einer Ratio von 2:1, zeigten eine gute Qualität an.

3.1.1.4 cDNA-Synthese aus mRNA (Reverse Transkription)

Die Synthese von cDNA aus mRNA erfolgte mittels des First-Strand cDNA Kit (Fermentas). 11 µl einer Gesamt-RNA Präparation und 1 µl Oligo-dT-Primer wurden in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß vorgelegt und 5 min bei 70°C inkubiert. Nachfolgend wurde die Probe auf Eis gekühlt und kurz zentrifugiert. Pro Ansatz wurden 4 µl 5 x Reaction-Buffer, 1 µl RiboLock™ Ribonuklease Inhibitor und 2 µl 10 mM dNTP Mix zugegeben. Die Reaktionsmischung wurde vorsichtig gemischt, kurz abzentrifugiert und anschließend für 5 min bei 37°C inkubiert. Nach Zugabe von je 1 µl ReverdAid™ Minus Reverse Transkriptase erfolgte die Umschreibung der mRNA in cDNA bei 42°C für 60 min. Abschließend wurden die Proben bei 70°C für 10 min erhitzt, um die Enzyme zu denaturieren und die Reaktion zu stoppen. Eine Aufreinigung der cDNA erfolgte mittels MicroSpin G50-Säulen. Dadurch wurden Verunreinigungen durch Primer, Nukleotide, Salze und Enzymen entfernt. Für die Aufreinigung wurde das komplette Volumen der cDNA Synthese auf eine vorbereitete Säule getropft und für 1 min bei 3.500 x g in der Tischzentrifuge zentrifugiert. Die Konzentration der gereinigten cDNA wurde mittels NanoDrop gemessen und anschließend wurden die Proben bei -20°C gelagert.

3.1.1.5 Messung von DNA/RNA/cDNA Konzentration im NanoDrop Spektrometer

Die Bestimmung der Reinheit und Konzentration von RNA und DNA wurde an dem NanoDrop Spektrometer vorgenommen. Hierbei wurde die Absorption bei 260 nm Wellenlänge

gemessen. Dabei entsprach eine OD 260 von 1,0 in Falle von RNA einer Konzentration von 40 µg/ml, bei cDNA (einzelnsträngige DNA) einer Konzentration von 33 µg/ml und bei DNA (doppelsträngige DNA) einer Konzentration von 50 µg/ml. Die Reinheit wurde durch den Quotienten 260/280 nm bestimmt. Ein Quotient von 1,8 bis 2,0 gilt dabei als optimal.

3.1.1.6 Quantitative Echtzeit-Polymerasekettenreaktion (qRT-PCR)

Um Veränderung in der Expression eines Gens zu bestimmen, wurde die isolierte cDNA mittels quantitativer Echtzeit-Polymerasekettenreaktion (qRT-PCR, Quantitative RealTime PCR) vermessen. Das zugrundeliegende Prinzip ist die kontinuierliche Messung der Fluoreszenz der Amplifikationsprodukte. Ein zugegebener SYBR®-Green I Farbstoff interkaliert unspezifisch an doppelsträngige DNA. Da das gemessene Fluoreszenzsignal direkt proportional mit dem Amplifikationsprodukt ansteigt, ist es möglich, eine DNA Probe zu quantifizieren. Um eventuelle Volumenschwankungen durch Pipettierungenauigkeiten oder unterschiedliche Konzentrationen innerhalb der Reagenzien ausgleichen zu können, enthält der verwendete Reaktionsmix den passiven Fluoreszenzfarbstoff ROX, dessen Intensität durch die der SYBR®-Green-Fluoreszenz in der entsprechenden Probe dividiert wird. Neben dem gewünschten Template werden auch Dimere und Nebenprodukte aufgrund der unspezifischen Bindung von SYBR®-Green I markiert. Eine Unterscheidung zwischen Produkt und Primerdimeren erfolgt mittels Schmelzkurvenanalyse.

Die Quantifizierung der PCR basiert auf der Berechnung des Fluoreszenz-Schwellenwertes, dem so genannten Threshold-Cycle oder Ct-Wert. Der Ct-Wert ist der PCR-Zyklus, bei dem die Reporterfluoreszenz die Hintergrundfluoreszenz signifikant übersteigt. Die Quantifizierung der DNA-Menge beruht nicht auf absoluten Mengen an PCR-Produkt, sondern auf der Kinetik der Reaktion. Dafür nimmt man als Richtlinie den Ct-Wert, da zu diesem Zeitpunkt die Amplifikation exponentiell ist und es in dieser Phase der Reaktion keine limitierenden Faktoren, wie z.B. Primer- oder Nukleotidmangel, gibt. Für eine relative Quantifizierung wird als Standard ein Haushaltsgen (β -Aktin) gewählt, bei dem eine konstante Expression vorliegt. Die Menge an spezifischem Produkt wird dann auf die des Haushaltsgens bezogen. Für die relative Quantifizierung wurde zunächst der Δ Ct-Wert aus den Mittelwerten der Ct-Werte des zu quantifizierenden Gens und des Haushaltsgens bestimmt. Der Standardfehler des Δ Ct-Wertes ($SD\Delta Ct$) berechnet sich aus den jeweiligen Standardfehlern von Ziel- und Referenzgenen:

$$\Delta C_t = C_t (\text{Gen}) - C_t (\beta\text{-Aktin}) \quad SD\Delta C_t = \sqrt{(SDC_t (\text{Gen}))^2 + (SDC_t (\beta - \text{Aktin}))^2}$$

Methoden

Die Menge des zu quantifizierenden Gens wurde im Bezug zu einer Referenz (Kontrollbehandlung) normalisiert:

Die rel. Expression entspricht $2^{-\Delta\Delta C_t}$ wobei $\Delta\Delta C_t = \Delta C_t$ (Behandlung) - ΔC_t (Kontrolle) ist.

Daraus ergab sich für die endogene Referenz ein Wert von 1. Die zu quantifizierenden Gene errechneten sich relativ zu dem endogenen Referenz Wert = 1. Der Gesamtfehler (SD gesamt) ergibt sich dann durch folgende Rechnung:

$$SD_{gesamt} = 2^{-(\Delta\Delta C_t \pm SD_{\Delta\Delta C_t})}$$

Zur Durchführung der Real-Time PCR wurde zunächst jeweils ein Mastermix für das Zielgen sowie für das Haushalts-Gen separat hergestellt. Dieser bestand aus dem SYBR®-Green Mix, der bereits den passiven Fluoreszenzfarbstoff ROX, die AmpliTaq Gold® Polymerase und dNTPs enthielt sowie der zu analysierenden cDNA und bi-distilliertem Wasser. Die Berechnung erfolgte für jedes Gen in Triplikaten. Die Reaktion wurde in einem GeneAmp7300 durchgeführt.

Reaktionsansatz	1 µl cDNA (10ng pro Ansatz) 10 µl 2 x SYBR®-Green PCR-Master Mix je 1 µl Vorwärts- und Rückwärts-Primer 7 µl ddH ₂ O gemischt
PCR-Programm	2 min 50°C 10 min 95°C Je 40 Zyklen: 15 sec 95°C Denaturierung 1 min 60°C Hybridisierung

Zur Optimierung der Primerkonzentration wurden Vorwärts- und Rückwärtsprimer in verschiedenen Konzentrationen in einem Vorexperiment austitriert. Wenn nicht anders vermerkt, wurden die verwendeten Primer in einer Konzentration von 300 nM verwendet.

Die Realtime-Primer wurden mit der Software PrimerQuestSM von IDT entworfen. Im Anschluss erfolgte ein Abgleich mit dem humanen Genom, um ihre Genspezifität zu gewährleisten.

3.1.2 Genexpressionsanalyse

3.1.2.1 Probenvorbereitung und Durchführung der Hybridisierung

Die Probenvorbereitung erfolgte mit Gesamt RNA aus humanen Tumorproben Xenograft-transplantierte Mäuse. Zur Qualitätskontrolle wurde die RNA nach Vermessung am Nanodrop im RNA Nano Chip Assay am Agilent 2100 Bioanalyzer analysiert. Die Synthese der biotinylierten cRNA Proben zur Hybridisierung auf Illumina Human Sentrix-6 Version 3 BeadChip® Arrays erfolgte gemäß des empfohlenen Protokolls von Illumina (Van Gelder et al., 1990). Illumina entwickelte 2003 eine Bead basierende Technologie zur komplexen Gen Expressionsanalyse (Gunderson et al., 2004). Auf einen Silikonträger sind 3 µm große Beads angebracht. Auf ihrer Oberfläche sind die jeweiligen 50mer Oligonukleotidproben kovalent gebunden. Jedes Bead trägt dabei mehr als 700.000 Kopien eines Oligomers, welches ein Gen repräsentiert. Jedes Transkript ist im Schnitt 30 mal als Bead vertreten. Pro Test werden 48803 humane Transkripte, Varianten und EST analysiert. Somit deckt die Analyse eines Tests das gesamte humane Genom ab. Der Human Sentrix-6 Version 3 BeadChip besitzt pro Chip 6 Tests, sodass 6 verschiedene Proben auf einem Chip gemessen werden können. Dies minimiert die technischen Abweichungen.

Die Durchführung der cDNA Präparierung und die anschließende Hybridisierung und Qualitätskontrolle erfolgte in der Genomic & Proteomic Core-Facility (DKFZ Heidelberg). Die so generierten Datensätze wurden zur Analyse der differentiell regulierten Gene verwendet.

3.1.2.2 Computerunterstützte Datenanalyse

Zur Analyse der Daten wurden zuerst die Ausreißer entfernt, indem nur Beads mit einem Wert > 20 in die Analyse eingeschlossen wurden. Anschließend wurde die 2,5 MAD (median absolute deviation) Regel angewendet. Die mittlere absolute Abweichung berechnet sich durch:

$$\text{MAD} = \text{Median}_i (| X_i - \text{Median}_j (X_j) |)$$

Wobei X (in einer Population von X_1 - X_n) die Expression eines Beads innerhalb einer spezifischen Transkripts (ProbeID) darstellt.

Wenn für X gilt: $\text{abs}((x - \text{Median}) / \text{MAD}) > 2.5$

galten sie als Ausreißer und wurden aus der Analyse entfernt. Der Expressionswert der Transkripte entsprach dann dem Mittelwert der übriggebliebenen Beads. Diese so bearbeiteten Datensätze wurden dann im Chipster Software Programm (Version 1.3, Finnish IT

Center for Science CSC) analysiert. Es erfolgte eine Quantil-Normalisierung der Daten, so dass alle Expressionswerte derselben Distribution folgen (Abb. 3.1).

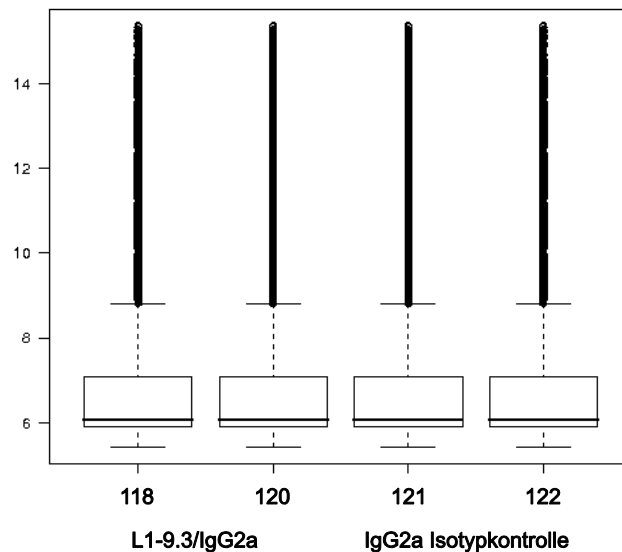


Abbildung 3.1: Quantil-Normalisierung der Expressionsdaten. Die Normalisierung erfolgte mit Hilfe der Software Chipster, und dient dazu die Werte der einzelnen Proben vergleichbar zu machen. 118 und 120 sind Tumore der L1-9.3/IgG2a Gruppe. 121 und 122 sind Tumorproben aus der Kontrollgruppe.

Die generierten Daten sind nach MIAME Standard (Minimum information about a microarray experiment) produziert worden und sind über Gene Expression Omnibus GEO (NCBI) öffentlich unter der Accession Nummer GSE19171 zugänglich. Differenziell regulierte Gene wurden über die Standardabweichung vom Mittelwert des Genes in allen Proben filtriert. Dabei wurden nur solche Gene selektioniert, welche einen Expressionswert grösser/kleiner als die dreifache Standardabweichung besaßen.

Zur Analyse der funktionellen Gruppierung wurden die differenziell regulierten Gene in dem DAVID Software Programm (Database for annotation, visualization and integrated discovery) analysiert. DAVID berechnet über eine Algorithmusfunktion die Signifikanz der funktionellen Anreicherung der Gene in einem Signalweg. Der ermittelte EASE Score ist hierbei eine Abwandlung des Fisher Exakt P-Wertes. Er bestimmt die Signifikanz der berechneten Funktion innerhalb der differenziell regulierten Gene. Ein p-Wert kleiner 0,05 wurde hierbei als signifikant angesehen. Die Berechnung erfolgte mit größtmöglicher Stringenz (Highest Threshold).

3.1.3 Herstellung von Fc-Fusionsproteinen

Es wurden L1-Fc-chimäre Moleküle hergestellt, die verschieden lange Immunglobulin-Domänen des humanen L1-Moleküls sowie die gesamte Ektodomäne des L1-Moleküls

umfassten. Des Weiteren wurde auch ein CHL1-Fc Fusionsprotein hergestellt. Hierfür wurden die Konstrukte mittels PCR amplifiziert und in den pIG1 Vektor kloniert. Im Anschluss wurde die Richtigkeit der Konstrukte im Verdau und mittels Sequenzierung verifiziert. Die Methodik ist in Einzelschritten im Folgenden beschrieben.

3.1.3.1 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Für die Konstruktion der verschiedenen Fusionsproteine wurden zunächst die entsprechenden Regionen im L1 bzw. CHL1 Molekül in einer PCR-Reaktion amplifiziert.

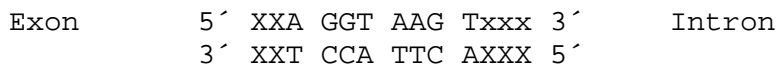
Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR = polymerase chain reaction) stellt eine sehr sensitive Methode zur spezifischen Amplifikation von DNA-Sequenzen dar. In mehreren Zyklen folgt auf eine Hitzedenaturierung der zu amplifizierenden DNA die Hybridisierung eines spezifischen Oligonukleotidprimer-Paares an die komplementären Sequenzen der Matrizen-DNA. An die freien Hydroxylgruppen der Primer werden durch die Polymerase komplementäre Nukleotide angeheftet und so die DNA-Sequenz zwischen beiden Primern aufgefüllt, wobei die neu synthetisierte DNA im nächsten Zyklus wiederum als Matrize für die weitere Amplifizierung dient.

Tabelle 3.1: PCR-Reaktionsansätze und Programm-Wahl.

	PCR Ansatz		PCR Programm	
L1 Konstrukte	10 ng	pCDNA3-L1a (Plasmid-DNA)	95°C 5:00 min	1 Zyklus
	100 ng	Primer for	95°C 1:00 min	
	100 ng	Primer rev	63°C 1:00 min	35 Zyklen
	5 µl	10x Reaktionspuffer	72°C 2:30 min	
	1 µl	dNTP-Mix (25 mM)	72°C 7:00 min	1 Zyklus
CHL1 Konstrukt	100 ng	CHL1 Plasmid-DNA	98°C 2:00 min	1 Zyklus
	100 ng	Primer for	98°C 0:30 min	
	100 ng	Primer rev	59,5°C 0:30 min	35 Zyklen
	10 µl	5x Reaktionspuffer (GC)	72°C 2:00 min	
	1 µl	dNTP-Mix (25 mM)	72°C 7:00 min	1 Zyklus

Als Template DNA diente die klonierte humane neuronale L1 Sequenz (pcDNA3-L1A) bzw. eine synthetisch hergestellte und klonierte CHL1 Sequenz (Plasmid). Die Primer wurden so konstruiert, dass das resultierende PCR Produkt am 5'-Ende eine HindIII- und am 3'-Ende eine EcoRI-Schnittstelle besaßen. Zusätzlich wurde am 3'-Ende eine künstliche Spleiß-Donor-Stelle

eingebaut. Hierfür sollte die Sequenz so gewählt werden, dass das letzte Codon der Molekülsequenz mit einem A endet, worauf dann die Spleißstelle folgt:



Die Reaktionsansätze für die PCR wurden nach Empfehlung des Herstellers der DNA-Polymerasen pipettiert (Tabelle 3.1). Die Reaktion wurde am Thermo Cycler durchgeführt.

3.1.3.2 Agarose-Gelelektrophorese von Nukleinsäuren

DNA-Produkte wurden nach PCR-Reaktion oder Enzymverdau in 0,8-1,0%-igen Agarosegelen in TAE-Puffer aufgetrennt; der Gellösung wurden 0,1 µg/ml Ethidiumbromid zugesetzt. Die DNA wurde mit einem entsprechenden Volumen 6x Probenpuffer vermischt und aufgetragen. Die elektrophoretische Auftrennung erfolgte bei 80-100 V für 30 bis 50 min. Als Größenstandard dienten DNA-Molekulargewichtsmarker entsprechend der zu erwartenden Bande. Die DNA konnte durch Einlagerung des Ethidiumbromids in die Doppelhelix unter UV-Licht ($\lambda = 254 \text{ nm}$) sichtbar gemacht werden.

50 x TAE-Elektrophoresepuffer	242 g Tris
	57,1 ml Eisessig
	100 ml 0,5 M EDTA pH 8,0
	ad 1 l ddH ₂ O
	pH einstellen auf 8,5

3.1.3.3 Restriktionsverdau von DNA

Der Restriktionsverdau von DNA diente entweder dem Nachweis bestimmter DNA-Fragmente oder dem Klonieren von DNA-Fragmenten. Der Restriktionsverdau von Plasmid-DNA fand in einem Reaktionsvolumen von 20-40 µl statt. Dabei wurden mindestens 2 U Enzym/µg DNA unter den dem jeweiligen Enzym entsprechenden Pufferbedingungen eingesetzt, wobei der Verdau in der Regel für 2 h bei 37°C durchgeführt wurde. Beachtet wurde dabei, dass auf je 10 µl Reaktionsansatz nur 1 µl Enzym eingesetzt wurde, um eine inhibitorische Wirkung des Glycerins im Enzymverdünnungspuffer zu neutralisieren. Anschließend wurden die verdauten DNA-Fragmente in einem Agarosegel aufgetrennt und analysiert oder zur weiteren Verarbeitung ausgeschnitten. Zur Konstruktion der Fc-Fusionsproteine wurden die PCR-Produkte mit HindIII und EcoRI verdaut. Der pIG Vektor wurde dafür mit HindIII und EcoRI linearisiert.

3.1.3.4 DNA-Isolierung aus einem Agarose-Gel

Zur Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen wurden die Reagenzien des QIAquick-Gel-Extraktionskits (Qiagen) verwendet. Die DNA-Bande von Interesse wurde unter langwelligem UV-Licht aus dem Gel geschnitten und in einem Eppendorf-Röhrchen mit dem dreifachen Volumen Puffer QG bei 50°C aus dem Gel gelöst. Um die DNA an eine Matrix binden zu lassen, wurde der Ansatz auf eine QIAquick-Säule gegeben und für 1 min bei 16000 x g in der Eppendorf-Tischzentrifuge zentrifugiert. Anschließend wurde die Säule mit 750 µl Puffer PE gewaschen. Um Alkoholreste zu entfernen, wurde die Säule noch einmal bei 16000 x g in der Tischzentrifuge für 1 min zentrifugiert und dann auf ein frisches Eppendorf-Röhrchen gesetzt. Nun wurden 30 µl ddH₂O auf die Säule gegeben und für 1 min inkubiert, durch einen weiteren Zentrifugationsschritt wurde die DNA von der Säule eluiert.

3.1.4 Klonierung

Die gereinigten DNA-Fragmente wurden durch Ligation in den linearisierten pIG1 Vektor inseriert und nachfolgend in kompetente One Shot® Top10/P3 Bakterienzellen (Invitrogen) transformiert. Diese Bakterien besitzen das P3 Plasmid und werden für Vektoren benutzt, welche das synthetische SupF Gen kodieren. P3 ist ein low copy Plasmid, welches die Antibiotika Resistenzen Kanamycin, Tetrazyklin und Ampicillin trägt. Das Kanamycin Gen ist vollständig, und wird zur Selektion von P3 haltigen Zellen genutzt. Die anderen beiden Resistenzgene besitzen eine Amber Mutation und liegen somit vorerst inaktiv vor. Durch eine Transformation eines Plasmids mit einem Suppressor F Gen wird diese Mutation unterdrückt, wodurch es zur Bildung der Resistenz gegen Tetrazyklin und Ampicillin kommt.

3.1.4.1 Vektor-Dephosphorylierung

Der pIG1 Vektor wurde vor der Ligation mit SAP (shrimp alkaline phosphatase) dephosphoryliert, um eine Religation des Vektors ohne Insert zu vermeiden. Dazu wurden 1 µg des Vektors mit 4 µl 4x SAP-Puffer und 2 µl FastAP in einem Endvolumen von 40 µl für 10 min bei 37°C inkubiert. Die Inaktivierung der Phosphatase erfolgte bei 75°C für 5 min. Anschließend erfolgte eine Ligation.

3.1.4.2 Ligation

Bei der DNA-Ligation wurden das isolierte Insert und der linearisierte Vektor zusammengefügt. Insert und Vektor wurden im molaren Verhältnis von 3:1 verwendet. 50 ng des pIG1 Vektors und 100ng Inserts mit 1 µl T4-Ligase (Fermentas), 1 µl 10x Ligase-Puffer in einem Gesamtvolumen von 10 µl versetzt und für mindestens 4 h bei 16°C ligiert. Durch einen

gerichteten Verdau mit zwei spezifischen Endonukleasen wurde die Orientierung des Inserts bestimmt.

3.1.4.3 Chemische Transformation kompetenter Bakterien

Anschließend wurde das neu entstandene Fusionsprodukt in Bakterien transformiert und amplifiziert. Für dieses Transformationsverfahren wurden One Shot® TOP10/P3 (Invitrogen) verwendet. Jeweils 25 µl der kompetenten Bakterien wurden 10 min auf Eis aufgetaut und mit der zu transformierenden DNA (5-10 µl des Ligationsansatzes) für 30 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurden die Bakterien für exakt 30 s bei 42°C erhitzt und sofort für 2 min auf Eis abgekühlt. Nach Zugabe von 250 µl SOC-Medium, das auf 37°C vorgewärmt worden war, wurden die Bakterien 1 h bei 37°C geschüttelt. Daraufhin wurden 100 µl des Transformationsansatzes auf LB-Platten mit dem entsprechenden Antibiotikum (Ampicillin und Tetrazyklin) ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert. Bakterien, die durch Aufnahme des Vektors die entsprechende Antibiotikaresistenz erworben hatten, bildeten Kolonien, die gepickt, expandiert und zur Plasmid-DNA-Isolierung genutzt werden konnten.

Luria-Bertani-Medium (LB)	1,0% Bactotrypton 0,5% Hefeextrakt 0,5% NaCl
Antibiotika	50 µg/ml Ampicillin, 10 µg/ml Tetrazyklin
LB-Agar-Platten	15 g Agar pro Liter LB-Medium
SOB-Medium	2,0% Bactotrypton 0,5% Hefeextrakt 10 mM NaCl 2,5 mM KCl 10 mM MgCl ₂ 10 mM MgSO ₄
SOC-Medium	SOB-Medium + 20 mM Glukose

3.1.5 Lagerung von Bakterienkulturen

Um Bakterienkulturen über einen längeren Zeitpunkt aufbewahren zu können, wurden diese mit 20% Glycerin versetzt und zur Durchmischung vorsichtig über Kopf gedreht. Die so hergestellten Stocklösungen wurden anschließend bei -70°C eingefroren.

3.1.6 Präparation von Plasmid-DNA

Die Isolierung von Plasmid-DNA aus Bakterien erfolgte entsprechend der erforderlichen Menge über eine Minipräparation oder eine Maxipräparation. Die Methode basiert auf der alkalischen Lyse von Bakterien mit anschließender Adsorption der Plasmid-DNA an eine Kieselgelmatrix bei hoher Ionenstärke. Zellwandgebundene chromosomale DNA wird unter den angewendeten Lyse- und Neutralisationsbedingungen mit unlöslichen Komplexen aus Salzen und Proteinen kopräzipitiert, während die Plasmid-DNA im klaren Überstand bleibt. Dafür wurde zunächst jeweils eine Einzelkolonie in der zur Präparation erforderlichen Menge LB-Medium mit Antibiotikum angeimpft und über Nacht im 37°C-Schüttler inkubiert.

3.1.6.1 Minipräparation von Plasmid-DNA

Zur Isolation geringer Mengen an Plasmid-DNA aus transformierten Bakterien wurde der QIAprep Spin Miniprep Kit (Qiagen) verwendet. Zunächst wurde eine Einzelkolonie der transformierten Bakterien mit einer sterilen Pipettenspitze in 5 ml LB-Medium mit dem entsprechenden Antibiotikum überführt und über Nacht bei 37°C geschüttelt. Bei der anschließenden Präparation wurde genau nach Herstellerangaben verfahren. Die Plasmid-DNA wurde in 30 µl ddH₂O eluiert.

3.1.6.2 Maxi-Präparation von Plasmid-DNA

Für die Maxi-Präparation der Plasmid-DNA wurden die Reagenzien des Plasmid Maxi Kit (Qiagen) verwendet. Maxi-Präparationen von Plasmid-DNA waren nötig, um genügend Material für spätere Transfektionen zu erhalten. 500 ml einer Übernachtskultur wurden pelletiert (GSA-Rotor, 4°C, 6000 rpm, 5 min) und in 10 ml Puffer 1 resuspendiert. Nach Zugabe von 10 ml Puffer 2 zur Lyse der Bakterien wurde der Ansatz vorsichtig geschüttelt und nicht länger als 5 min bei RT inkubiert. Anschließend wurden 10 ml Puffer 3 zur Neutralisation zugegeben, vorsichtig geschüttelt und 20 min auf Eis inkubiert. Nach Zentrifugation (SS34-Rotor, 4°C, 45 min, 16000 rpm) wurde der klare Überstand auf eine Qiagen-Säule 500 pipettiert, die zuvor mit 10 ml QBT-Puffer äquilibriert worden war. Die Säule wurde zweimal mit 30 ml QC-Puffer gewaschen und die Plasmid-DNA anschließend mit 15 ml QF-Puffer eluiert. Durch Zugabe des 0,7-fachen Volumens Isopropanol wurde die DNA präzipitiert. Die Plasmid-DNA wurde pelletiert (SS34-Rotor, 4°C, 30 min, 11000 rpm) und mit 5 ml 70%-igem Ethanol gewaschen. Das Pellet wurde an der Luft getrocknet und in 200 µl TE-Puffer gelöst.

3.2 Zellbiologische Methoden

3.2.1 Kultivierung von Zellen

Die adhärenent wachsenden Zelllinien wurden in einer Dichte bis ca. 1×10^7 Zellen/ml im adäquaten Medium (Tabelle 3.2) in Plastikkulturflaschen bei 37°C, 95% Luftfeuchtigkeit und 5% CO₂ kultiviert und alle 2 bis 3 Tage, je nach Konfluenz, passagiert. Dazu wurden die Zellen mit 5 mM EDTA/PBS 10 min bei 37°C inkubiert und durch leichtes Schlagen der Zellkulturflasche vom Boden abgelöst. Abschließend wurden die Zellen durch Zentrifugation bei 300 x g pelletiert und in der gewünschten Dichte in Wachstumsmedium ausgesät.

Tabelle 3.2: Medienzusammensetzungen. Verwendete Medien für die Zellkultur.

Medium	Zusammensetzung	Zelllinien
DMEM	DMEM, 10% FCS, 2 mM L-Glutamin, 4,5 g/L D-Glukose, 3,7 g/ml NaHCO ₃	SKOV3ip, OVMz, Panc-1, Capan-1, Colo357, weitere Ovarialkarzinomzelllinien, Kolonkarzinomzelllinien
RPMI1640	RPMI 1640, 10% FCS, 2mM L-Glutamin 2 g/ml NaHCO ₃	PT45res,
HT1080 Medium	DMEM, 10% FCS, 2 mM L-Glutamin, 10 mM Hepes und 2 ml pro I Medium Arg/Asp (2.9 g L-Arginin + 0.9 g L-Asparagin in 50 ml H ₂ O bidest lösen)	HT1080
DMEM/F12	DMEM/F12 , 10% FCS, 2 mM L-Glutamin	IK, ECC-1, Hec1A

3.2.2 Einfrieren und Auftauen von Zellen

Zur Kryokonservierung wurden $3-5 \times 10^6$ Zellen in 900µl FCS und 100µl DMSO aufgenommen und in Kryoröhrchen überführt. Die Kryoröhrchen wurden bei -70°C eingefroren und zur Langzeitlagerung nach 24 h in flüssigen Stickstoff überführt.

Das Auftauen der Zellen erfolgte zügig bei 37°C. Nach einmaligem Waschen in vorgewärmtem Kulturmedium wurden die Zellen in frischem Kulturmedium ausgesät.

3.2.3 Bestimmung von Zellzahl und Vitalität

Die Zelldichte einer Zellsuspension wurde mit Hilfe des Computer-unterstützten Casy® Zellzählers bestimmt. Eine Zellsuspension wird in 10 ml Casiton 1:1000 verdünnt und am Casy® vermessen. Dabei werden Zellen in einem Flüssigkeitsstrom an einem Lichtstrahl vorbeigeführt. Die Unterbrechung des Lichts wird quantifiziert und durch die Dauer der

Unterbrechung kann zusätzlich die Zellgröße bestimmt werden. Aufgrund der zugeordneten Zellgröße können dann Zelldebris und tote Zellen aus der Auswertung ausgenommen werden.

Für kleine Zellen wurde die Zellbestimmung in der Neubauerzählkammer durchgeführt. Die Bestimmung der Zellzahl erfolgte nach Anfärben der toten Zellen mit 0,16% Trypanblau, 0,9% NaCl in einer Neubauer Zählkammer.

3.2.4 Transfektion mittels jetPEI™

JetPEI ist ein kationisches Polymer aus Polyethylenimin, welches in komplexierter Form mit DNA mittels Endocytose in die Zelle gelangt. JetPEI verpackt DNA in positiv geladene Partikel, die somit in die Lage versetzt werden, mit anionischen Proteoglykanen auf der Zelloberfläche zu interagieren und durch Endozytose aufgenommen zu werden. Die Transfektion erfolgte nach Herstellerangaben. Für eine 10 cm Schale wurden 8 µg Plasmid-DNA mit 500 µl 150 mM NaCl und 20 µl jetPEI-Lösung mit 500 µl 150 mM NaCl gemischt. Beide Komponenten wurden 5 min bei RT inkubiert und anschließend wurde das jetPEI-Gemisch zur DNA-Suspension gegeben. Nach 30 min Inkubation wurde die Transfektionslösung tropfenweise zu den Zellen gegeben. 5×10^6 Zellen wurden dafür am Vortag in eine 10 cm Schale ausgesät. Vor der Transfektion wurde den Zellen 8 ml frisches Komplettmedium gegeben. Eine Transfektion erfolgte für 48 h bei 37°C und 5% CO₂. Zur stabilen Transfektion des Luciferasekonstrukts in SKOV3ip Zellen erfolgte im Anschluss eine Selektion mit 700 µg/ml Hygromycin B.

Zur transienten Transfektion der verschiedenen Fc-Konstrukte wurden COS-7 Zellen verwendet. Für die Transfektion wurde 1%iges IgG-depletierendes FCS in Medium vorgelegt. Zwei Tage nach Transfektion wurde das Medium abgenommen und zur Lagerung bei 4°C mit 0,1% Natriumazid versetzt. Es erfolgten 2 weitere Mediumabnahmen an Tag 4 und Tag 6 nach Transfektion. Das im Überstand enthaltene Fc-Fusionsprotein wurde über eine Protein-A-Sepharose Säule gereinigt.

3.2.5 Durchflusszytometrie

Die Durchflusszytometrie ist ein Verfahren, bei dem Zellen in einem Flüssigkeitsstrom phänotypisch charakterisiert und quantifiziert werden können. Dabei geben Unterschiede in Lichtbeugung und Lichtstreuung Aufschluss über Größe sowie Granularität der Zellen. Mit Hilfe von Fluorochrom-konjugierten Antikörpern können definierte Zelloberflächenstrukturen oder intrazelluläre Proteine markiert und untersucht werden. In einem Flüssigkeitsstrom der an einem Laserstrahl vorbeigelenkt wird, verursachen die Zellen eine Lichtstreuung, die zellgebundene Fluorochrome zur Fluoreszenzstrahlung anregt. Die Photomultiplier detektieren

das gestreute Licht, welches über Größe und Granularität der Zellen Auskunft gibt. Die Fluoreszenzstrahlung, welche die Expression von Antigenen auf der Zelloberfläche bzw. im Zellinnern nachweist, wird zusätzlich detektiert. Die Fluoreszenz wurde mit Hilfe des Durchflusszytometers FACSCantoll bestimmt. Je nach Experiment wurden 3×10^4 bis 1×10^5 Ereignisse aufgenommen und anschließend mittels FlowJo-Software analysiert.

Pro Ansatz wurden 1×10^5 - 2×10^6 Zellen zweimal mit eiskaltem FACS-Puffer (je 500 μ l) gewaschen. Die Zellsedimente wurden dann in 100 μ l (2,5 mg/ml) Endobulin aufgenommen und für 10 min auf Eis inkubiert. Endobulin enthält humanes IgG, welches Fc-Rezeptoren und somit unspezifische Bindungsstellen für die Fluoreszenz-konjugierten Antikörper absättigt. Die Zellen wurden anschließend einmal mit eiskaltem FACS-Puffer (je 500 μ l) gewaschen und in 1 μ g Antikörper in 100 μ l FACS-Puffer für 30 min auf Eis inkubiert. Überschüssige Antikörper wurden dann durch zweimaliges Waschen mit 500 μ l FACS-Puffer entfernt. Bei einer indirekten Färbung erfolgte eine weitere Inkubation mit dem Zweitantikörper. Hierfür wurden 100 μ l des entsprechenden sekundären Antikörpers zu den Zellen gegeben und für 30 min auf Eis inkubiert. Bei direkten Färbungen wurden die Zellen direkt nach zweimaligem Waschen mit 500 μ l FACS-Puffer in 200 μ l FACS-Puffer aufgenommen. Der Nachweis von toten Zellen erfolgte mittels Propidiumiodid-Inkorporation. Propidiumiodid (PI) ist ein fluoreszierender aromatischer Kohlenwasserstoff, der von spät-apoptotischen sowie nekrotischen Zellen nach einsetzender Permeabilisierung der Zellmembran inkorporiert wird und schließlich in die DNA interkaliert. PI kann sowohl zur Ermittlung der Anzahl toter Zellen innerhalb einer Gesamtpopulation als auch zum Ausschluss toter Zellen bei der Analyse definierter Oberflächenmoleküle herangezogen werden. Nach der Inkubation mit Fluoreszenz-markierten Antikörpern wurde kurz vor der Messung im Durchflußzytometer 1 μ g/ml PI zugegeben und die Zellen für ca. 1 min inkubiert.

3.2.6 Isolierung von peripheren mononukleären Zellen (PBMC)

Durch Zentrifugation über einen Ficoll-Dichtegradienten konnten die peripheren mononukleären Zellen (Peripheral Blood Mononuclear Cell; PBMC) aus humanem Vollblut von den übrigen hämatopoetischen oder von abgestorbenen Zellen isoliert werden. Das Vollblut wurde aus der Blutbank (Universität Heidelberg) bezogen. Das Probenmaterial wurde mit PBS im Verhältnis 1:1 gemischt. 15 ml vorgelegtes Ficoll wurde vorsichtig mit 25-30 ml der verdünnten Suspension überschichtet und bei einer Temperatur von 18°C für 40 min mit 760 x g ohne Bremse zentrifugiert. Die Interphase wurde in ein neues Falcon-Röhrchen pipettiert, mit PBS auf 40 ml aufgefüllt und erneut mit 560 x g für 20 min zentrifugiert. Das Zellpellet wurde anschließend noch zweimal in PBS gewaschen (15 min bei 250 x g) und in einer

adäquaten Menge PBS aufgenommen. Die Lebendzellzahl wurde in der Neubauerkammer bestimmt. Die so isolierten Zellen wurden im Zytotoxizitätstest eingesetzt.

3.2.7 ⁵¹Chrom-Zytotoxizitätsmessung

Im Antikörper-abhängigen-zellulären-Zytotoxizitätstest (antibody dependent cell cytotoxicity; ADCC) werden Zielzellen wie z.B. Tumorzellen durch die Inkorporation radioaktiven Chroms markiert und anschließend durch Antikörperbehandlung und Inkubation mit Effektorzellen spezifisch lysiert. Das aus den markierten Zellen ins Medium freigesetzte radioaktive Chrom dient als Maß für die Zelllyse.

5×10^5 SKOV3ip wurden mit 100 μCi radioaktivem Natriumchromat ($\text{Na}^{51}\text{CrO}_4$) zuvor 1 h bei 37°C markiert. Nach zweimaligem Waschen mit Medium wurden jeweils 5×10^3 Zellen pro Loch in eine 96-Loch-Rundbodenplatte ausgebracht. Zur Vermittlung der Lyse wurden verschiedene L1 mAk eingesetzt. Sie wurden in verschiedenen Konzentrationen (1 $\mu\text{g/ml}$, 5 $\mu\text{g/ml}$, 10 $\mu\text{g/ml}$) für 30 min bei RT mit den Zielzellen prä-inkubiert. Als Effektorzellen dienten aus humanem Vollblut isolierte PBMCs. Diese wurden im Verhältnis 50:1 von Effektor- zu Zielzellen eingesetzt. Nach 4 h Inkubation bei 37°C und 5% CO_2 Atmosphäre wurden 50 μl Überstand von den Ansätzen auf eine Luma-Platte überführt und über Nacht getrocknet. Die Aktivität der Überstände wurde am nächsten Tag in einem Top-Count-Platten-Szintillationsmessgerät vermessen (pro Ansatz wurde 1 min gemessen; cpm).

3.2.8 Zelladhäsion auf gereinigtem Substrat

Beim Zellbindungsassay wird die Fähigkeit der Zellen, an ein Substrat zu binden, untersucht.

Die als Substrat dienenden Proteine (L1-Fc, Fibronectin) wurden in einer Konzentration von 10 $\mu\text{g/ml}$ in TBS pro Kammer über Nacht bei 4°C an einen 8-Loch-Glaskammer-Objektträger adsorbiert. Freie Bindungsstellen wurden anschließend mit einer 1%igen BSA-Lösung in TBS für 60 min bei RT blockiert. L1 transfizierte J558-L1 Suspensionszellen wurden in PBS gewaschen und je 1×10^5 Zellen mit je 20 μg des jeweiligen Antikörpers in 200 μl RPMI Medium 1% BSA (ohne FCS) bei 37°C 10 min vorinkubiert. Nach dreimaligem Waschen der Glaskammern mit RPMI Medium 1% BSA (ohne FCS), wurden die Zellsuspensionen in die Kammern gegeben und für 30 min bei 37°C inkubiert. Ungebundene Zellen wurden durch vorsichtiges Abheben des Plastikaufsatzes vom Objektträger ab gespült. Anschließend wurde der Objektträger in PBS vorsichtig gewaschen und auf Eis in 2% Glutaraldehyd in PBS für 30 min fixiert. Es folgte eine mikroskopische Analyse mit Bildaufnahme und Auszählung der Zellen.

3.3 Biochemische und immunologische Methoden

3.3.1 Herstellung von Zelllysaten

Zur Proteinisolierung von adhären Zellen wurden diese zunächst mit 5 mM EDTA/PBS aus der Zellkulturflasche gelöst und für 5 min bei 300 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das Zellpellet in PBS gewaschen und für 5 min bei 300 x g zentrifugiert. Das Zellpellet wurde in 100 µl Lysepuffer resuspendiert und für 30 min auf Eis inkubiert. Durch Zugabe von Protease- und Phosphatase-Inhibitoren zum Lysepuffer wurde ein Proteinabbau beziehungsweise die Dephosphorylierung durch die bei der Zellyse freigesetzten intrazellulären Proteasen und Phosphatasen verhindert. Daraufhin wurde das Lysat für 10 min bei 16.000 x g und 4° C zentrifugiert, um unlösliche Zellbestandteile zu sedimentieren. Der Überstand mit den solubilisierten Proteinen wurde in ein neues Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt und, je nach Volumen des Lysats, mit einer entsprechenden Menge vierfach konzentrierten SDS-Probenpuffers, dem je nach Fragestellung β-Mercaptoethanol zugesetzt war, für 5 min bei 95°C aufgeköcht und anschließend auf Eis abgekühlt.

Lysepuffer	1% Triton X-100 in TBS Complete Mini (enthält Protease-Inhibitoren) : 1 Tablette in 10 ml lösen
------------	--

3.3.2 Proteinbestimmung

Die Bestimmung der Proteinkonzentration erfolgte mit Bicinchoninsäure (BCA). Hierbei handelt es sich um eine modifizierte Biuretmethode. Es reagieren zweiwertige Kupferionen in alkalischer Lösung quantitativ mit Protein zu einwertigen Kupferionen. Diese geben mit der Bicinchoninsäure einen violetten Farbstoff, dessen Absorption bei einer Wellenlänge von 562 nm photometrisch gemessen werden kann. Die Durchführung der Proteinbestimmung erfolgte nach Herstellerangaben mit dem BCA Protein Kit (Pierce) in 96-Lochplatten-Format.

3.3.3 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese von Proteinen (SDS-PAGE)

Die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) dient der Auftrennung von Proteinen im elektrischen Feld. Eine Auftrennung erfolgt dabei nach dem Molekulargewicht. Die Proteine werden hierfür mit Natriumdodecylsulfat (SDS) behandelt. Dieses starke ionische Detergenz überdeckt durch Anlagerung an das Protein die Eigenladung, was zu einer negativen Ladung aller Proteine führt. Unterschiede in der Wanderung von Proteinen im elektrischen Feld werden jetzt nur noch durch die Porengröße des Gels bestimmt. Im oberen Sammelgel werden die Proteine zu einer schmalen Bande konzentriert und dann im Trenngel nach ihren

Molekulargewichten getrennt. Die Lösung für das Trenngel wurde wie folgt hergestellt. Nach Zugabe von APS und TEMED startete die Polymerisation. Um einen geraden Abschluss zu erhalten, wurde das Trenngel mit gesättigtem Isobutanol überschichtet. Nach vollständiger Polymerisation des Trenngels wurde das Alkoholgemisch entfernt. Die Sammelgellösung wurde angesetzt und auf das Trenngel gegossen. Vor der Polymerisation wurde der Probenkamm eingesetzt. Nach dem Entfernen des Kamms wurde das Gel in die Elektrophoresekammer eingespannt und mit 1 x Laufpuffer überschichtet. 20-30 µl der mit 4x SDS-Probenpuffer versetzten und 5 min bei 95° C erhitzten Proben wurden in die Taschen gegeben. Als Größenstandard wurde ein Molekulargewichtsmarker mitgeführt. Die Elektrophorese der Proteine erfolgte bei einer Einlaufspannung für das Sammelgel von 80 V für 10 min und eine Laufspannung für das Trenngel von 140 Volt. Nach Erreichen der gewünschten Auftrennung wurde das Gel im Western Blot weiterverarbeitet.

Acrylamidlösung (Carl Roth)	30% Acrylamid, 0,8% N,N'-Methylbisacrylamid
Trenngel 10%	6,7 ml 30% Acrylamidlösung 2,65 ml 3 M Tris-HCl pH 8,0, 9,63 ml ddH ₂ O, 200 µl 10% SDS 65 µl 10% APS 15 µl TEMED
Sammelgel	1,35 ml 30% Acrylamidlösung 2,5 ml 0,5 M Tris-HCl pH 6,8 6 ml ddH ₂ O 100 µl 10% SDS 100 µl 10% APS 10 µl TEMED
4x Probenpuffer	4x NuPAGE Sample Buffer (Invitrogen) β-Mercaptoethanol (14,3 M)
Laufpuffer	25 mM Tris-HCl pH 8,3 0,19 M Glyzin 0,1% SDS

3.3.4 Western Blot

Der Western Blot dient dazu, die im SDS-PAGE aufgetrennten Proteine auf eine Membran zu übertragen. Im Anschluss kann das Protein auf der Membran mittels Immundetektion nachgewiesen werden.

Im Anschluss an die elektrophoretischen Auftrennung wurden die Proteine in einem halbtrockenen Blot (semi-dry) auf eine Polyvinylidendifluorid-Membran (PVDF) transferiert. Vor dem Aufbau wurden alle Materialien in Blotpuffer getränkt. Die wasserabweisende Membran wurde hierfür zuvor in Methanol befeuchtet. Der Reihenfolge nach wurden drei Whatmann-Filter blasenfrei auf die positive Anode einer Blot-Apparatur gelegt. Darauf folgten die Membran und anschließend das Gel. Den Abschluss bildeten drei weitere Filter. Nach Montage der negativen Kathode wurden die Proteine bei 0,8 mA/cm² für 90 min bei RT auf die Membran geblottet.

Die Effizienz des Proteintransfers wurde durch Färbung der Membran in einer 10%-igen Ponceau S-Lösung und anschließender Entfärbung in ddH₂O überprüft. Zur Absättigung der freien, unspezifischen Bindungsstellen wurde die Membran nach dem Blotten mit 5% Magermilch/TBS für 30 min bei RT blockiert. Es folgte die Inkubation mit dem Erstantikörper, der in 5% Magermilch/TBS verdünnt wurde, für 1 h bei RT oder über Nacht bei 4°C. Nach dreimaligem Waschen mit TBST für jeweils 15 min erfolgte die Inkubation mit dem Peroxidasegekoppelten Zweitantikörper in einer Verdünnung von 1:50000 in 5% Magermilch/TBS für 30 min. Abschließend wurde nochmals 3 x 15 min mit TBST gewaschen. Zur Detektion der Proteinbanden wurde ein Chemilumineszenz-Substrat (ECL) verwendet. Dieses Substrat enthält Luminol, das in Gegenwart von H₂O₂ in einer Peroxidase-katalysierten Reaktion oxidiert wird, wobei Energie in Form von Licht emittiert wird. Auf diese Weise können Proteine, die über den Zweitantikörper indirekt Peroxidase gekoppelt sind, durch Auflegen eines Röntgenfilms auf die Membran detektiert werden. Der Blot wurde für 1 min mit je 0,125 ml der Detektionsreagenzien 1 und 2 pro cm² Membran inkubiert. Anschließend wurde in der Dunkelkammer je nach Stärke des erwarteten Signals für eine gewisse Zeit ein Röntgenfilm aufgelegt.

5x Blotpuffer	190 mM Glycin 50 mM Tris/HCl pH8,0, H ₂ O
1x Blotpuffer	20% 5x Blotpuffer 20% Methanol 60% H ₂ O

3.3.5 Biacore-Analyse von Antikörper-Antigen Wechselwirkungen

SPR (Surface Plasmon Resonance) Untersuchungen wurden mit einem BiaCore Instrument (BiaCore Life Sciences) durchgeführt. Hierbei wird ein Substrat auf einer Messoberfläche in einer Flusszelle chemisch immobilisiert. Die Masse des immobilisierten Substrats kann gemessen werden (in RU = 1 ng/mm² für Proteine). Vier Flußzellen sind auf einem Chip hintereinandergeschaltet, so dass ein in Puffer gelöster Ligand durch alle vier Flußzellen hindurchfließen kann. Bindet der Ligand an das Substrat, ist eine Massenveränderung zu beobachten. Vergleicht man die Massenveränderung eines spezifisch mit dem Liganden interagierenden Substrats mit der eines unspezifisch interagierenden Substrats, kann man Aussagen über die Stöchiometrie der Reaktion machen, vorausgesetzt die Molmassen von Substrat und Ligand sind bekannt. Die BiaCore Analyse wurde in Zusammenarbeit mit Avidex Ltd (Abingdon, Großbritannien) durchgeführt. Ein CM5 Chip wurde mit EDC/NHS aktiviert und verschiedene Konzentrationen von L1-Fc wurden direkt auf die Chip-Oberfläche immobilisiert. Anschließend wurden freie Bindungen mit Ethanolamin/HCl geblockt. Die L1 mAk wurden über die Chipoberfläche geleitet. Die Assoziation und Dissoziation der Antikörper wurde über die veränderten Molmassen bestimmt und ausgewertet.

3.3.6 ELISA

Der ELISA (enzyme linked immunosorbent assay) weist Antigen-Antikörper-Komplexe an einer festen Phase durch Kopplung mit einer messbaren Enzym-Substrat-Reaktion nach.

Der ELISA zum Nachweis von löslichem L1 (sL1) in Aszites und Plasma wurde in Zusammenarbeit mit der DRG Marburg durchgeführt. Die Durchführung erfolgte nach dem L1-CAM ELISA Kit (EIA-5074). L1 mAk beschichtete 96-Loch-Platten wurden mit den Patientenproben und einem biotinylierten L1-Antikörper inkubiert. Nach dem Waschen erfolgte eine zweite Inkubation mit einem Peroxidase gekoppelten Streptavidin Komplex. Im Anschluss wurde das Substrat hinzugefügt. Die Intensität der Farbentwicklung entspricht der Konzentration von sL1 in der Probe. Zur Bestimmung der Konzentration wurden zusätzlich Standards mitgeführt.

Für den ELISA der Fusionsproteine wurde 10 µg/ml der Proteine in Carbonatbuffer auf eine 96-Lochplatte über Nacht bei 4°C immobilisiert. Freie Bindungsstellen wurden mit 3%iger BSA/TBS-Lösung bei Raumtemperatur für 1 h geblockt. Dann wurden 1 µg/ml der zu analysierenden mAk auf die ELISA-Platte gegeben und für 1 h bei RT inkubiert. Nach dreimaligem Waschen folgte die Inkubation mit Peroxidase gekoppeltem Maus IgG Antikörper (1:10000 verdünnt in 0,5% BSA/TBS) für eine weitere Stunde bei RT. Anschließend wurde

nochmals dreimal gewaschen und 100 µl TMB-Substratlösung zugefügt. Nach 3-minütiger Inkubationszeit wurde die Reaktion mit 50 µl 1N H₂SO₄ abgestoppt und die optische Dichte bei 450 nm im ELISA-Reader bestimmt. Es wurden jeweils Triplikate gemessen.

3.3.7 Lektin-ELISA

Zur Analyse der Glykosylierungsstruktur der mAk wurde ein Lektin-ELISA etabliert. Lektine sind komplexe Proteine, welche spezifische Zuckerstrukturen erkennen können. Diese Lektine können die spezifischen Glykosylierungsstrukturen am immobilisierten Antikörper erkennen. Gebundenes Lektin wird durch Zugabe eines Peroxidase gebundenen Substrates detektiert und quantifiziert.

0,4 µg/ml der zu untersuchenden Antikörper wurden in Carbonatpuffer über Nacht bei 4°C auf einer 96-Lochplatte immobilisiert. Nach zweimaligem Waschen in TBST wurden die verschiedenen biotinylierten Lektine (Tab. 3.3) in den angegebenen Konzentrationen in TBST verdünnt eingesetzt und für 1h bei RT inkubiert. Nach wiederholtem Waschen erfolgte eine Inkubation mit einem Streptavidin-Peroxidase Komplex (1:1000 in TBST). Anschließend wurde nochmals dreimal gewaschen und 100 µl TMB-Substratlösung zugefügt. Nach 3-minütiger Inkubationszeit wurde die Reaktion mit 50 µl 1N H₂SO₄ abgestoppt und die optische Dichte bei 450 nm im ELISA-Reader bestimmt. Es wurden jeweils Triplikate gemessen.

Tabelle 3.3: Auswahl der Lektine.

Lektin	Firma	Spezifität	Konzentration	Verdünnung
SNA	Sigma	Sialinsäure	1 mg/ml	1: 5000
Con A	Sigma	Mannose, Glukose	1 mg/ml	1:5000
MPA	Sigma	Galaktose	1 mg/ml	1:200
UEA	Sigma	Fukose	1 mg/ml	1:200
LTA	Sigma	Fukose	1 mg/ml	1:5000

Diese Lektine wurden in der angegebenen Konzentration im ELISA Assay eingesetzt.

3.3.8 Immunohistologie von Tumorproben

Die Analysen von Tumorgewebschnitten wurden in Zusammenarbeit mit Prof. Mina Fogel (Kaplan Medical Center, Rehovot, Israel) durchgeführt. 4 µm Gewebsschnitte von Formalin-fixierten, Paraffin-eingebetteten Tumorproben wurden auf Glasobjektträger befestigt. Nach der Deparaffinierung wurde das Gewebe rehydriert und zur Antigenvorbehandlung dreimal für 5 min bei 600 W in Ethylendiamintetraessigsäure-(EDTA)-Puffer pH 8 erhitzt. Gewebseigenen Peroxidasen wurden durch Behandlung mit 3% H₂O₂ in Methanol für 30 min bei RT inaktiviert und anschließend mit 10% Ziegen Serum blockiert. Nach Inkubation des L1 mAk (10 µg/ml) über Nacht bei 4°C, wurden die Schnitte mit biotinyliertem Zweitantikörper Anti-Maus IgG für 30

min, und anschließend für weitere 30 min mit Avidin–Biotin–Peroxidase Komplex behandelt. Nach Inkubation in Peroxidase Substrat-Lösung wurden die Schnitte in Wasser gewaschen und in Hematoxylin gefärbt. Die Schnitte wurden dehydriert und mit Glyceringelatine eingedeckt. Die Anfärbbarkeit von anwesenden L1 positiven peripheren Nerven diente als interne Kontrolle.

Für eine reine Hematoxylin-Eosin (HE) Färbung wurden die Schnitte deparaffiniert und mit HE gefärbt.

3.4 Murine Tumorwachstumsexperimente

3.4.1 Tierhaltung

Die Mäuse wurden nach den Bestimmungen des Tierschutzgesetzes gehalten und die Experimente unter Kontrolle durch das Regierungspräsidium Karlsruhe durchgeführt.

Die Tiere wurden in individuell belüfteten Käfigen IVC (individually ventilated cages) unter pathogenfreien (specifically pathogen free, SPF) Konditionen gehalten. Die Schutzatmosphäre hatte 21-22°C und 50-60% Luftfeuchtigkeit. Futter und Wasser wurde in ausreichender Menge zur Verfügung gestellt und zweimal wöchentlich gewechselt. Ein Tag-Nacht Rhythmus von 12 h wurde eingehalten.

3.4.2 Wachstumsexperimente im Maus-Xenograft-Modell

Für die hier durchgeführten Wachstumsexperimente wurden immunsupprimierte Mausstämme verwendet. CD1 Nude Mäuse wie auch BALB/c Nude Mäuse besitzen keinen Thymus, wodurch die T-Zellpopulation fehlt. Beide Mausstämme besitzen jedoch B-Zellen, NK-Zellen und können Komplement aktivieren. Im Gegensatz zur CD1 Nude Maus ist die BALB/c Nude Maus ein Inzuchtstamm.

Die 6 Wochen alten weiblichen Mäuse wurden von Charles River Laboratories bezogen. Zur Akklimatisierung wurde mit dem Experiment nicht vor 7 Tagen nach Ankunft der Mäuse im ZTL (Zentrales Tierlabor) begonnen.

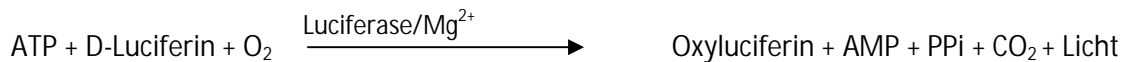
Um den Verlauf des Tumorwachstums intraperitoneal beobachten zu können, wurden die Tumorzelllinien so modifiziert, dass sie das Enzym Luciferase exprimierten. Hierzu wurde der SKOV3ip Tumorzelllinie ein Luciferase-tragendes Plasmid (pCDNA3.1Luciferase) transfiziert. Eine Selektion fand über eine enthaltene Hygromycin-Resistenz statt. Diese so hergestellte stabile Zelllinie SKOV3ip/Luci wurde in der Zellkultur gezüchtet und vermehrt. Die Zellen wurden mit 5 mM EDTA/PBS abgelöst und nach zweimaligem Waschen in PBS aufgenommen.

Eine Zellzählung erfolgte in einem angemessenen Volumen im CASY® I. Die Zellen wurden auf Eis zum ZTL transportiert. Vor der intraperitonealen Applizierung wurden sie auf Raumtemperatur erwärmt. Pro Maus wurden 6×10^6 SKOV3ip/Luci Zellen in 300µl PBS i.p. injiziert. In den darauffolgenden zwei bis drei Tagen konnten sich die Zellen intraperitoneal ansiedeln. Im Anschluss erfolgte eine Therapie mit den verwendeten Antikörpern und den Kontrollen. Eine Behandlung erfolgte dreimal wöchentlich mit je 200 µg Antikörper bzw. Negativkontrolle (Isotypkontrolle oder PBS). Der mAK wurde mittels einer 25 G Kanüle (0,6 mm x 20 mm) intraperitoneal im linksseitigen Bauchbereich injiziert. Je nach Experiment wurde nach 3 oder 4 Wochen der Versuch beendet. Die Mäuse wurden mittels CO₂ Begasung oder durch schnelle Dislokation des Genicks getötet. Die Mäuse wurden gewogen und evtl. vorhandene Aszites gemessen. Die Tumore wurden entnommen und für weitere Analysen verwendet oder in Flüssigstickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert.

3.4.3 In vivo Biolumineszenz-Messung von Tumoren

Die Kombination von modernen Bildgebungsverfahren mit der Reportergentechnologie bietet große Vorteile. So ist es möglich, biologische Prozesse auf molekularer Ebene in Organismen zu verfolgen, ohne das Versuchstier töten zu müssen. Zu den am häufigsten eingesetzten Reportern gehören lumineszente (z.B. Luciferin) und fluoreszente (z.B. GFP) Proteine oder auch radioaktive Tracer. Die Bildgebung erfolgt dabei durch optisches Imaging, Positronen-Emissions-Tomographie (PET) oder Magnetresonanztomographie (MRT). Das hier verwendete IVIS™ 100 Imaging System (Xenogen) ist ein optisches System, welches sowohl fluoreszierende wie auch lumineszierende Reporter in vitro und in vivo nutzen kann. Es zeichnet sich durch hohe Sensitivität der Kamera und einen justierbaren, großen Aufnahmebereich aus. Eine beheizbare Ablageplatte sowie Anschlüsse für ein Inhalationsgas erleichtern die Versuchstier-Handhabung. Diese Technologie erlaubt die wiederholte Messung und Beurteilung des Tumorwachstums, die Lokalisation von Mikro- und Makrometastasen im zeitlichen Verlauf, sowie Langzeitstudien am einzelnen Tier zur Beurteilung von therapeutischen Effekten durch eine entsprechende Behandlung. Beachtet werden muss aber bei der Anwendung von intraperitonealen Tumoren, dass es zu verfälschten Aktivitätsmessungen kommen kann. Dabei kann die Emission von Biolumineszenz unter anderem durch stark durchblutete Organe im Bauchraum der Tiere abgeschirmt werden. Dies führt zu einem abgeschwächten Lumineszenz-Signal. Daher wurde dieses bildgebende Verfahren bei der intraperitonealen Tumorapplikation in dieser Arbeit nur verwendet, um bereits vor Therapiestart Mäuse ohne Tumor aus der Gruppe entfernen zu können. Außerdem diente es als Verlaufsorientierung während der Therapie.

Das Prinzip der bioluminizenten Messung beruht auf der enzymatischen Reaktion von Luciferin. Das Enzym Luciferase wurde ursprünglich aus dem Nordamerikanischen Leuchtkäfer „Photinus pyralis“ isoliert und ist seit seiner Entdeckung 1950 sowohl in der biologischen als auch in der klinischen Forschung weit verbreitet (Strehler und Totter, 1952). Chemisch handelt es sich um eine Monooxygenase, die bei Anwesenheit von Magnesium unter Adenosintriphosphat (ATP) Verbrauch Luciferin umsetzt, wobei Energie in Form von Photonen freigesetzt wird:



ATP/AMP: Adenosintriphosphat/ Adenosinmonophosphat

O₂: Sauerstoff

CO₂: Kohlendioxid

PPi: Diphosphat

Diese Photonen können in einem Luminometer bei 562 nm erfasst werden. Vor Therapiebeginn und einmal wöchentlich im Laufe der Behandlung wurde die Biolumineszenz der Tumorzellen gemessen, um eine Angeh-Rate und den Wachstumsverlauf der Tumore in den Mäusen zu beurteilen. Hierfür wurden die Mäuse mit Isofluran begast und anästhesiert. Jeder Maus wurden 3 mg Luciferin in 100 µl wässriger Lösung (pH=7,4) intraperitoneal injiziert. Fünf Minuten nach der Luciferinapplikation wurde die Luciferaseaktivität im IVIS-100 Imaging System bestimmt. Dazu wurden jeweils fünf betäubte Mäuse auf dem Rücken auf der elektronisch verstellbaren Platte in der beheizten Aufnahmekammer (37°C) des IVIS-100 platziert. Über Masken wurden die Mäuse fortlaufend mit einem Isofluran-Sauerstoff-Gemisch versorgt. Die verstellbare Platte wurde nach unten gefahren, so dass alle fünf Mäuse auf der Aufnahme zu sehen waren (Einstellung D). Es wurde eine mittlere Auflösung/mittlere Sensitivität gewählt (medium binning). Pro Messung wurde vom IVIS-100 eine photographische Aufnahme der Mäuse gemacht und eine Lumineszenzaufnahme, die übereinander gelegt wurden. Die Messzeit für die Lumineszenzaufnahme (exposure time) betrug 1 min. Die Lichtemission der durch Firefly Luciferase katalysierten Luciferin Reaktion liegt bei 530-640 nm, mit einem Emissionsmaximum bei 562 nm. Dieses Emissionsspektrum und die optischen Eigenschaften von biologischem Gewebe erlauben es, dass das Licht (> 600 nm) mehrere Zentimeter Gewebe durchdringen kann. Deshalb ist es möglich Licht zu detektieren, das von einem Luciferase-Reporter gen exprimierenden Organ der Maus emittiert wird. Die erhaltenen Luciferaseexpressionsdaten wurden mit der Living Image Software (Xenogen) ausgewertet. Nach der Aufnahme wurden die narkotisierten Mäuse in ihren Käfig zurückgesetzt, wo sie nach 2-3 min wieder erwachten.

3.4.4 Blutentnahme bei der Maus

3.4.4.1 Intrakranielle Blutentnahme durch Herzpunktion

Zur finalen Blutentnahme durch Herzpunktion wurde die Maus in eine Narkose versetzt. Dies erfolgte durch eine intraperitoneale Injektion (25G Nadel) von einer Kombination der Wirkstoffe Ketamin und Xylazin. Ketamin wurde dabei als Analgetikum und Xylazin als Sedativum und Muskelrelaxens verabreicht. Zur Injektion musste das Gewicht der Maus berücksichtigt werden. Pro 1 g Mausgewicht wurden 10 µl Narkoselösung verabreicht. Das Fortschreiten der Narkosestadien bis zum Stadium der chirurgischen Toleranz wurde mithilfe des Fußsohlenreflexes beobachtet. Die Entnahme des Blutes erfolgte mittels einer G23 Kanüle (0,6 x 30 mm) und einer 1 ml Spritze direkt aus dem Herz. Nach der Entnahme wurden die Mäuse mittels zervikaler Dislokation getötet. Die so erhaltene Menge an Blut beträgt ungefähr 1 ml. Sollte eine Gerinnung des Blutes vermieden werden, wurde Heparin in der Spritze vorgelegt.

Ketamin (Ketanest®S) 120 mg/mg Gewicht

Xylazinhydrochlorid (Rompun® 2%) 16 mg/mg Gewicht

in 10 ml PBS verdünnen

3.4.4.2 Blutentnahme aus der Submandibularvene

Die submandibulare Blutentnahme ist eine tierschonende und effiziente Methode, um bei Labortieren Blut zu gewinnen. Diese Blutentnahme kann im Verlauf einer Therapie vorgenommen werden. Die Maus wird hierfür in der Hand fixiert und die Backenhaut leicht nach hinten gezogen. Die Submandibularvene im Gesicht wird senkrecht angestochen, und die Blutropfen werden im 1,5 ml Reaktionsgefäß gesammelt (0,2-0,5 ml Blut). Damit es zu keiner Gerinnung kommt, ist im Gefäß Heparin vorgelegt worden. Nach Erythrozytenlyse konnten die Zellen für eine durchflusszytometrische Analyse verwendet werden. Aufgrund der geringen Menge wurde das Blut von mehreren Mäusen einer Gruppe vereinigt.

3.4.5 Erythrozytenlyse

Pro Zellpellet (ca. 1×10^5 - 1×10^6 Zellen) wurde 1 ml frischer Erythrozytenlysepuffer zu den Zellen gegeben und vorsichtig vermischt. Durch den Puffer werden nicht kernhaltige Zellen (Erythrozyten) lysiert. Kernhaltige Zellen bleiben aufgrund ihrer höheren Membranstabilität intakt. Nach einer Einwirkzeit von 1-5 min auf Eis wurden die Zellen zentrifugiert (5 min; 300 x g) und zweimal in PBS gewaschen.

Erythrozyten-Lysepuffer	155 mM NH ₄ Cl	
	10 mM KHCO ₃	
	0,1 mM EDTA	pH 7,2-7,4

3.4.6 Isolierung der Milzzellen

Die Milz der Maus wurde auf ihre Zellzusammensetzung durchflusszytometrisch untersucht. Hierfür wurden die Mäuse mit CO₂ getötet. Am milzseitigen Bauchbereich wurde die Bauchdecke geöffnet, und die Milz konnte vorsichtig entnommen werden. Zur Herstellung einer Einzelzellsuspension wurde die Milz anschließend in PBS gewaschen und durch ein 40 µm Zellsieb gedrückt. Im Anschluss erfolgte eine Erythrozytenlyse. Nach mehrmaligem Waschen der Zellen konnten sie zur durchflusszytometrischen Analyse verwendet werden.

3.4.7 Enzymatische Aufarbeitung von solidem Tumor

Zur Analyse der infiltrierenden Immunzellen in den Tumor wurde eine Einzelzellsuspension hergestellt. Dafür wurde der Tumor nach Entnahme kurz in PBS gewaschen. Anschließend erfolgte ein enzymatischer Verdau mit Collagenase-IV und DNase. Der Tumor wurde mit der Enzymlösung für 30 min bei 37°C inkubiert und zwischenzeitlich kurz geschüttelt. Danach wurde der Tumor erst durch ein 100 µm Zellsieb gedrückt und anschließend durch ein 40 µm Zellsieb. Die Einzelsuspension wurde mehrmals gewaschen und bei Vorhandensein von Erythrozyten mit dem Erythrozytenpuffer behandelt. Zur Vorbereitung auf die anschließende Färbung zur durchflusszytometrischen Analyse wurde die Zellsuspension in FACS-Puffer aufgenommen.

Enzymlösung:	50 mg Collagenase-IV
	12 mg DNase
	in 20 ml FACS Puffer

3.4.8 Makrophagendepletion während der therapeutischen Behandlung in vivo

10 BALB/c Nacktmäuse pro Gruppe wurden jeweils 6 x 10⁶ SKOV3ip-Luci Zellen intraperitoneal gespritzt. 24 h später wurde mit der intraperitonealen Behandlung durch Clodronat begonnen. Den Mäusen wurde entweder 100 µl der Clodronat-Liposomen Lösung oder der PBS-Liposomenlösung gespritzt. Am 4. Tag erfolgte eine wiederholte Behandlung mit den Liposomen. Im Anschluss wurde alle 6 Tage die Liposomenbehandlung wiederholt. Aufgrund der Makrophagendepletion waren die Tiere anfälliger für Keime. Daher wurde in den ersten 2

Wochen der Behandlung Tetrazyklin (0,4 mg/ml) ins Trinkwasser gegeben. Am vierten Tag nach Tumorinokulation wurde mit der Antikörpertherapie begonnen. Die Mäuse wurden 3-mal wöchentlich mit je 200 µg L1-9.3/IgG2a oder IgG2a Isotypkontrolle bzw. PBS behandelt.

Clodronat-Liposomen (Cl2MDP-Lip)

Dr. N. van Rooijen, Amsterdam

PBS-Liposomen (PBS-Lip)

www.clodronateliposomes.org

3.5 Ethikvoten

Die Analyse von Plasma- und Aszitesproben wurde von der Ethikkommission geprüft und genehmigt. Für die Gewinnung und Untersuchungen sämtlicher humaner Gewebeproben lag das schriftliche Einverständnis der betroffenen Patienten vor.

3.6 Angaben zur Statistik

Die statistische Auswertung wurde mit dem Programm GraphPad Prism (Version 5.0) durchgeführt. Für Unterschiede zwischen zwei Gruppen wurde der „Student's t-test“ bzw. der Ranglistentest nach Mann-Whitney verwendet, je nachdem, ob die Werte normal oder nicht normal verteilt waren. Beim Vergleich von mehr als zwei Gruppen wurde der ANOVA-Test (one-way analysis of variance) durchgeführt. Daten wurden als signifikant verschieden betrachtet, wenn der p-Wert < 0,05 war.

4. ERGEBNISSE

4.1 Expression von L1 im menschlichen Organismus

Für eine erfolgreiche Antikörpertherapie muss eine Expression des Antigens auf den Tumoren sichergestellt sein. Dabei sollte die Expression des Antigens im Tumorgewebe möglichst hoch und auf allen Tumorzellen vorhanden sein. Um aber mögliche Nebeneffekte zu minimieren, ist es wichtig, dass das Antigen so wenig wie möglich auf gesundem Gewebe exprimiert wird.

4.1.1 Analyse der L1 Expression im humanen Tumor und auf Tumorzelllinien

Die L1 Expression auf Tumoren wurde bereits ausführlich untersucht. Der Anteil an L1 positiven Tumoren konnte auf unterschiedlichen Tumorentitäten, wie z. B. Melanom, Neuroblastom, Gliom, Bronchial-, Nierenzell- und Pankreaskarzinome sowie gastrointestinale und kolorektale Tumore nachgewiesen werden. In Tabelle 4.1 ist eine Zusammenfassung der prozentualen Anteile in verschiedenen Tumorentitäten angegeben.

Tabelle 4.1: L1 Expression in humanen Tumorgeweben

Tumorgewebe	Anteil L1 pos. Tumore	Literatur
Ovarialkarzinom	80%	Fogel et al., 2003, Huzar et al., 2006
Endometrialkarzinom	25%	Fogel et al., 2003
Brustkarzinom	15%	Schröder et al., 2009
Pankreaskarzinom	80% / 2%	Mürköster et al., 2007, Kaifi et al., 2006
Nierenzellkarzinom	40%	Allory et al., 2005
Kolonkarzinom	60%	Gavert et al., 2005
Malignes Melanom	40%	Thies et al., 2002
Lungenkarzinom (SSLC)	100%	Miyahara et al., 2001

Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass die L1 Expression zahlreicher Tumore wie Ovarial- und Endometrialkarzinome, aber auch Kolon- und Nierenkarzinome mit einer schlechten Prognose korreliert (Allory et al., 2005; Boo et al., 2007; Fogel et al., 2003a; Fogel et al., 2003b; Kaifi et al., 2006; Thies et al., 2002; Zecchini et al., 2008).

Kann das L1 Expressionsmuster der humanen Tumorentitäten auch in humanen Tumorzelllinien wiedergefunden werden? Um dies zu klären, wurden verschiedene Tumorzelllinien durchflusszytometrisch auf ihre L1 Expression untersucht (Abb. 4.1). Nach Färbung der Zelllinien mit einem L1-Antikörper (L1-9.3; siehe Tabelle 4.1) wurde zur Detektion mit einem PE-gekoppelter Zweitantikörper inkubiert.

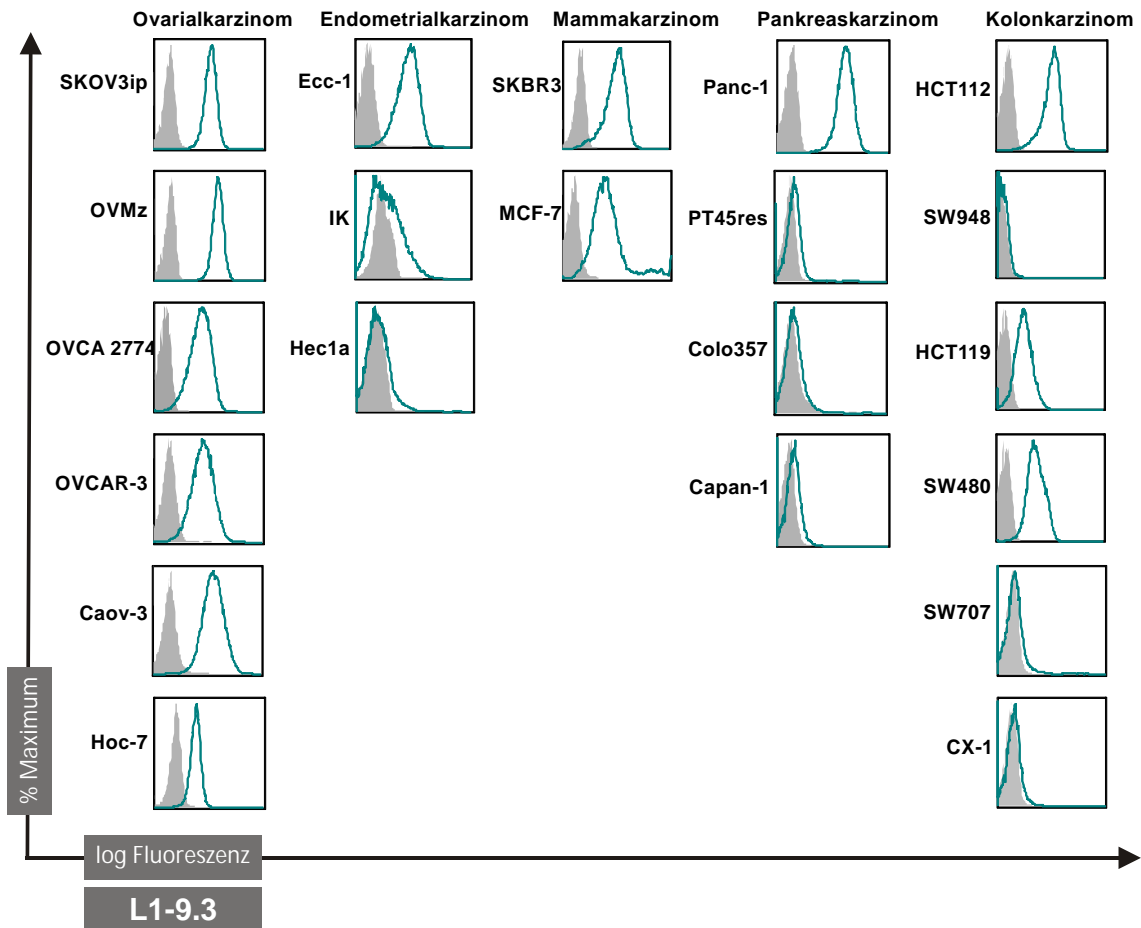


Abbildung 4.1 L1 Expression auf Tumorzelllinien. Durchflusszytometrische Analyse der L1 Expression auf Tumorzelllinien unterschiedlicher humaner Tumorgewebe. Die Zellen wurden mit L1-9.3 inkubiert und einem mit PE gekoppelten Zweitantikörper gefärbt. Der grauschattierte Bereich zeigt die Zweitantikörperkontrolle an.

Sechs der sechs getesteten Ovarialkarzinom-Zelllinien sind positiv für L1. Auch die beiden getesteten Brusttumor-Zelllinien exprimieren L1. Außerdem konnte in einigen Zelllinien des Kolonkarzinoms, Endometrialkarzinoms und des Pankreaskarzinoms L1 Expression nachgewiesen werden.

4.1.2 Vorkommen von löslichem L1 (sL1) in Ovarialkarzinom-Patientinnen

L1 liegt nicht nur in einer transmembranen Form vor, sondern kann durch Abspaltung des extrazellulären Teils in eine lösliche Form (sL1) überführt werden. Lösliches L1 kann in malignem Aszites und Serum von Ovarialkarzinom-Patientinnen gefunden werden (Fogel et al., 2003a) (Gutwein et al., 2005). Ist es möglich, lösliches L1 als Marker in der Tumordiagnostik zu verwenden? Um diese Frage zu klären, wurden jeweils Plasma- und Aszitesproben von 287 Ovarialkarzinom-Patientinnen auf lösliches L1 untersucht. Hierfür wurde ein ELISA etabliert, welche die lösliche Form des L1 erkennt. Ein L1 mAκ wurde auf 96-Lochplatten immobilisiert. Nach dem Abblocken unspezifischer Bindungen wurden die Plasmen bzw. Asziten der

Patientinnen zugegeben und inkubiert. Mit einem biotinylierten L1-Antikörper und einer anschließenden Zugabe von Peroxidase-gekoppeltem Streptavidin konnte dann vorhandenes sL1 detektiert werden. Als Negativkontrolle dienten Plasmen von 40 gesunden Probanden. Bei allen Kontrollplasmen ist der sL1 Wert kleiner als 20 ng/ml. Mit der Annahme der Normalverteilung wird der Median bei 7,028 ng/ml bestimmt. Das 95% Perzentil beträgt 16,1 ng/ml. Dieser Wert wird als Schwellenwert definiert.

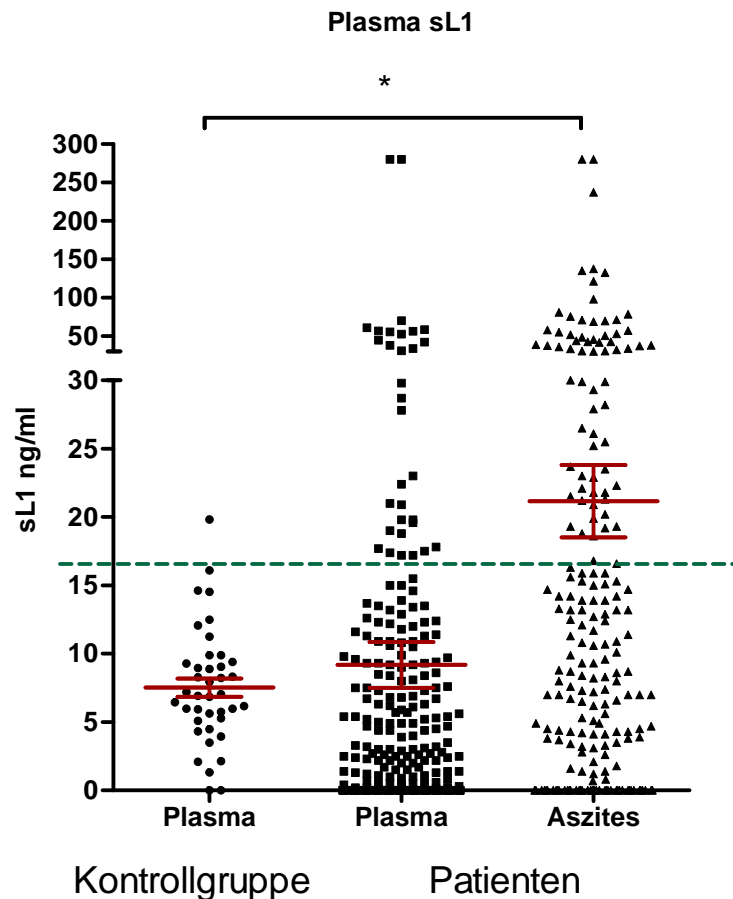


Abbildung 4.2: sL1 in Plasma und Aszites von Ovarialkarzinom Patientinnen. Im ELISA wurden 287 Patientinnen (209 Asziten und 256 Plasmen) und 40 Kontrollplasmen von gesunden Probanden untersucht. Das 95-Perzentil der Kontrollplasmen liegt bei 16,1 ng/ml (grün gestrichelte Linie), welcher als Schwellenwert definiert wurde. Dargestellt sind die Einzelwerte mit Mittelwert und Standardfehler (SEM). (Mittelwert \pm SEM: Kontrollplasma= 7,528 \pm 0,6685 N=40; Plasma= 9,183 \pm 1,671 N=256; Aszites= 21,15 \pm 2,650 N=209. (In Zusammenarbeit mit DRG, Marburg). Signifikanzniveau : * $p < 0,05$.

Im Aszites sind 78 der 209 analysierten Proben positiv für sL1 (37,3%). Die Untersuchung von 256 Plasmaproben resultiert in 35 sL1-haltigen Proben. So kann im Blut von 14% der Patientinnen sL1 nachgewiesen werden. Fast alle Patientinnen mit sL1 im Plasma zeigen auch im Aszites ein positives sL1-Signal. Die Korrelation von sL1 mit dem Krankheitszustand der Patientinnen ergab keine signifikanten Zusammenhänge. Analysiert wurden dabei verschiedene Faktoren. Die Tumore sind nach dem Differenzierungsgrad (G1-G3) der

Tumorzellen und histopathologisch nach der FIGO-Klassifizierung eingeteilt worden. Jedoch zeigt keine dieser Klassifizierungen eine Korrelation mit der Menge an sL1 im Plasma oder Aszites. Die analysierten Patientenproben kamen aus unterschiedlichen Institutionen, jedoch scheinen die regionalen Unterschiede keinen Einfluss auf die Bildung von sL1 zu haben.

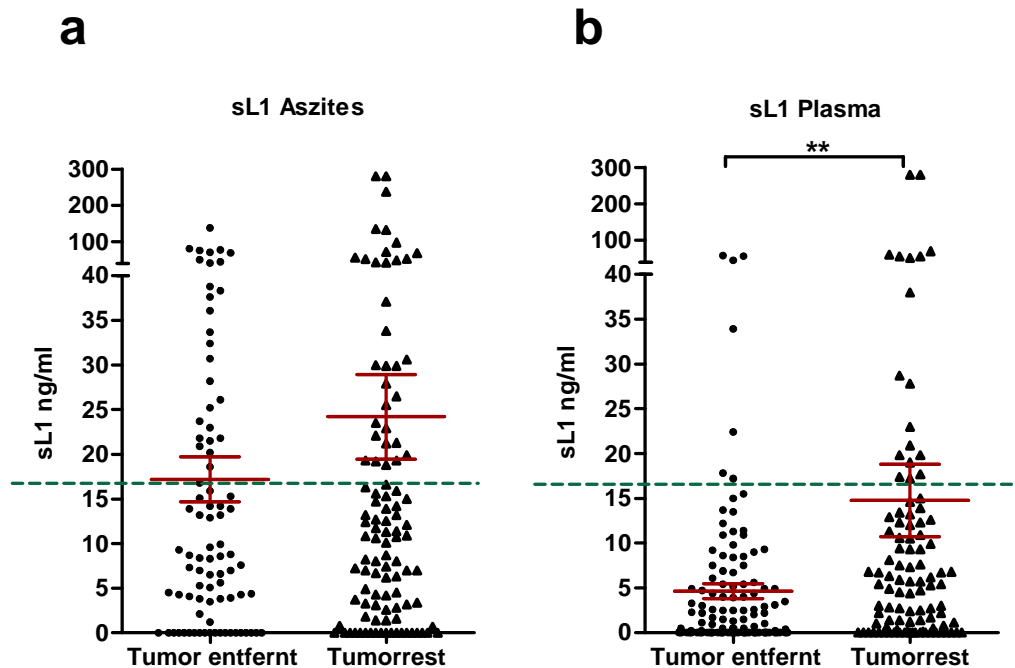


Abbildung 4.3: Korrelation von löslichem L1 in Plasma und Aszites mit dem postoperativen Tumorstatus von Ovarialkarzinom-Patientinnen. Untersucht wurden a) Aszites- und b) Plasmaproben von 287 Patientinnen. Dargestellt wurden die Einzelwerte mit Mittelwert und Standardfehler (SEM). (Mittelwert \pm SEM: a) Aszites: Tumor entfernt= 17.19 ± 2.519 N=86; Tumorrest= 25.63 ± 5.688 N=85; b) Plasma: Tumor entfernt= 4.642 ± 0.8480 N=124; Tumorrest= 14.75 ± 4.048 N=100) Signifikanzniveau : **p<0,01

Überraschenderweise zeigt der postoperative Tumorstatus der Patientinnen mit dem Plasmagehalt von sL1 eine Korrelation (Abb. 4.3). Im Plasma befindet sich signifikant mehr sL1 ($p=0,008$), wenn nach operativem Eingriff der Tumor nicht vollständig entfernt werden konnte. Für die Aszitesproben konnte hingegen kein Zusammenhang festgestellt werden.

Leider konnte nur sL1 untersucht werden. Tumorproben lagen zum Abschluss der Dissertation nicht vor, so dass kein direkter Nachweis für die L1 Expression auf den Tumoren erbracht werden konnte.

4.2 Herstellung und Charakterisierung spezifischer Antikörper gegen L1

4.2.1 Produktion und Selektion von Antikörpern gegen humanes L1

Zur Herstellung von Antikörpern gegen humanes L1 wurde die Hybridomtechnologie angewendet. Als Immunogen wurden entweder die humane Ovarialkarzinom-Zelllinie SKOV3ip oder ein rekombinant hergestelltes L1-Fc Fusionsprotein verwendet. Die aus der Milz isolierten B-Zellen der immunisierten Mäuse wurden mit Myelomzellen fusioniert. Die daraus resultierenden Hybridomzellen wurden durchflusszytometrisch auf sekretierende Antikörper gegen humanes L1 selektioniert. Aus den beiden Immunisierungen konnten insgesamt neun verschiedene L1-spezifische antikörperproduzierende Hybridomzelllinien isoliert werden (Tabelle 4.2). Die verschiedenen mAk wurden freundlicherweise von Dr. Gerhard Moldenhauer (DKFZ, Heidelberg) produziert, aufgereinigt und zur Verfügung gestellt.

Tabelle 4.2 Hergestellte monoklonale Antikörper gegen humanes L1.

mAk	Isotyp	Immunogen
L1-9.3	IgG1	L1-Fc
L1-14.10	IgG1	L1-Fc
L1-38.12	IgG1	L1-Fc
L1-35.9	IgG1	L1-Fc
L1-OV52.24	IgG1	SKOV3ip
L1-OV198.5	IgG2a	SKOV3ip
L1-OV366.1	IgG1	SKOV3ip
L1-OV543.18	IgG1	SKOV3ip
L1-OV549.20	IgG1	SKOV3ip

Die Immunisierung erfolgte entweder gegen L1-Fc oder gegen SKOV3ip. Aus der Herstellung konnten neun mAk gegen humanes L1 gewonnen werden.

4.2.2 Nachweis der spezifischen Bindung an humanen Zelllinien

Im Folgenden wurde zur Analyse der Funktionalität der hergestellten mAk Tumorzelllinien von Ovarial- und Endometrialkarzinomen verwendet.

4.2.2.1 Analyse der Bindungsspezifität von mAk in der Durchflusszytometrie

Zum Nachweis der spezifischen Reaktivität an humanem L1 wurden verschiedene humane Zelllinien verwendet. Die Nachweise erfolgten durchflusszytometrisch (Abb. 4.4) sowie im Western Blot (Abb. 4.5). Hierfür wurden sowohl huL1 stabil transfizierte CHO Zellen als auch native CHO Zellen verwendet. Des Weiteren wurden zwei verschiedene L1 exprimierende Ovarialkarzinomzelllinien (SKOV3ip, OVMz) verwendet.

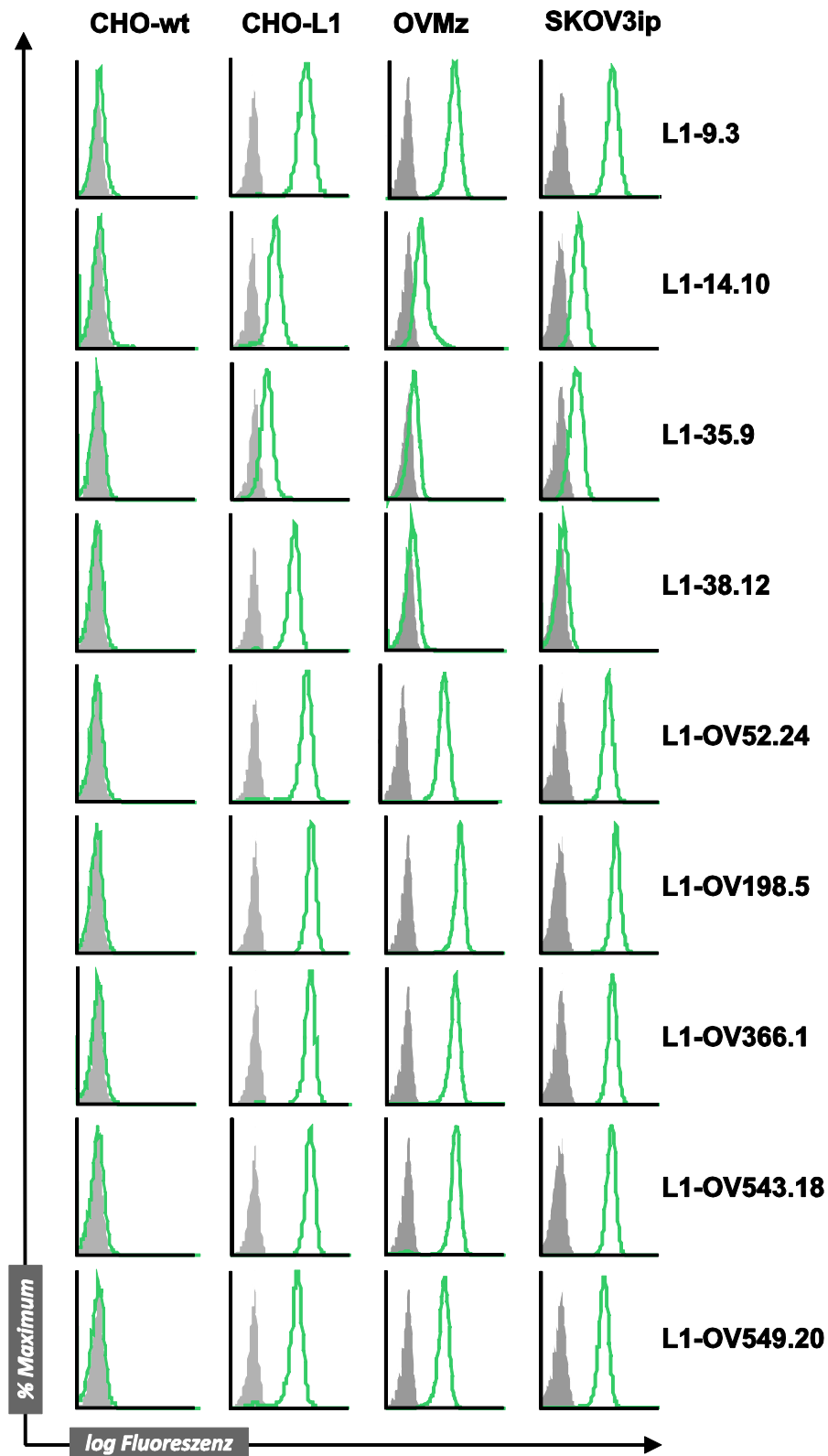


Abbildung 4.4: Bindungsspezifität von L1-Antikörpern in der Durchflusszytometrie. Analysiert wurden zwei endogen L1 exprimierende Ovarialkarzinomzelllinien (OVMz, SKOV3ip) sowie CHO-wt und CHO-L1. In grau ist die Zweitantikörperkontrolle dargestellt.

Wie in Abbildung 4.4 dargestellt, bindet kein mAk an die L1-negativen CHO Zellen (Abb. 4.4 Spalte 1), wohingegen alle mAk an die L1-transfizierten CHO Zellen binden. Die Antikörper

zeigen eine unterschiedliche Bindungsstärke mit den verschiedenen L1 exprimierenden Zelllinien. L1-9.3, L1-OV52.24, L1-OV198.5, L1-OV366.1, L1-OV543.18 wie auch L1-OV529.20 zeigen eine vergleichbare Reaktivität gegenüber den L1 exprimierenden Zelllinien. Dabei binden L1-14.10 und L1-35.9 insgesamt schwächer an die drei Zelllinien. Besonders auffallend ist der mAk L1-38.12, welcher eine starke Reaktivität mit transfizierten CHO Zellen zeigt, hingegen keine Bindung an endogenen L1 exprimierenden Zelllinien aufweist.

4.2.2.2 Untersuchung der Bindungsreaktivität von mAk im Western Blot

Im Folgenden wurde die Spezifität der verschiedenen mAk im Western Blot analysiert. Hierfür wurden die vier oben beschriebenen Zelllinien verwendet. Es wurden Zelllysate hergestellt und die Proteine mit Hilfe der SDS PAGE aufgetrennt.

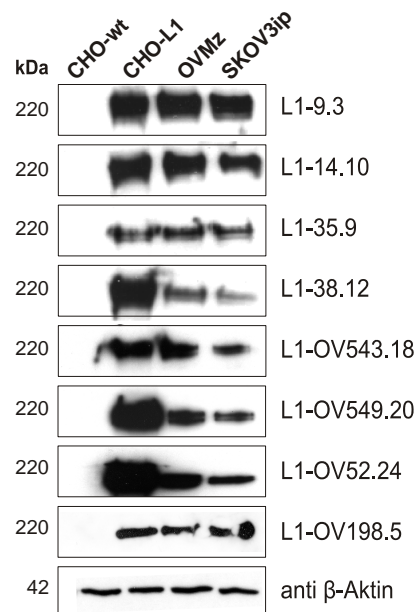


Abbildung 4.5: Bindungsspezifität von L1-Antikörpern im Western Blot. Analysiert wurden zwei endogenes L1 exprimierende Ovarialkarzinomzelllinien sowie CHO-wt und CHO-L1 Zellen. Aufgetragen wurden jeweils 30 μ g Zelllysate. Nach dem Übertragen der Proteinbanden auf PVDF-Membranen wurden diese mit den jeweiligen Antikörpern inkubiert und mit einem Peroxidase-konjugierten Zweitantikörper detektiert. Zum Nachweis der gleichmäßigen Beladung wurde ein Antikörper gegen β -Aktin verwendet.

Wie in Abbildung 4.5 dargestellt, reagieren alle mAk mit Ausnahme von L1-OV366.1 im Western Blot, dabei bindet aber kein Antikörper an das CHO-wt Zelllysate. Neben L1-9.3 zeigt auch L1-14.10 eine starke Bindung bei allen drei L1-exprimierenden Zelllinien. Eine insgesamt schwache Bindung zeigen sowohl L1-35.9 als auch L1-OV198.5. Der mAk L1-OV198.5 kann nur im nicht reduzierten Zustand der Proteine binden. Dies deutet darauf hin, dass L1-OV198.5 nur diskontinuierliche Proteinstrukturen in ihrer nativen Konformation erkennt. Alle anderen mAk zeigen eine Reaktivität mit den reduzierten Proteinproben und können daher ein lineares kontinuierliches Epitop erkennen. Einige mAk zeigten eine stärkere Reaktion im CHO-L1

Zelllysat und eine schwächere Reaktion mit den Ovarialkarzinom-Zelllinien, wobei L1-38.12 nur sehr schwach mit den Ovarialkarzinom-Zelllinien reagiert.

4.2.2.3 Analyse der Isoformspezifität von L1-38.12

L1 besitzt zwei alternativgespleißte Mini-Exons. Durch alternatives Spleißen des Exons 2 enthält die extrazelluläre Domäne des neuronalen L1 das aus fünf Aminosäuren bestehende Motiv YEGHH (Jouet et al., 1995a), das im nicht-neuronal exprimierten L1 fehlt (Jouet et al., 1995b; Takeda et al., 1996). Im zytoplasmatischen Teil von L1 wird durch alternatives Spleißen das Aminosäuremotiv RSLE (Exon 27) eingefügt, dessen Expression ebenfalls nur in Zellen des zentralen Nervensystems nachgewiesen werden konnte (Miura et al., 1991); (Takeda et al., 1996). Die in der Durchflusszytometrie eingesetzte L1 transfizierten CHO Zelllinie besitzt die neuronale Form, wohingegen die endogen exprimierenden Ovarialkarzinomzelllinien zum großen Teil die nicht-neuronale Variante von L1 exprimieren. Dieser Form fehlen durch alternatives Spleißen Exon 2 sowie Exon 27 ($\Delta 2\Delta 27$). L1-38.12 zeigt in der durchflusszytometrischen Analyse eine starke Bindung mit CHO-L1 Zellen, aber mit den Ovarialkarzinom-Zelllinien nur eine sehr schwache Reaktivität. Daher liegt der Verdacht nahe, dass L1-38.12 nur die neuronale Form erkennen kann.

Zur Überprüfung erfolgte ein weiterer Nachweis mit Hilfe von transfizierten HT1080 Zellen. Diese Zelllinie wurde entweder mit der neuronalen Form oder mit der $\Delta 2\Delta 27$ -Isoform stabil transfiziert. Die L1 transfizierte HT1080 Zelllinien (HT1080-L1 und HT1080-L1 $\Delta 2\Delta 27$) wie auch die native HT1080 Zelllinie (HT1080-wt) wurden in der durchflusszytometrischen Analyse verwendet. Nach Färbung der Zellen mit L1-38.12 und Detektion mit einem PE konjugierten Zweitantikörper kann nur eine Bindung an neuronalem L1 exprimierenden Zellen gezeigt werden. L1-38.12 kann weder an HT1080-wt noch an die $\Delta 2\Delta 27$ -depletierte Variante binden (Abb. 4.6). Zur Kontrolle wurden weitere L1 mAk getestet, welche alle mit beiden Isoformen von L1 reagieren. In Abbildung 4.6 ist dies am Beispiel für L1-9.3 dargestellt.

Der mAk L1-38.12 bindet spezifisch am Exon 2 in der ersten Domäne von L1. Somit erkennt dieser mAk nicht die $\Delta 2\Delta 27$ -Isoform, welche vorwiegend auf Tumorzellen vorhanden ist.

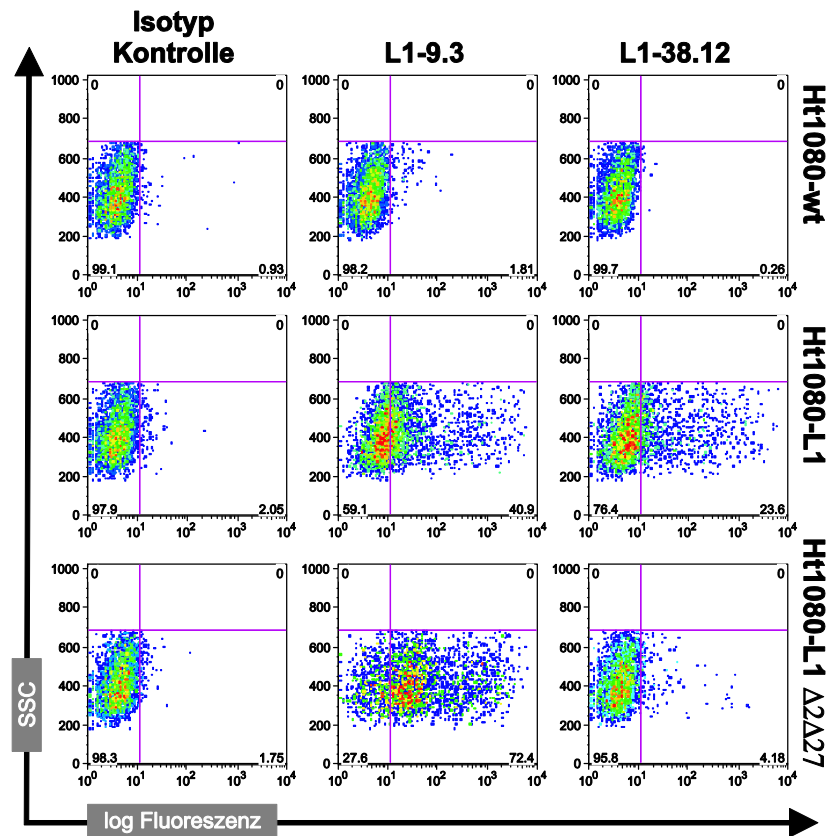


Abbildung 4.6: Bindungsspezifität verschiedener L1 mAk gegen zwei Isoformen von L1. Ein durchflusszytometrischer Nachweis erfolgte mit HT1080 Zellen, welche entweder mit der neuronalen (HT1080-L1) oder der Spleißvariante (HT1080-L1 $\Delta 2\Delta 27$) von L1 transfiziert wurden. Gefärbt wurde mit L1-9.3, L1-38.12 oder einer Isotypkontrolle. Beide L1- Antikörper richten sich gegen ein Epitop in der ersten Domäne von L1. Dargestellt ist die anti-L1 Färbung gegenüber dem Seitwärtsscatter. Die Zellen wurden vom Labor Prof. Achim Krüger, München zur Verfügung gestellt.

4.2.3 Bestimmung der Epitope verschiedener mAk

Protein-Antigene besitzen verschiedene Epitope, an die Antikörper binden können. Jeder monoklonale Antikörper erkennt hierbei nur eine spezifische Struktur. Die Lokalisation der Antigen-Determinante kann Einfluss auf die Funktionalität des Antikörpers haben (Spiridon et al., 2002). So erhöht ein Epitop in der Nähe der Zelloberfläche die Komplement-aktivierenden Eigenschaften (Teeling et al., 2006). Auch können Epitope kontinuierlich, oder diskontinuierlich vorkommen. Einerseits gibt es Epitope, welche aus verschiedenen Aminosäuren bestehen, die in der Aminosäuresequenz eigentlich weit voneinander entfernt sind, aber durch die räumliche Struktur des Antigens nah beieinander liegen. Solche Epitope werden diskontinuierlich genannt, da sie nur im nativen Zustand des Proteins vorhanden sind. Dem gegenüber bestehen kontinuierliche Epitope aus Aminosäuren, die in der Antigen-Sequenz nebeneinander liegen.

Die Spezifität der Bindungsepitope der L1 mAk wurde über die Reaktivität an definierten Fragmenten ermittelt. Diese wurden als Fusionsproteine entweder im ELISA oder im Western Blot eingesetzt.

4.2.3.1 Synthese von L1-Fc-Fusionproteinen

Fc-Fusionsproteine sind rekombinante chimäre Immunglobuline, deren variabler Teil durch ein spezifisches Protein ersetzt wurde. Somit sind sie in vielen verschiedenen Tests (z.B. Protein A Aufreinigung, Ligandbindung für durchflusszytometrische Analysen, ELISA) wie herkömmliche Antikörper einsetzbar. Solche Fusionsproteine bieten daher eine Möglichkeit, Funktion und Struktur von Proteinen zu erforschen. Zur Herstellung von L1-Fc-Fusionsproteinen wurde eine modifizierte Variante des pCDM8 Vektors eingesetzt. Dieser pIG1 Vektor (Simmons, D.L. 1993) besitzt eine humane konstante IgG1-Region, bestehend aus Hinge-Region, C_H2 und C_H3. Außerdem wurde ein Spleiß-Akzeptor Stelle eingebaut, vor die beliebige Gensequenzen kloniert werden können (Abb. 4.7.)

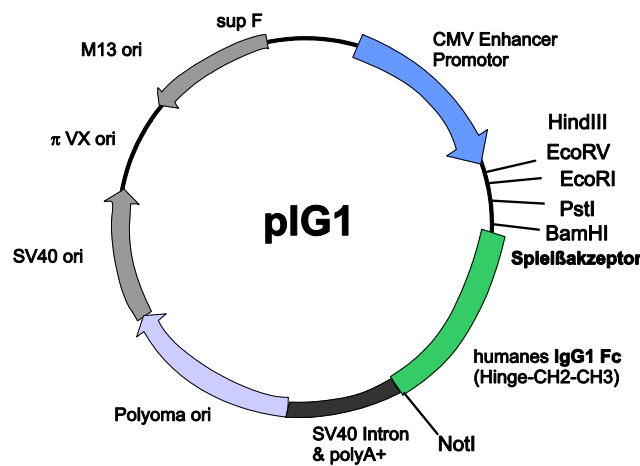


Abbildung 4.7: Vektorkarte von pIG1 (Simmons, D.L.; 1993)

Nach der Transfektion des modifizierten Plasmids in COS-7 Zellen erhält man das rekombinante Protein, an dessen C-terminalen Ende durch Spleißen ein Fc-Teil angefügt wurde. Das Fusionsprotein liegt aufgrund der Hinge-Region als Dimer vor (Abb. 4.8). Das aufgereinigte Protein kann dann zur Analyse im ELISA und im Western Blot eingesetzt werden.

Für die Analyse der antikörperspezifischen Epitope wurden verschieden große L1-Konstrukte hergestellt und in den Vektor kloniert. Nach Transfektion wurden die Fusionsproteine aufgereinigt und zur Analyse verwendet.

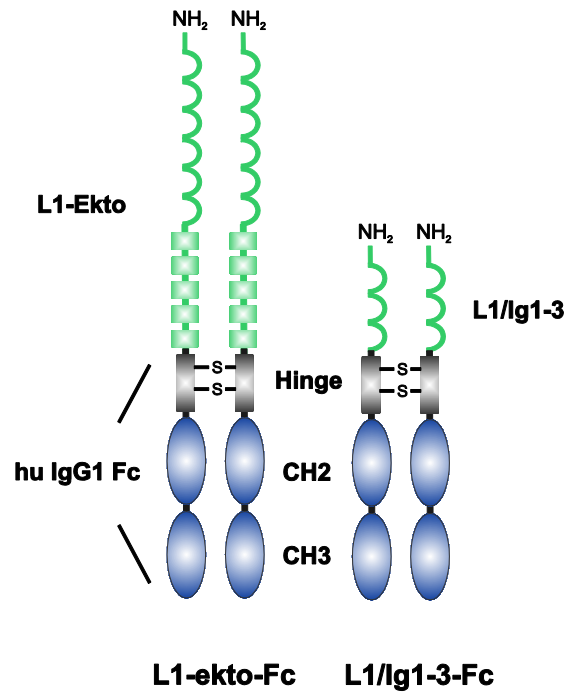


Abbildung 4.8: Schematische Darstellung von L1-Fc-Fusionsproteinen. Dargestellt ist die Ektodomäne von L1 (L1-ekto-Fc) und ein verkürztes Fragment (L1/Ig1-3-Fc). Das verkürzte Fragment besitzt nur die erste bis dritte Ig-Domäne von L1. Die Fusionsproteine liegen aufgrund der Disulfidbrücken als Dimere vor. (huIgG1 Fc: konstanter Teil des humanen IgG1 mit den 2 C_H-Domänen und der Hinge-Region)

Der erste Schritt zur Herstellung von den Fusionsproteinen, war die Amplifizierung der DNA-Sequenz. Zur Synthese der PCR-Produkte wurde immer der gleiche Vorwärtsprimer, beginnend mit der Ig1 Domäne, verwendet. Als Rückwärtsprimer wurden unterschiedliche Primer je nach Länge des gewünschten Produktes gewählt. Den Primerpaaren wurden Restriktionsenzym-Schnittstellen angehängt. Zusätzlich wurde am Rückwärtsprimer eine Donor-Spleiß-Sequenz angehängt. Abbildung 4.9 zeigt die schematische Darstellung der zu produzierenden Fragmente des L1 Moleküls.

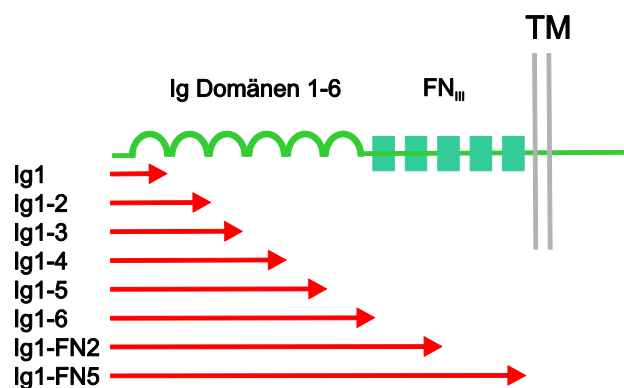


Abbildung 4.9: Schematische Darstellung der verschiedenen L1-Konstrukte.

Somit starten die acht Produkte immer mit der ersten Ig-Domäne und enden in aufsteigender Reihenfolge (Ig2, Ig3, Ig4, Ig5, Ig6, Fn2, Fn5). In Abbildung 4.10 sind die dazugehörigen PCR

Produkte abgebildet. Diese Konstrukte wurden dann in den pIG1 Vektor mit Hilfe zweier Restriktionsenzyme (HindII und EcoRI) kloniert.

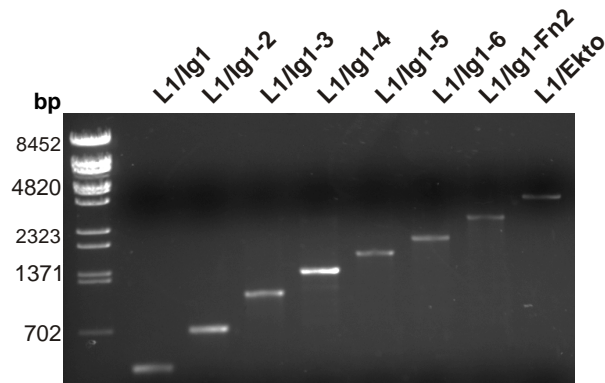


Abbildung 4.10: PCR-Produkte nach Amplifikation. Ein 1%iges DNA-Agarosegel zeigt die PCR-Produkte der verschiedenen grossen L- Konstrukte in aufsteigender Reihenfolge.

Nach transienter Transfektion in COS-7 Zellen wurden die Fusionsproteine aus den Mediumüberständen über Protein-A-Sepharose aufgereinigt. Die Expression der Fusionsproteine wurde mittels Western Blot überprüft (Abb. 4.11), dabei wurden sie mit Hilfe eines Antikörpers gegen humanes Fc nachgewiesen.

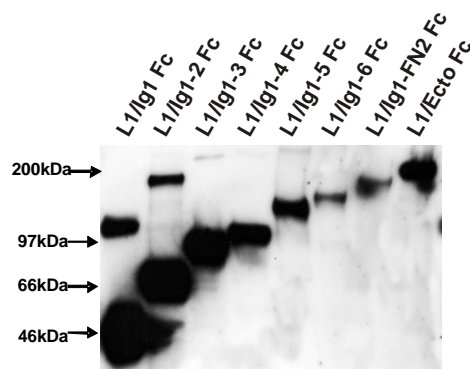


Abbildung 4.11: L1-Fusionproteine im Western Blot. Nach Aufreinigung der Fusionsproteine aus dem Überstand, konnten sie zu Analyse eingesetzt werden. Nachgewiesen wurden die Proteine mit einem Peroxidase gekoppelten anti-humanem Antikörper.

4.2.3.2 Bestimmung der Epitope mittels Western Blot und ELISA

Zur Bestimmung der Antikörper-Epitope wurden Western Blot Analysen durchgeführt. Die unterschiedlichen rekombinanten Fusionsproteine wurden im Western Blot mit den verschiedenen Antikörpern überprobt. Zur Anwendung kamen hierbei nicht nur die aufgereinigten Fusionsproteine, sondern auch in Sf9 Säugerzellen hergestellte Fusionsproteine. In dieser Produktion gab es Fusionsproteine, welche nicht mit der ersten Ig Domäne begannen. Diese Fusionsproteine wurden freundlicherweise von Ricardo Gouveira (ITQB, Oeiras, Portugal) zur Verfügung gestellt. Abbildung 4.12 zeigt mehrere Beispiele für diese Analyse. Mit dem

Kontrollantikörper gegen V5 sind alle Fusionsproteine detektierbar. Eine Analyse mit mAk L1-9.3 resultiert in einer ausschließlichen Bindung an Fusionsproteine, welche die Ig1 Domäne enthalten (Abb. 4.12a). Als weiteres Beispiel ist der L1-11A mAk dargestellt (Abb. 4.12b). Dieser bindet, wie in (Friedli et al., 2009) beschrieben, an die 4-5 FN Domäne. Es waren somit nur Reaktivitäten von Fusionsproteinen erkennbar, die diesen Bereich abdecken. Aus dem Western Blot in Abbildung 4.12c ist erkennbar, dass mAk L1-14.10 die Ig3 Domäne von L1 erkennt. Eine Zusammenfassung aller Bindungsepitope befindet sich in Tabelle 4.3.

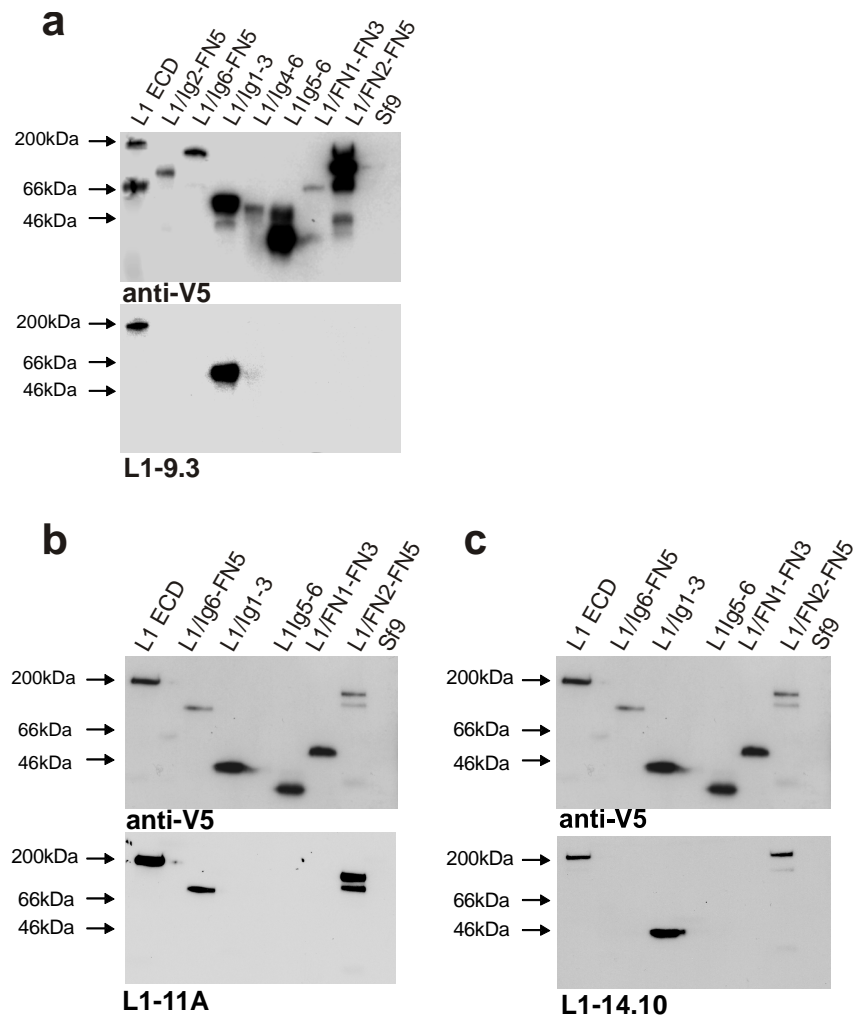


Abbildung 4.12: Epitop-Bestimmung im Western Blot mit unterschiedlichen Fusionsproteinen von L1. Die verschiedenen L1-Fusionsproteine wurden in Sf9 Zellen hergestellt und aufgereinigt. Dargestellt sind die spezifischen Bindungen von a) mAk L1-9.3, b) mAk L1-11A und c) mAk L1-14.10. Zur Kontrolle wurden die jeweiligen Membranen mit anti-V5 Antikörper überprüft.

Des Weiteren wurde die Bindungsspezifität auch im ELISA überprüft. In Abbildung 4.13 sind verschiedene mAk und deren Bindungsverhalten an die Ig1 Domäne dargestellt. Wie aus dem Graphen ersichtlich, binden L1-9.3, L1-OV198.5, L1-OV366.1, L1-OV543.18 und L1-5G3 mAk an die erste Domäne, sowie L1-38.12 (nicht dargestellt). In der Kontrollanalyse mit der gesamten L1-Länge zeigen alle mAk eine spezifische Bindung. L1-5G3 ist ein kommerziell erwerblicher

Antikörper. Wie schon in (Balaian et al., 2000; Nayeem et al., 1999) berichtet, erkennt dieser mAk ein Epitop in der Region zwischen der 56. und 175. Aminosäure des L1 Moleküls. Es konnte bestätigt werden, dass L1-5G3 ein Epitop in der ersten Ig-Domäne erkennt.

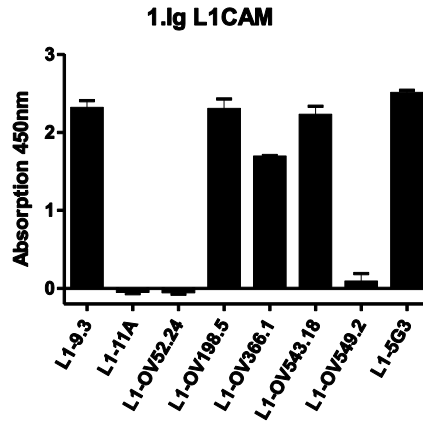


Abbildung 4.13: ELISA der ersten Domäne von L1. Immobilisiertes L1/Ig1-Fc wurde mit verschiedenen L1 mAk inkubiert. Im Anschluss erfolgte der Nachweis mit einem anti-Maus-POX Antikörper. Fünf mAk (L1-9.3, L1.OV198.5, L1-OV366.1, L1-OV543.18 und L1-5G3) binden spezifisch an die erste Domäne.

Hingegen bindet L1-14.10 an die 3. Ig-Domäne und L1-35.9 an die 6.Ig-Domäne. Weitere Bindungen sind in den FN-III Bereichen vorhanden (L1-11A, L1-OV549.20 und L1-OV52.24) (Abb. 4.14).

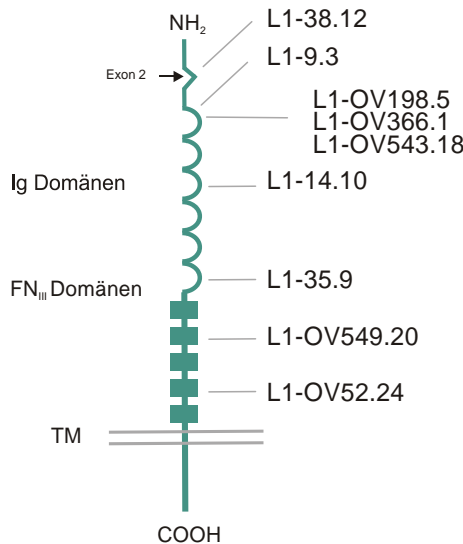


Abbildung 4.14: Schematische Darstellung der Epitop-Erkennungsstellen für die verschiedenen mAk im L1 Molekül. Es befinden sich fünf Bindungsepitope im Ig1-Bereich. Weitere mAk können am Ig3, Ig6 und im FN-III Bereich binden. (TM: Transmembran)

4.2.4 Funktionalität der mAk in der Immunhistologie

In der medizinischen Diagnostik werden häufig Biopsien von Tumoren mittels Histologie an Paraffinschnitten untersucht. Um eine Antikörpertherapie sinnvoll einsetzen zu können, muss

zuvor untersucht werden, ob der Tumor positiv für L1 ist. Um die Paraffingängigkeit der Antikörper nachzuweisen, wurden die verschiedenen mAk in der Immunhistochemie (IHC) getestet. In Abbildung 4.15 sind die verschiedenen Antikörper-Färbungen dargestellt. Fünf von neun Antikörpern zeigen eine spezifische Färbung auf L1 exprimierendem Tumorgewebe in Paraffinschnitten, wobei die stärkste Färbung mit L1-14.10 erfolgte. L1-9.3, L1-35.9 und L1-OV198.5 zeigen nur eine schwache Färbung und L1-OV52.24 eine moderate Reaktivität. Interessanterweise zeigt L1-38.12 keinen L1-Nachweis auf Tumorgewebe, färbt aber periphere Nerven spezifisch (Abb. 4.15 kleines Bild). Wie schon in vorhergehenden Experimenten gefunden, bindet L1-38.12 an Exon 2 in der ersten Domäne. Exon 2 ist nur in der neuronalen Form von L1 vorhanden. Somit erkennt L1-38.12 nur periphere Nerven in Organen, nicht aber L1 auf Tumorgewebe.

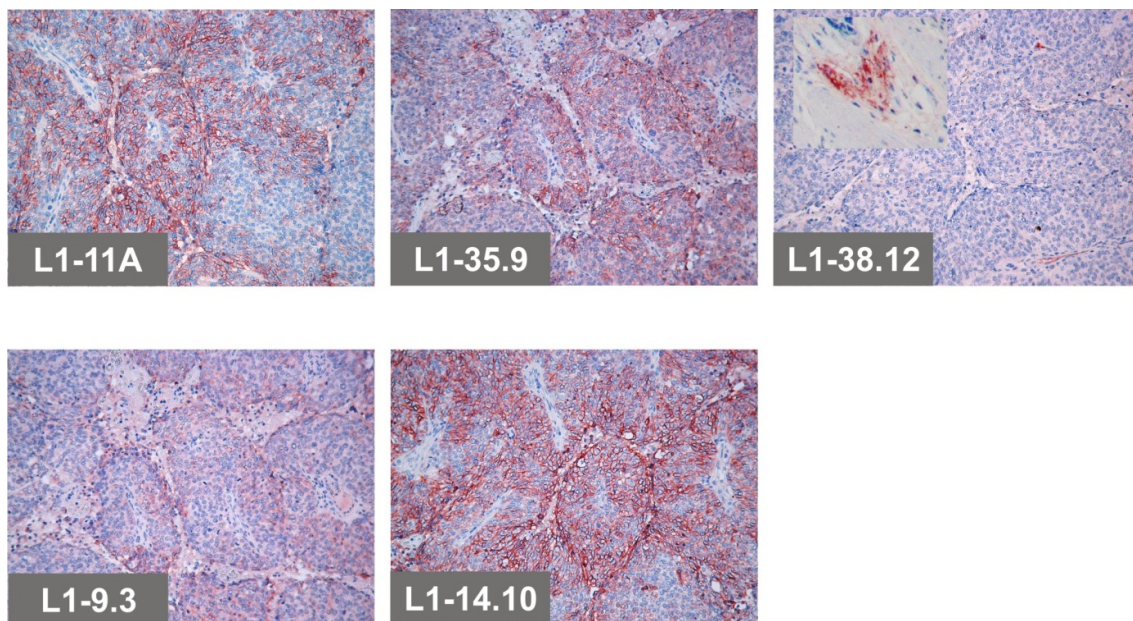


Abbildung 4.15: Immunhistochemischer Nachweis von L1 auf Tumorgewebschnitten. L1 exprimierende humane Tumorgewebe wurden entparaffiniert und 4 μm Schnitte erstellt. Nach einer Oberflächenbehandlung wurden die Schnitte mit dem jeweiligen mAk und anschließend mit dem konjugierten Zweitantikörper inkubiert. Nachgewiesen wurde L1 mit verschiedenen Antikörpern. Für den Nachweis mit L1-38.12 ist ein peripherer Nerv vergrößert (400x) dargestellt. Originalvergrößerung 100x. (In Zusammenarbeit mit Prof. Mina Fogel, Kaplan Medical Center, Rehovot, Israel)

4.2.5 Bestimmung der Bindungsassoziation K_D mittels Oberflächen-Plasmonresonanz

Durch die Reaktivität der mAk in der Durchflusszytometrie werden schon einige Unterschiede in der Bindungsreaktivität der Antikörper an L1 deutlich (Abb. 4.4). Um die genaue Bindungsstärke der jeweiligen mAk an isoliertes L1 zu ermitteln, wurde die Affinität über Biomolekulare Interaktions-Analysen (BIA) an einem BIAcore-Gerät gemessen. Diese Studie wurde durch Avidex Ltd (Abington, GB) durchgeführt. Die Meßmethode basiert auf dem

physikalischen Prinzip der Oberflächen-Plasmonresonanz (surface plasmon resonance, SPR) und ermöglicht die Messung von Protein-Protein-Wechselwirkungen in Abwesenheit von Kofaktoren, in dem die Wechselwirkung gereinigter Proteine betrachtet wird. Zur Messung wurde aufgereinigtes L1-Fc-Fusionsprotein auf einer Nickel-Oberfläche immobilisiert. Anschließend wurden die jeweiligen mAk über die Chipoberfläche geleitet. Über Massenveränderungen konnten dann die Dissoziations- und Assoziationsraten der einzelnen Antikörper ermittelt werden.

4.2.5.1 Kinetik und Bindungskonstanten der mAk

Um für die Antigen-Antikörper Wechselwirkung die Assoziations- (k_a) und die Dissoziationskonstanten (k_d) zu bestimmen, wurden in einem laminaren Fluss mehrere verschiedene Konzentrationen des jeweiligen Antikörpers verwendet. Für die kinetische Analyse einer Interaktion ist es notwendig, die Konzentration des Analyten zu variieren, da die Konstanten k_a und k_d nur errechenbar und nicht direkt messbar sind. Die Konstanten werden daher aus den Steigungen der Assoziations- und der Dissoziationskurven errechnet. Die Bestimmung der Bindungsassoziation K_D erfolgt dann über folgende Formel:

$$K_D = k_d/k_a$$

Gerade in der Analyse der Dissoziationsrate besitzt auch die Ligandendichte einen Einfluss. Bei einer hohen Ligandendichte kann es vermutlich zu Vernetzungen kommen, welche einen Einfluss auf die Dissoziationsrate haben können. Daher wurden zur Bestimmung der Kinetiken drei verschieden Chips mit unterschiedlichen L1-Fc-Dichten eingesetzt und anschließend wurden die berechneten Dissoziationsraten verglichen. Nach Injektionsstop des Antikörpers nach 120 s begann die Dissoziation des Komplexes bei einem kontinuierlichen Pufferfluss. Aufgrund der stabilen Antigen-Antikörper-Bindungen ist die Dissoziationsrate für Antikörper im Normalfall sehr gering ($k_d < 10^{-3}$ 1/s). Dies bedingt eine sehr lange Halbwertszeit der Dissoziation (> 12 h), sodass eine korrekte Bestimmung der Dissoziationsrate nicht möglich war. Daher wurde in diesen Experimenten eine Dissoziation nach 440 s (entspricht 5 min Dissoziation) bestimmt, für die dann eine Dissoziationsrate errechnet wurde.

In Abbildung 4.16 sind zwei mAk als Beispiel im Sensorgramm dargestellt. L1-9.3 wurde in 10 verschiedenen Konzentrationen gemessen (Abb. 4.16a). Mit steigender Konzentration stieg auch die Stärke des Signals (RU). Die Assoziationskurve steigt schnell und stark an bis zu einem Sättigungsbereich. Der Injektionsstop nach 120s zeigt eine gleichbleibende Signalstärke. Es findet eine kaum messbare Dissoziation statt. L1-9.3 führt zu einer schnellen Assoziation an L1

und zu einer sehr langsamen Dissoziation. Im Gegensatz dazu zeigt der L1-OV549.20 mAk einen langsameren Signalanstieg für die Assoziation an (Abb. 4.17b). Nach 120 s kommt es direkt nach Injektionsstopp zu einer sichtbaren Dissoziation durch Absinken der Signalstärke, besonders im Bereich der höheren Konzentrationen. L1-OV549.20 führt zu einer langsameren Assoziation und einer schnelleren Dissoziation des Antikörpers.

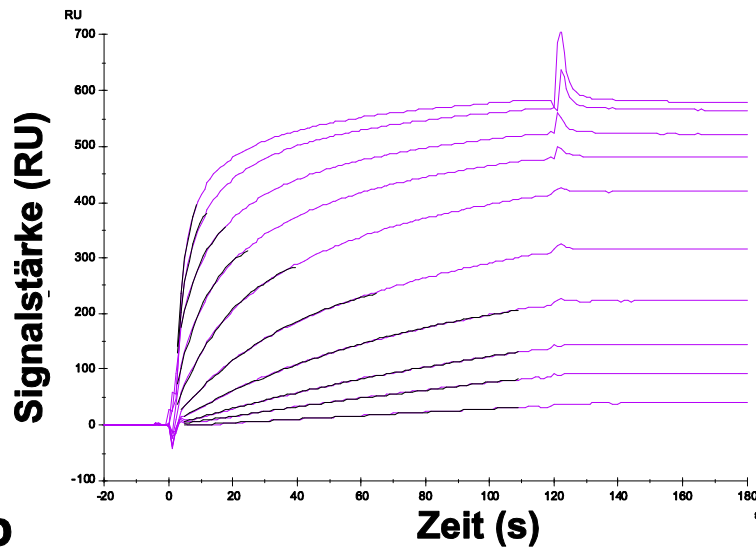
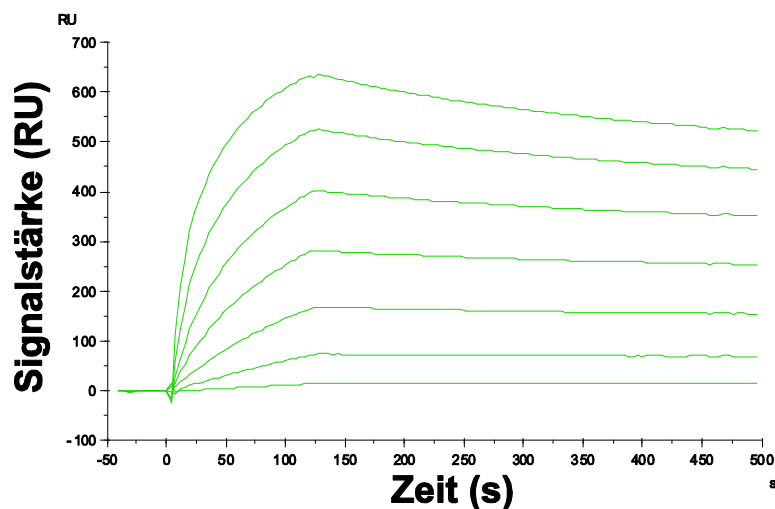
a**Beispiel L1-9.3: schnelle Assoziation und langsame Dissoziation****b****Beispiel L1-OV549.20: langsamere Assoziation und schnellere Dissoziation**

Abbildung 4.16: Beispiel einer Biacore-Analyse zweier L1-Antikörper. Das Sensorgramm zeigt in a) die Kinetik des L1-9.3 Antikörpers, durchgeführt mit 10 verschiedenen Antikörperkonzentrationen und in b) die Kinetik von L1-OV549.20 mit 7 verschiedenen Antikörperkonzentrationen. Nach jeweils 120 s erfolgte der Injektionsstopp. Mit steigender Antikörperkonzentration steigt die Signalstärke an. (RU Signalstärke). (Abbildung und Analyse von Avidex Ltd, Abingdon, Grossbritannien)

Nach Messung aller Analyten wurden die Sensorgramme der untersuchten Antigen-Antikörper Wechselwirkungen ausgewertet. Die Assoziations- und Dissoziationsrate wurde über dem Mittelwert aus den berechneten Raten für die verschiedenen Konzentrationen

des Antikörpers ermittelt. Da sich die berechneten Raten innerhalb der drei Ligandendichten sehr ähnelten, wurden auch hier die Mittelwerte errechnet.

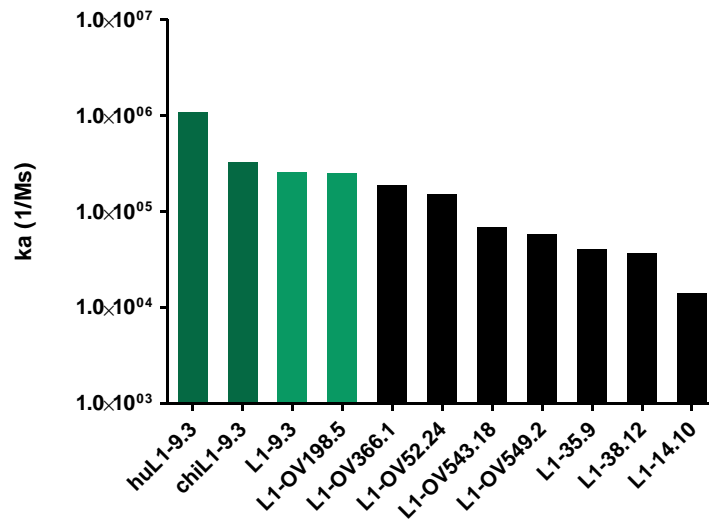


Abbildung 4.17: Kinetik der Assoziation. Dargestellt sind die Assoziationskonstanten k_a der einzelnen Antikörper. In grün dargestellt sind die mAks mit der besten Assoziationskonstante. Dunkelgrün sind dabei die humanisierten Varianten von L1-9.3 (HuL1-9.3 und ChiL1-9.3).

In Abbildung 4.17 sind die errechneten Assoziationskonstanten k_a dargestellt. Hieraus ergibt sich für den L1-9.3 mAks bzw. seine humanisierten Varianten (HuL1-9.3 und ChiL1-9.3) (siehe Kapitel 4.5) die höchste Assoziationskonstante. Auch L1-OV198.5 zeigt vergleichbare Werte. Bei den weiteren Antikörpern ist die Assoziationskonstante je nach Antikörper kleiner. L1-35.9, L1-38.12 und L1-14.10 besitzen die geringsten Assoziationskonstanten. Die Ermittlung der Dissoziationsrate k_d ergab für alle mAks eine stabile Bindung ($k_d < 10^{-3}$ 1/s). Die k_d -Werte rangierten zwischen 5×10^{-4} 1/s und 1×10^{-6} 1/s.

Nach Ermittlung der Bindungsassoziation K_D ergeben sich die besten und somit die geringsten Werte für Antikörpervarianten des L1-9.3, für L1-14.10 und für L1-38.12. Die monoklonalen Antikörper L1-OV198 und L1-35.9 zeigen moderate Werte. Alle anderen gemessenen mAks zeigen höhere Werte für die Bindungsassoziationskonstante (Abb. 4.18).

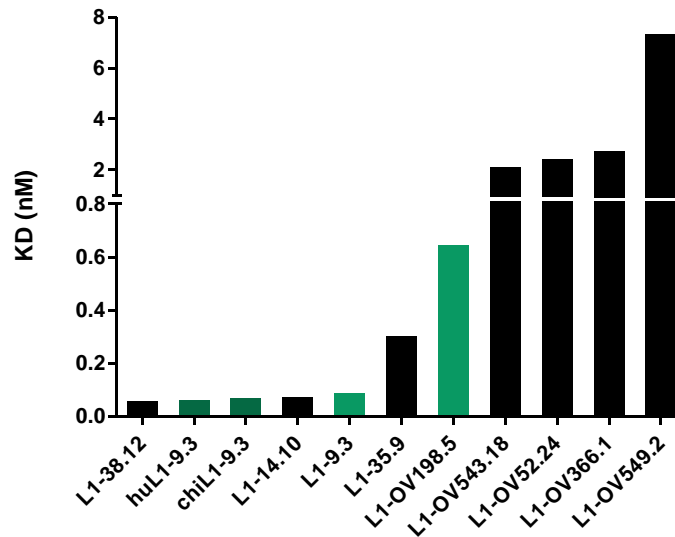


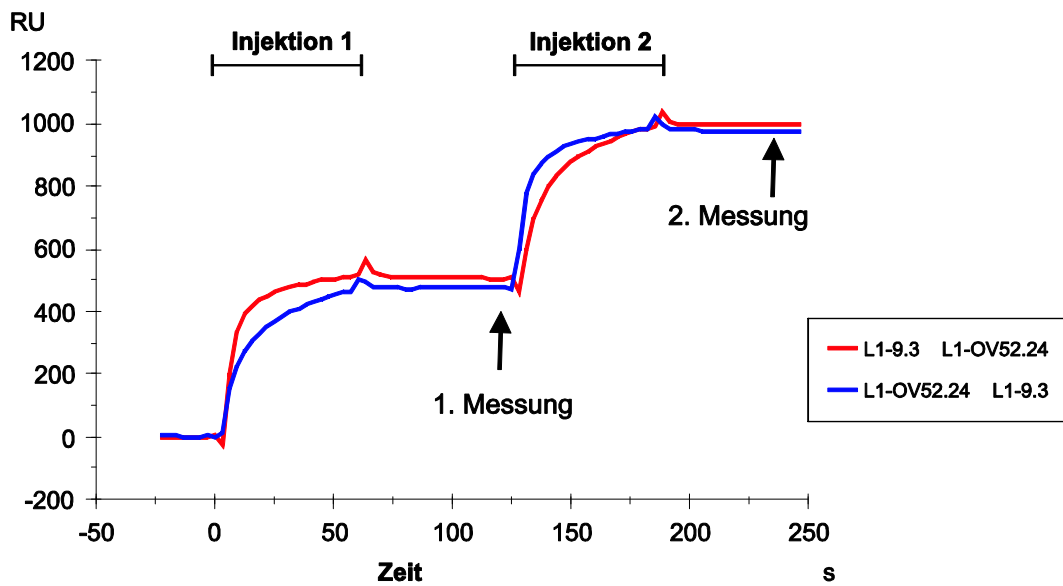
Abbildung 4.18: Berechnung der Bindungsassoziationskonstante K_D . Abgebildet sind die jeweiligen ermittelten K_D -Werte der einzelnen Antikörper. In grün sind diejenigen mAk dargestellt, welche sehr gute ka Werte besitzen. Sie werde inn der funktionalen Analyse genauer untersucht.

4.2.5.2 Kreuzblockierendes Verhalten verschiedener L1-Antikörper

Mit Hilfe der Oberflächen-Plasmonresonanz-Methode können auch Interaktionen der Antikörper untereinander detektiert werden. Somit konnte gemessen werden, ob ein identisches Epitop vorliegt, wodurch es zu einer Bindungsblockade kommen kann. Hierfür wurden über das immobilisierte L1-Fc verschiedene mAk aufeinanderfolgend übergeleitet. Durch Messung der Signalstärke konnte die Assoziation und die Dissoziation der Antikörper ermittelt werden. In Abbildung 4.19 sind zwei Beispiele im Sensorgramm beschrieben. Das Beispiel in Abbildung 4.19a zeigt die Ergebnisse der Reaktion von L1-9.3 mit L1-OV-52.24. L1-9.3 bindet an die erste Domäne und L1-OV52.24 erkennt ein Epitop im FN-III Bereich. Somit sollten sich diese beiden mAk nicht in ihrer Bindungsaffinität blockieren. Nach Injektionsende des ersten Antiköpers L1-9.3 bleibt die Signalstärke und somit die Bindung des Antiköpers erhalten. Wird anschließend der zweite mAk L1-OV52.24 injiziert, so erhält man einen weiteren Anstieg der Signalstärke durch die Bindung des zweiten Antiköpers an ein weiteres Epitop. Diese beiden mAk können gleichzeitig an L1 binden ohne sich gegenseitig zu beeinflussen oder zu hemmen. Auch eine Umkehrung der Injektionsreihenfolge ändert das Ergebnis nicht.

In Abbildung 4.19b ist ein Beispiel der Affinitätsinhibition dargestellt. Im diesem Versuch wurden ein muriner L1-9.3 und ein humaner L1-9.3 mAk verwendet, welche das selbe Epitop erkennen.

a L1-9.3 und L1-OV52.24 zeigen keine Blockierung



b L1-9.3 und ChiL1-9.3 zeigen Bindungsinhibition

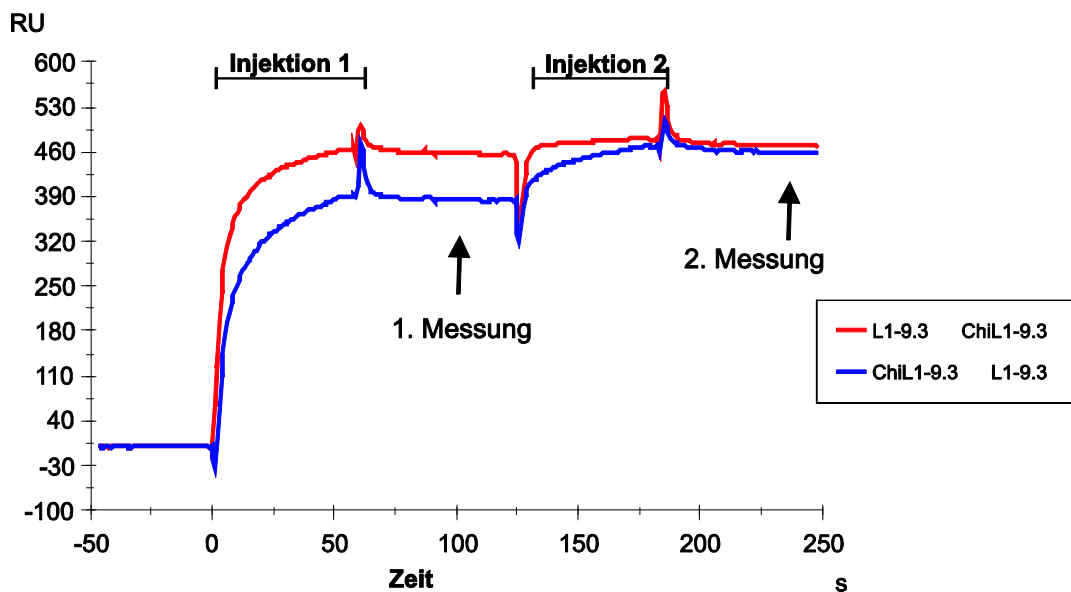


Abbildung 4.19: Analyse der Kreuzblockierung zweier L1-Antikörper. In Beispiel a) liegt keine Kreuzblockade vor. Die Analyse wurde mit L1-9.3 und L1-OV52.24 durchgeführt. In b) ist ein Beispiel der Affinitätsinhibition dargestellt. Die Analyse erfolgte mit dem murinen und dem chimärisierten L1-9.3 Antikörper. Die Injektion des zweiten Antikörpers erfolgte jeweils nach 120 s. (Abbildung und Analyse bei Avidex Ltd, Abingdon, Grossbritannien)

Im Falle einer Inhibition konnte nach Injektion des zweiten Antikörpers keine weitere Bindung erfolgen, da das Epitop des zweiten Antikörpers schon belegt war. Die Signalintensität stieg daher nicht weiter an.

Zusammenfassend kann für einige Antikörper, insbesondere solche mit einem Epitop in der ersten Domäne, eine Bindungsinhibition festgestellt werden. L1-OV198.5 zeigt kreuzblockierende Wirkung mit L1-OV366.1 und L1-OV543.18. Es besteht daher die Annahme,

Die möglichen Kreuzreaktivität von L1 mAk mit diesen Molekülen wurde am Beispiel von CHL1 analysiert. Hierfür wurde die Endometrialkarzinom-Zelllinie Ischikawa (IK) mit L1, CHL1 (IK-L1, IK-CHL1) bzw. einem Leervektor (IK-mock) transfiziert. Im Western Blot wurde anschließend die Bindungsfähigkeit der verschiedenen mAk untersucht (Abb. 4.21). Ein Antikörper gegen CHL1, welcher im N-terminalen extrazellulären Bereich bindet, zeigt nur eine Reaktion mit den CHL1-transfizierten Zellen, aber nicht mit L1 exprimierenden Zellen. Mit keinem mAk erfolgte eine Bindung an IK-mock Kontrollzellen. L1-2C2, ein intrazellulär bindender Antikörper gegen L1, zeigt nicht nur eine Bindung an L1 sondern auch gegen CHL1 exprimierende Zellen. Hier liegt somit eine Kreuzreaktivität vor. Keiner der getesteten L1 mAk gegen die extrazelluläre Region zeigt eine Kreuzreaktivität mit CHL1 exprimierenden Zellen.

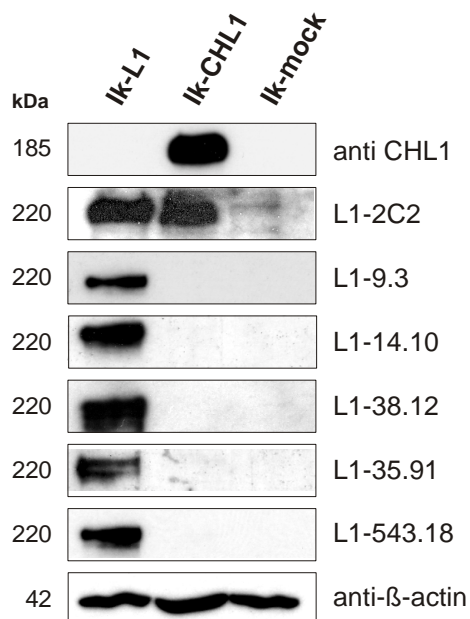


Abbildung 4.21: Analyse der Bindungsreaktivität verschiedener mAk gegen L1 und CHL1. Getestet wurden native sowie L1 und CHL1 exprimierende IK Zellen. Analysiert wurden verschiedene extrazellulär bindende L1 mAk sowie ein anti-CHL1-Antikörper gegen die extrazelluläre Region. Des Weiteren wurde L1-2C2 Antikörper analysiert, welcher gegen die zytoplasmatische Region von L1 gerichtet ist. Zur Kontrolle der gleichmäßigen Ladung wurde β -Aktin detektiert.

Eine zusätzliche Analyse dieser Zelllinien in der Durchflusszytometrie konnten die Ergebnisse bestätigen. Die Analyse von IK-mock Zellen, IK-CHL1 und IK-L1 wurde mit den verschiedenen L1 mAk gegen den extrazellulären Bereich durchgeführt. Eine spezifische Bindung resultiert nur mit L1 exprimierenden Zellen (Abb. 4.22). Da IK Zellen endogen sehr schwach L1 exprimieren, kann man mit stark bindenden Antikörpern auch in der IK-mock Kontrolle eine schwache Bindung erkennen (u.a. mit L1-9.3 und L1-OV198.5). Daher zeigt L1-38.12 die besten Ergebnisse. Durch die spezifische Bindung an die neuronale Form kann L1-38.12 endogen exprimiertes L1 in IK Tumorzellen nicht erkennen. Somit konnte nur ein starkes Signal mit den L1-transfizierten Zellen erhalten werden, aber kein Signal mit IK-CHL1 und IK-mock Zellen.

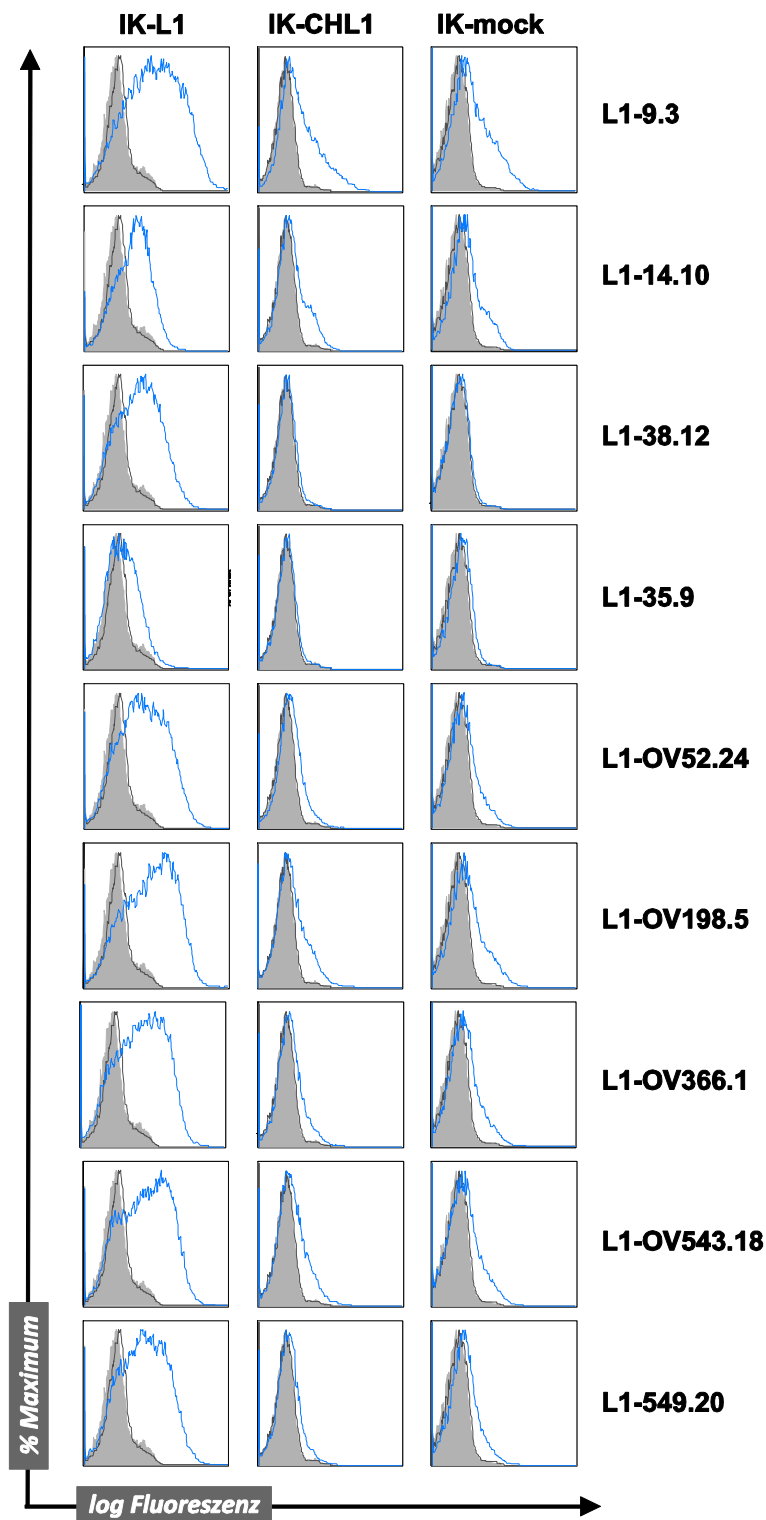


Abbildung 4.22: Durchflusszytometrische Analyse der Kreuzreaktivität verschiedener L1-Antikörper. Analysiert wurden die Bindungsaffinitäten aller mAk gegen die extrazelluläre Domäne von L1 gegen IK-L1, IK-CHL1 und IK-mock.

Eine weitere Analyse der Kreuzreaktivität wurde im ELISA durchgeführt. Hierfür wurde entweder rekombinantes CHL1-Fc oder L1-Fc immobilisiert. Wiederum wurden zur Analyse die verschiedenen L1 mAk gegen die extrazelluläre Region eingesetzt, sowie der N-terminal bindende CHL1-Antikörper. In Abbildung 4.23 zeigt sich im ELISA mit immobilisiertem CHL1-Fc

nur eine Bindung mit dem CHL1-Antikörper. Die L1-Antikörper gegen den extrazellulären Bereich können kein CHL1 erkennen. Demgegenüber konnte im L1-Fc ELISA mit allen L1 mAk ein deutliches Signal detektiert werden, wohingegen der CHL1-Antikörper keine Bindung zeigt. Zur Kontrolle wurde ein Antikörper gegen humanes Fc eingesetzt, welcher in beiden durchgeführten ELISA Test eine starke Bindung zeigt.

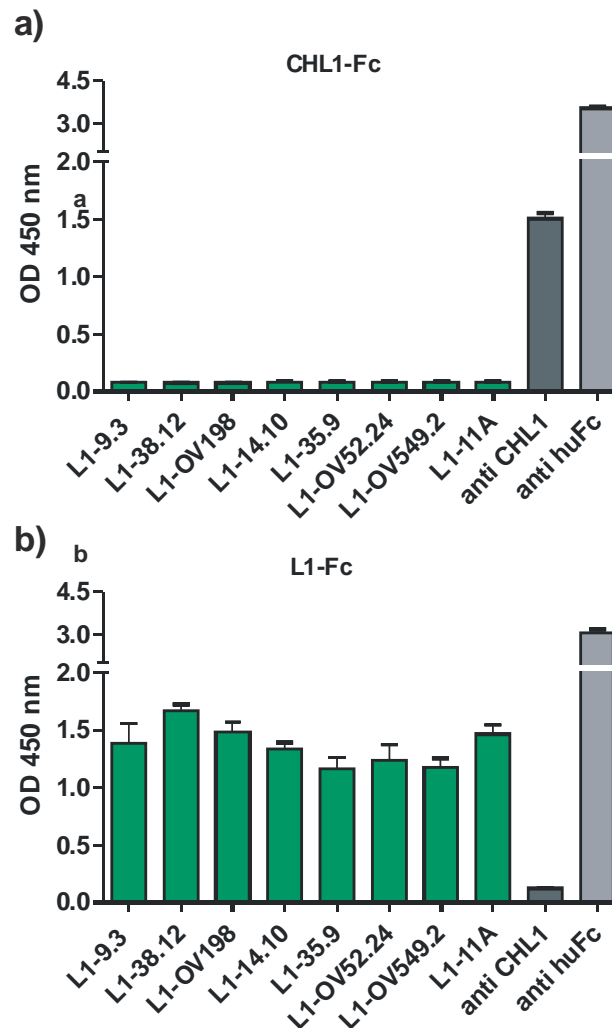


Abbildung 4.23: Analyse der Kreuzreaktivität im ELISA mit CHL1-Fc bzw. L1-Fc. Getestet wurden die mAk gegen die extrazelluläre Domäne von L1, sowie ein CHL1-Antikörper. In a) ist die Analyse gegen immobilisiertes CHL1-Fc dargestellt in b) gegen immobilisiertes L1-Fc. Als Positivkontrolle wurde ein Antikörper gegen humanes Fc (anti-hu-Fc) eingesetzt.

4.2.7 Analyse der Kreuzreaktivität zu CHL1 mit zytoplasmatischen L1-Antikörpern

Im Gegensatz zum extrazellulären Bereich besitzen CHL1 und L1 im zytoplasmatischen Bereich eine größere Homologie (siehe Abb. 4.20). Daher wurde die Analyse auf den zytoplasmatischen Bereich erweitert. Gibt es in diesem Bereich Antikörper, welche beide Molekülstrukturen erkennen können? Um diese Frage zu klären, wurden GST-Fusionsproteine mit den jeweiligen zytoplasmatischen Anteilen von CHL1 und L1 hergestellt. Nach Aufreinigung wurden sie im

Western Blot getestet (Abb. 4.24). Zur Analyse wurden drei verschiedene zytoplasmatische L1 Ak verwendet: 745H7 (Schaefer et al., 2002), 2C2 und pcytL1. Alle Antikörper binden spezifisch an den zytoplasmatischen Teil von L1 und CHL1. Es liegt demnach für 745H7, 2C2 sowie für pcytL1 eine Kreuzreaktivität mit CHL1 und L1 vor.

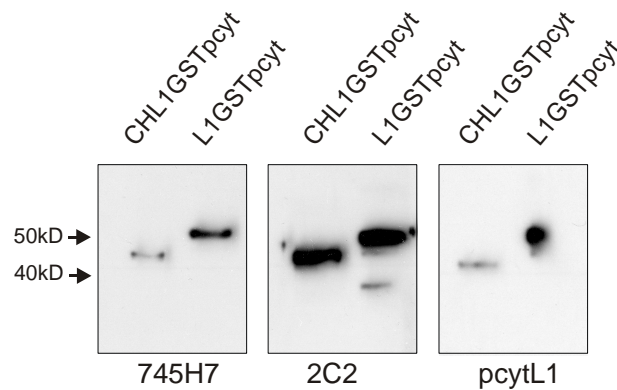


Abbildung 4.24: Analyse von zytoplasmatischen L1 Ak im Western Blot. Die GST Fusionsproteine mit den zytoplasmatischen Bereich von CHL1 und L1 wurden im Western Blot zur Analyse eingesetzt. Getestet wurden drei verschiedene Antikörper, welche gegen den zytoplasmatischen Teil von L1 gerichtet sind (745H7, 2C2 und pcytL1). (Durchführung in Zusammenarbeit mit Helena Kiefel und Marco Pfeifer, DKFZ-Heidelberg)

Zur Bestätigung wurden die Fusionproteine auch im ELISA analysiert (Abb. 4.25). Hierfür wurden CHL1cyt-GST bzw. L1cyt-GST immobilisiert und mit den Antikörpern inkubiert. Anschließend wurde mit einem Peroxidase konjugierten Zweitantikörper detektiert. Die Antikörper 745H7, 2C2 und pcytL1 binden sowohl an den zytoplasmatischen Teil von CHL1 als auch an L1. Als Negativkontrolle zeigte der extrazellulär-bindende mAk L1-11A keine Bindung.

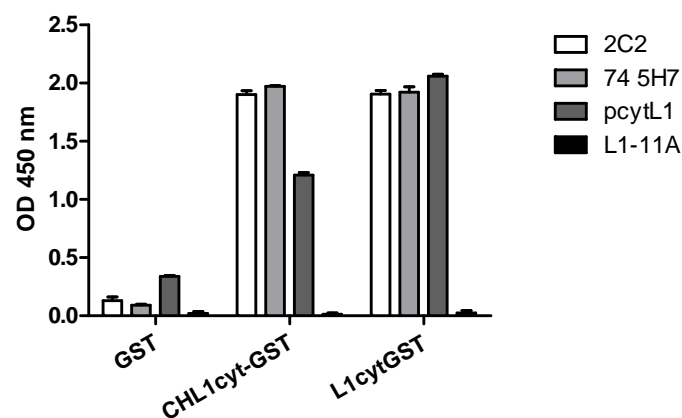


Abbildung 4.25: Analyse der zytoplasmatischen L1 Ak im ELISA. Die Fusionsproteine CHL1cytGST und L1cytGST wurden auf einer 96-Lochplatte immobilisiert. Anschließend wurde mit den zytoplasmatischen Antikörpern 745H7, 2C2 und pcytL1 inkubiert. Als Negativkontrolle diente der extrazellulär bindende mAk L1-11A. Außerdem wurde reines GST als Kontrolle immobilisiert. (Durchführung in Zusammenarbeit mit Helena Kiefel und Marco Pfeifer, DKFZ-Heidelberg)

Wie schon früher gezeigt werden konnte, erkennt 745H7 ein Epitop gegen die SEARPMKDETFGEY Peptidsequenz (Schaefer et al., 2002). Diese Sequenz befindet sich nicht nur im L1-Molekül, sondern auch im CHL1-Molekül (Abb. 4.21). Stellt diese Aminosäuresequenz auch ein Epitop für den L1-2C2 Antikörper dar? Um diese Frage zu beantworten, wurde ein synthetisches Peptid hergestellt, welches diese Aminosäuresequenz besitzt. Anschließend wurde dieses Peptid im ELISA eingesetzt. Sowohl 745H7 als auch 2C2 binden spezifisch an diese Sequenz. Ein extrazellulär bindender L1 mAk zeigte keine Bindung (Abb. 4.25). 2C2 erkennt eine Peptidsequenz, welche in der Erkennungsregion des 745H7 Antikörpers liegt.

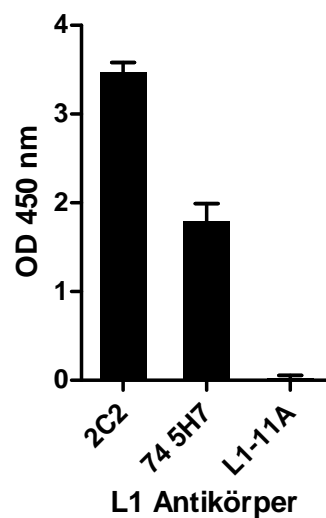


Abbildung 4.26: Analyse der Bindung an das SEARPMKDETFGEY Peptid. Das Peptid wurde immobilisiert und im ELISA getestet. Zur Analyse wurden die L1-Antikörper 745H7 und 2C2 verwendet. L1-11A wurde als Negativkontrolle eingesetzt.

4.2.8 Zusammenfassung der Charakteristika von monoklonalen Antikörpern gegen L1

In Tabelle 4.3 sind die charakteristischen Eigenschaften der generierten mAk zusammengefasst. Neun spezifische mAk wurden gegen das L1 Molekül hergestellt. Hiervon sind nach Epitopanalyse fünf Antikörper gegen die erste Domäne gerichtet. Von diesen Antikörpern zeigen drei (L1-OV198.5, L1-OV366.1 und L1-OV543.18) kreuzblockierende Wirkungen untereinander. L1-9.3 und seine humanisierten Varianten zeigen nach kinetischer Analyse der Antigen-Antikörperwechselwirkung die besten Ergebnisse, da sie die schnellste Assoziation und eine geringe Dissoziation besitzen. Immunhistologisch zeigte L1-14.10 die besten Resultate. L1-38.12 zeigt eine spezifische Bindung an die neuronale Isoform von L1. Keiner der gelisteten Antikörper bindet an das L1 homologe CHL1-Molekül.

Tabelle 4.3 Hergestellte monoklonale Antikörper gegen humanes L1. Beschrieben werden neun synthetisierte mAk, sowie zwei humanisierte Varianten von L1-9.3.

mAk	L1 Epitop	WB	FACS	IHC	K _D (M)
L1-9.3	1. Ig	+++	+++	+	8,50E-11
L1-14.10	3. Ig	+++	+	+++	7,10E-11
L1-38.12	1. Ig (Exon 2)	+	+	-	5,40E-11
L1-35.9	6. Ig	++	+	+	3,00E-10
L1-OV52.24	4-5. FN	+++	+++	++	2,41E-09
L1-OV198.5	1. Ig	++	+++	+	6,45E-10
L1-OV366.1	1. Ig	-	+++	-	2,73E-09
L1-OV543.18	1. Ig	++	+++	-	2,10E-09
L1-OV549.20	1-3. FN	+++	+++	-	7,34E-09
ChiL1-9.3	1. Ig	n.t.	+++	n.t.	6,70E-11
HuL1-9.3	1. Ig	n.t.	+++	n.t.	5,90E-11

4.3 Funktionelle Analyse monoklonaler L1-Antikörper in vitro

4.3.1 Inhibition der L1 homophilische Bindung durch L1-Ak

Die Funktionalität von L1 wird unter anderem durch Bindung an Liganden hervorgerufen. Bekannte Bindungspartner von L1 sind Integrine, Neurocan und Neurophilin-1 (Brummendorf et al., 1998; Hortsch et al., 2001). Bindung an $\alpha\beta$ 3-Integrine sowie eine heterophilische Interaktion mit NCAM stimuliert das Neuritenwachstum (Heiland et al., 1998; Horstkorte et al., 1993; Kadmon et al., 1990; Yip und Siu, 2001; Yip et al., 1998). Die Bindung erfolgt in den meisten Fällen über die RGD-Stelle in der sechsten Ig-Domäne (Felding-Habermann et al., 1997; Montgomery et al., 1996; Ruppert et al., 1995) oder über FN-III (Silletti et al., 2000). Neurocan und Neurophilin-1 binden an die erste Ig Domäne von L1 (Castellani, 2002; Oleszewski et al., 1999). Durch die Bindung an Neurocan kann das Axionwachstum blockiert werden (Friedlander et al., 1994; Rauch et al., 2001). Außerdem kann L1 aber auch eine homophilische Bindung in trans eingehen. Diese findet zwischen den Ig1-Ig4 Domänen statt (Haspel et al., 2000) (Gouveia et al., 2008).

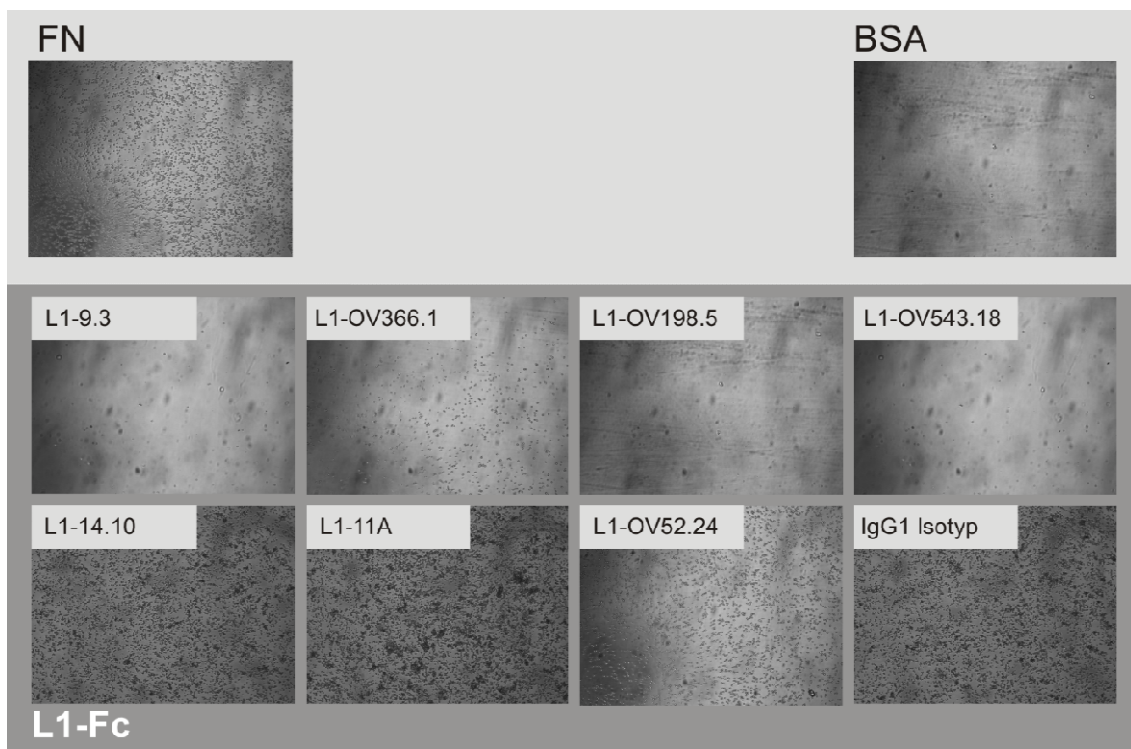


Abbildung 4.27: Analyse der Inhibition der homophilischen L1-Bindung. Nach Inkubation von J558-L1 Zellen mit den jeweiligen Antikörpern wurden die Zellsuspension auf immobilisiertes L1-Fc gegeben. Nach 30 min Inkubation wurden die Objektträgern gewaschen und fixiert. Als Positivkontrolle diente immobilisiertes Fibronektin (FN). Die Negativkontrolle mit BSA zeigte keine Bindung. Es erfolgten mikroskopische Aufnahmen. Originalvergrößerung 100x.

Im folgenden Experiment sollte untersucht werden, ob die verschiedenen L1 mAk die homophilische Bindung blockieren können. L1 exprimierende Suspensionszellen (J558-L1) wurden mit dem entsprechenden mAk inkubiert und anschließend auf immobilisiertes L1-Fc gegeben. Die Abbildung 4.27 zeigt mikroskopische Aufnahmen der homophilen Interaktion beziehungsweise deren Inhibition durch Antikörper. Zellen können über Integrine an Fibronektin (FN) binden, daher wurde FN als Kontrolle mitgeführt. Um die unspezifische Bindung zu kontrollieren, wurde BSA als Negativkontrolle eingesetzt. Wie man der Abbildung 4.27 entnehmen kann, gibt es eine spezifische homophilische L1-Bindung unter Verwendung von einer IgG1 Isotypkontrolle, sowie mit L1-14.10, OV52.24 und L1-11A. Eine Bindungsinhibition wird durch den mAk L1-9.3, L1-OV198.5, L1-OV366.1 und L1-OV543.18 erreicht.

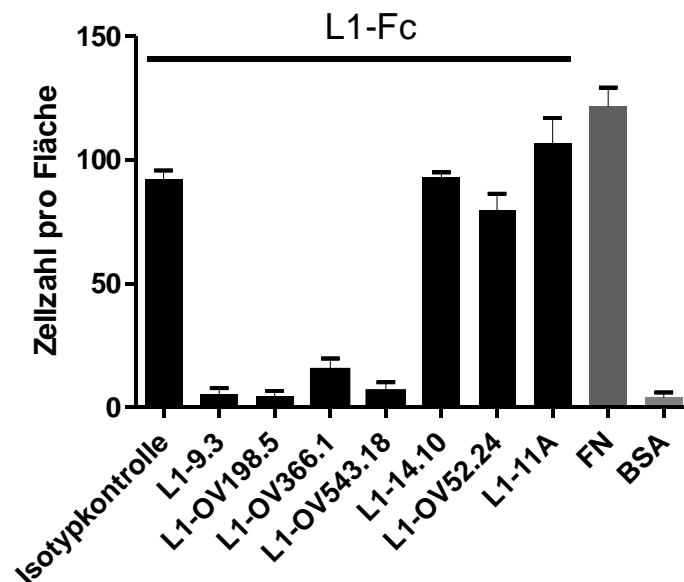


Abbildung 4.28: Quantitative Auswertung der L1-L1 Inhibition. Im Diagramm ist die Zellzahl der gebundenen Zellen pro mikroskopischem Gesichtsfeld angegeben.

Zur Quantifizierung wurden die Zellen im mikroskopischen Gesichtsfeld ausgezählt. Abbildung 4.28 zeigt die Mittelwerte der 6-fach-Bestimmung der gebundenen Zellen. Hieraus ist ersichtlich, dass nur L1-9.3, L1-OV366.1, L1-OV543.18 und L1-OV198.5 die L1-L1 Interaktion unterbinden können. Diese vier Antikörper richten sich gegen die erste Domäne von L1. Alle anderen getesteten mAk zeigen keine Blockade der homophilen L1-Bindung.

4.4 Funktionelle Untersuchung von L1-Antikörpern in vivo

Neben in vitro Experimenten wurden mit ausgewählten L1 mAk auch in vivo Experimente durchgeführt. Als Kandidatantikörper wurde L1-9.3 gewählt. Die Auswahl erfolgte aufgrund der höchsten Antigen-Affinität und der L1-L1 Interaktionsinhibition. Des Weiteren wurde L1-OV198.5 sowie L1-11A analysiert. In Vorarbeiten (Arlt et al., 2006; Gast et al., 2008) konnte gezeigt werden, dass L1-9.3 und L1-11A Behandlung eine Tumorreduktion im SKOV3ip Xenograft-Modell bewirkt.

4.4.1 L1-IgG2a Antikörpervarianten können die Überlebensrate in vivo verlängern

Im folgenden Modell wurde daher analysiert, ob neben dem Tumorwachstum auch die Überlebensrate der Mäuse beeinflusst wird. Hierfür wurden immunsupprimierten CD1 Mäusen humane Ovarialkarzinomzellen (SKOV3ip) intraperitoneal injiziert. Zwei Tage nach Applikation der Zellen im Bauchraum wurde mit der Therapie begonnen. Es wurde jeweils 10 mg Antikörper pro kg Körpergewicht bzw. PBS (Kontrolle) dreimal in der Woche i.p. injiziert. Die Tiere wurden regelmäßig auf Symptome wie Gewichtsverlust, Aszitesbildung und Wohlbefinden untersucht. Reduzierte sich das Gewicht um mehr als 15% oder zeigten die Tiere andere lebensbedrohliche Anzeichen, wurden sie getötet und analysiert. Zu den lebensbedrohlichen Anzeichen gehörten u.a. Aszitesbildung, auffällige Apathie oder extreme Abmagerung.

Überraschenderweise zeigt weder die Behandlung mit L1-9.3, noch mit L1-11A ein signifikant verlängertes Überleben der Mäuse gegenüber der Kontrollgruppe. Allerdings resultiert die Behandlung mit L1-OV198.5 in einer signifikant erhöhten Überlebensrate (Abb. 4.29).

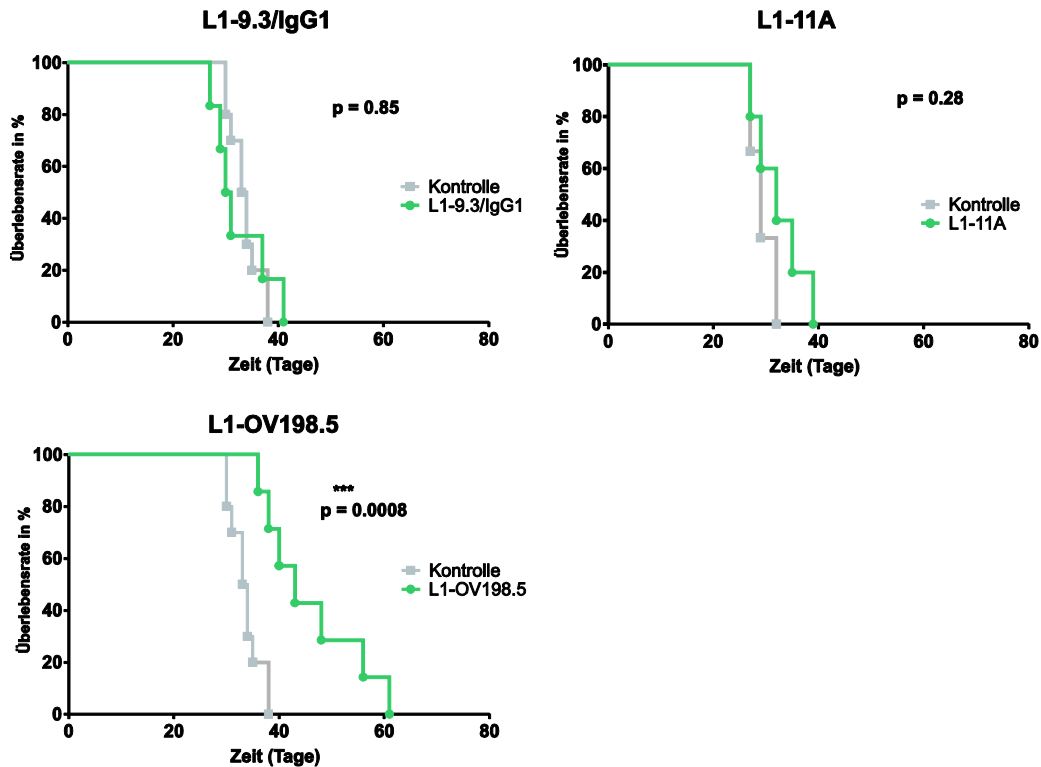


Abbildung 4.29: Überlebensraten im SKOV3ip Maus-Xenograft-Modell nach L1-Antikörpertherapie. Die Überlebensraten nach Behandlung mit L1-9.3, L1-11A, L1-OV198.5 oder PBS wurden analysiert und als Kaplan-Meier Plots dargestellt. Jede Gruppe bestand aus sieben Tieren. Die Behandlung erfolgte 2 Tage nach Tumorinokulation mit je 10 mg Antikörper pro kg Körpergewicht dreimal wöchentlich.

Die Ermittlung der jeweiligen mittleren Überlebensrate nach mAk-Behandlung ergab: L1-9.3 = 30,5 Tage; L1-11A = 32,0 Tage; L1-OV198.5 = 43,0 Tage, Kontrolle = 33,5 Tage. (In Zusammenarbeit mit Prof. Mina Fogel, Kaplan Medical Center, Rehovot, Israel)

Worin liegt die Ursache für die unterschiedlichen Erfolge nach der Antikörpertherapie? Gegenüber der IgG1 Variante in L1-9.3 und L1-11A besitzt L1-OV198.5 einen IgG2a Isotyp. Um zu klären, ob die Isotypvarianten einen Einfluss auf den Therapieerfolg haben können, wurden verschiedene Maus-Isotypvarianten des L1-9.3 Antikörpers hergestellt. Hybridomzellen können verschiedene Isotypen herstellen. Ein Isotyp Wechsel in proliferierenden Hybridomazellen tritt sehr selten auf, ungefähr bei 10^{-5} bis 10^{-7} Zellen pro Generation. In B-Zellen erfolgt der Isotyp-Switch schrittweise von einem Fc-Gen zum nächsten Gen (Sablitzky et al., 1982). Mit Hilfe der Durchflusszytometrie wurden die jeweiligen Hybridomzellen analysiert. Die Selektion erfolgte mit Hilfe von Zweitantikörpern gegen die verschiedenen Isotypvarianten. Es konnten Hybridomzellen selektioniert werden, welche IgG1, IgG2a und IgG2b Varianten des L1-9.3 Antikörpers produzierten. Nach Isolierung wurden die Mediumüberstände der ausgewählten Hybridomzellen im ELISA auf ihr Isotypenspezifität untersucht (Abb. 4.30).

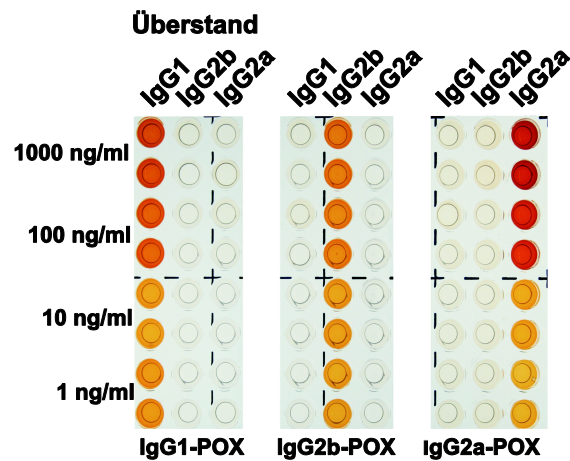


Abbildung 4.30: Nachweis der L1-9.3 Isotypvarianten. Die selektionierten Hybridomzellen wurden auf ihre Antikörperproduktion im ELISA überprüft. Immobilisiertes L1-Fc (1 - 1000 ng/ml) wurde mit Mediumüberständen der Hybridomzelllinien inkubiert. Im Anschluss erfolgte der Nachweis mit Hilfe von Peroxidase gekoppelten Antikörpern gegen die verschiedenen Isotypvarianten (IgG1, IgG2a, IgG2b). (In Zusammenarbeit mit Dr. G. Moldenhauer, DKFZ, Heidelberg)

Wie in der Abbildung 4.31 erkennbar, produzieren die selektionierten Zellen nur einen spezifischen Isotypen des Antikörpers. Nach Aufreinigung der mAk wurden diese zur Kontrolle der L1-Spezifität durchflusszytometrisch auf SKOV3ip Zellen analysiert (Abb. 4.31). Die Isotypspezifität konnte mit Hilfe des Zweitantikörpers verifiziert werden. Die L1-9.3 Isotypvarianten wurden freundlicherweise von Dr. G. Moldenhauer produziert und zur Verfügung gestellt.

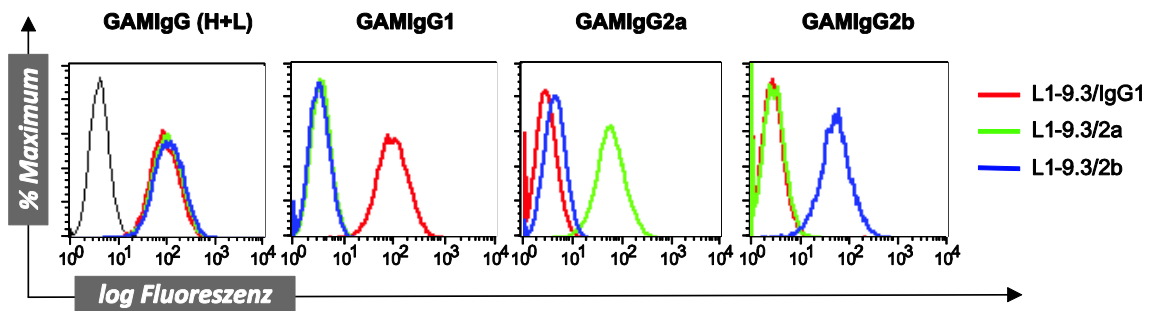


Abbildung 4.31: Durchflusszytometrische Analyse der aufgereinigten L1 mAk. Analysiert wurden die Antikörpervarianten auf L1 Spezifität. Die Bindung erfolgte an SKOV3ip Zellen. Die Isotypspezifität wurde durch Einsatz verschiedener Zweitantikörper bestimmt. GAMIgG: Antikörper gegen die verschiedenen IgG Isotypen der Maus. (In Zusammenarbeit mit Dr. G. Moldenhauer, DKFZ, Heidelberg)

Im folgenden Experiment wurden die Einflüsse der verschiedenen Isotypvarianten (IgG1, IgG2a, IgG2b) des L19.3 Antikörpers im Hinblick auf die Überlebensrate im Xenograft-Modell untersucht. Als Positivkontrolle wurde L1-OV198.5 mitgeführt. Der Versuchsaufbau erfolgte wie zuvor beschrieben. Dies Experiment ergab, dass sowohl die L1-9.3/IgG2a Variante wie auch der L1-OV198.5 eine signifikante Verlängerung der Überlebensrate bewirken. Die

Therapie mit den Isotypvarianten IgG2b und IgG1 des L1-9.3 Antikörpers resultiert in einer nur sehr geringen Lebensverlängerung (Abb. 4.32).

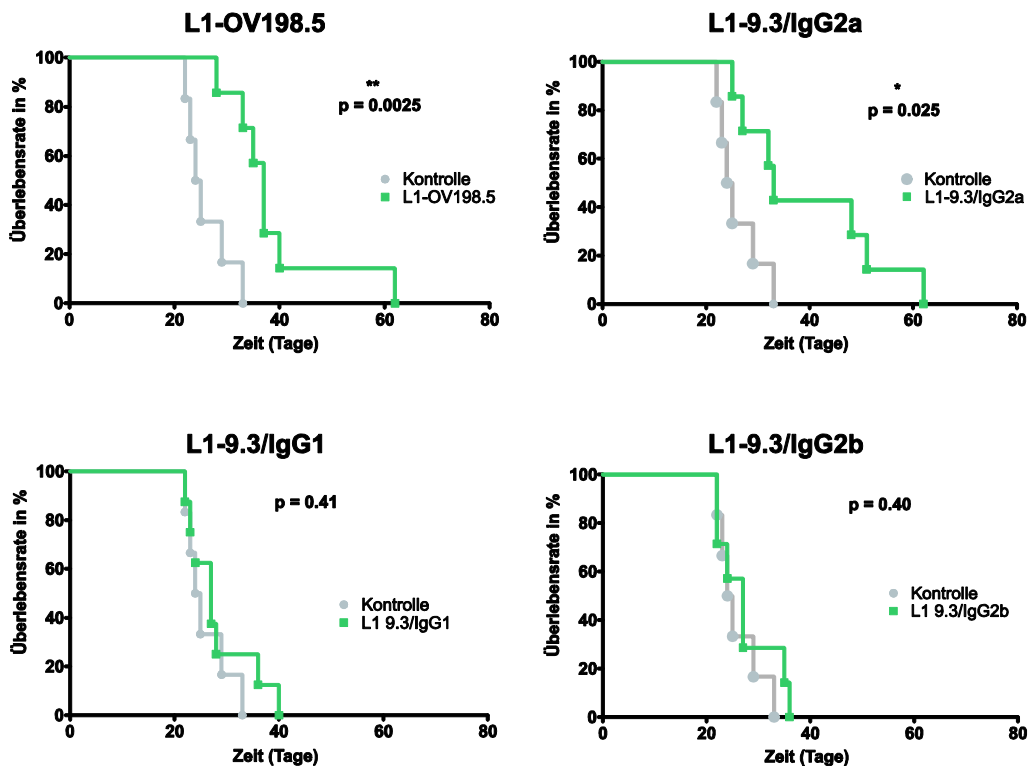


Abbildung 4.32: Überlebensrate nach Therapie mit L1-9.3 Isotypvarianten. Dargestellt sind die Kaplan-Meier Plots. Eine Behandlung erfolgte mit IgG2a Antikörpern (L1-9.3 sowie L1-OV198.5) sowie mit den IgG1 und IgG2b Varianten von L1-9.3. Zur Kontrollbehandlung wurde PBS verwendet. Für den Versuch wurden je sieben CD1 Nacktmäuse pro Gruppe verwendet.

Die Ermittlung der jeweiligen mittleren Überlebensrate nach mAk-Behandlung ergab: L1-OV198.5 = 37,0 Tage; L1-9.3/IgG2a = 33,0 Tage; L1-9.3/IgG1 = 27,0 Tage, L1-9.3/IgG2b = 27,0 Tage; L1-, Kontrolle = 24,5 Tage. (In Zusammenarbeit mit Prof. Mina Fogel, Kaplan Medical Center, Rehovot, Israel)

4.4.2 L1-IgG2a-Antikörper reduzieren das Tumorwachstum in vivo

Die Überlebensexperimente machen deutlich, dass bei der Therapie der Isotyp des Antikörpers eine entscheidende Rolle spielt. Die verschiedenen murinen Immunglobuline (IgG1, IgG2a, IgG2b und IgG3) binden mit variierender Affinität und Spezifität an die verschiedenen Fc γ -Rezeptoren (Nimmerjahn und Ravetch, 2005). Insbesondere IgG2a besitzt hierbei eine besondere Bedeutung, denn IgG2a und IgG2b zeigen eine höhere inflammatorische Aktivität (Nimmerjahn und Ravetch, 2006). IgG2a besitzt im Vergleich zu IgG1 eine sehr hohe Affinität zu aktivierenden Fc γ -Rezeptoren (Fc γ RI und Fc γ RIV), wohingegen IgG1 stärker an den inhibierenden Fc γ IIB bindet (Nimmerjahn und Ravetch, 2006). Beide Isotypvarianten zeigen eine schwache Affinität zu Fc γ RIII.

Um die indirekten Effekte der Antikörpertherapie zu klären, wurde zunächst der Einfluss der Antikörpertherapie im Vergleich der IgG1 zur IgG2a Variante auf das Tumorwachstum

untersucht. CD1 Nacktmäuse wurden mit SKOV3ip Zellen intraperitoneal injiziert. Nach drei Tagen der Ansiedlung im Bauchraum wurde die Therapie mit den verschiedenen Antikörpern begonnen. Zur Behandlung wurden L1-9.3/IgG1 bzw. L1-9.3/IgG2a jeweils 200 µg in 200 µl PBS oder 200 µl PBS als Negativkontrolle injiziert. Die Therapie erfolgte dreimal wöchentlich intraperitoneal mit jeweils 9 Mäusen pro Gruppe.

Zur Detektion des Tumorwachstums im Verlauf der Therapie wurden Luciferase exprimierende SKOV3ip Zellen verwendet. Luciferase ist ein Enzym, in dessen Anwesenheit Luciferin mit Sauerstoff oxidiert und so zu einem energiereichen, instabilen Dioxetan reagiert. Beim Zerfall dieser Substanz kommt es zur Biolumineszenz. Zur fortlaufenden Kontrolle des Tumorwachstums erfolgte die Messung der Biolumineszenz einmal pro Woche. Um eine einheitliche Tumordinokulation zu gewährleisten, wurde die erste Messung vor Therapiebeginn durchgeführt. Abbildung 4.33 zeigt die Aufnahmen nach 19 Tagen Tumorwachstums. Durch die Farbkodierung werden Bereiche hoher Aktivität in rot und schwächerer Aktivität in blau dargestellt.

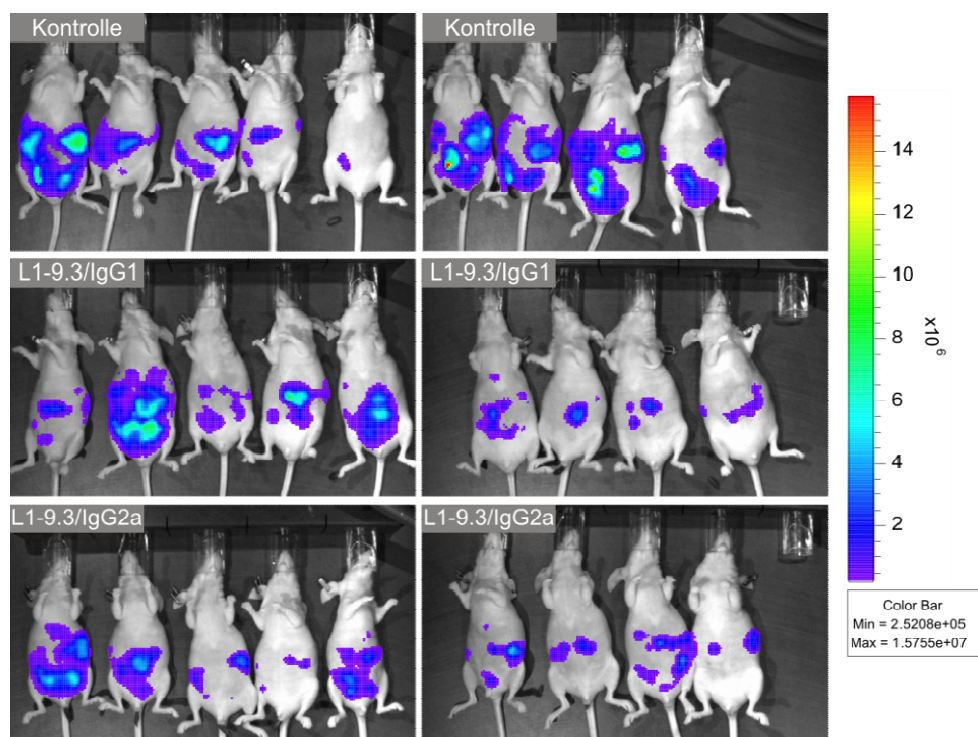


Abbildung 4.33: Tumorgößenanalyse während der Antikörpertherapie. Dargestellt sind die Biolumineszenz-Aufnahmen am Tag 19 nach Tumordinokulation. Die Mäuse wurden anästhesiert und Luciferin i.p. injiziert. Nach 5 min erfolgte die Messung der Biolumineszenz. Die Belichtungszeit betrug 30 s. Abgebildet sind je neun Mäuse der Kontrollgruppe, der L1-9.3/IgG1 und L1-9.3/IgG2a Gruppe.

Die Anzahl der Photonen, die von den Tumorzellen emittiert werden, konnte durch ein entsprechendes Computerprogramm ermittelt werden. Die Abbildung 4.34 zeigt eine Zusammenfassung der Lumineszenz-Messergebnisse nach 19 Tagen Tumorwachstum.

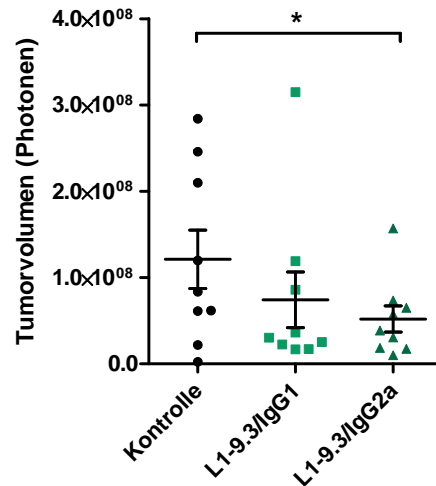


Abbildung 4.34: Auswertung der Tumorumfängen über die Biolumineszenzmessung am Tag 19. Dargestellt sind die Photonenzahlen der einzelnen Mäuse nach Luciferininjektion. Die Bestimmung des Mittelwerts \pm SEM ergab: Kontrolle = $12,1 \times 10^7 \pm 3,383 \times 10^7$ Photonen; L1-9.3/IgG1 = $7,426 \times 10^7 \pm 3,23 \times 10^7$ Photonen; L1-9.3/IgG2a = $5,2 \times 10^7 \pm 1,51 \times 10^7$ Photonen; N = 9. Signifikanzniveau : * $p < 0,05$

In Abbildung 4.35 sind die Tumormassen der einzelnen Gruppen nach Beendigung des Experiments am Tag 27 dargestellt. Die Therapie zeigt eine deutliche Tumormassensenkung für beide verwendeten Antikörper. Dennoch konnte nur die Therapie mit L1-9.3/IgG2a eine signifikante Reduktion der Tumormasse um ca. 40% ($p = 0,04$) zeigen.

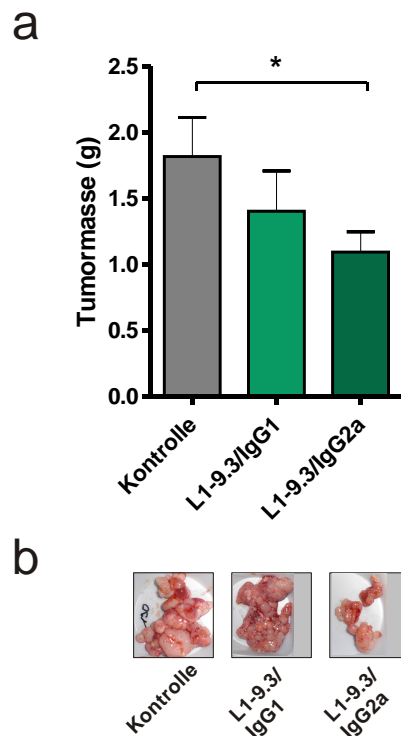


Abbildung 4.35: Tumormasse nach Therapieende am Tag 27. a) Nach Beendigung des Experiments wurden die Tumore entnommen und die Tumormasse gravimetrisch bestimmt. b) Repräsentative Tumormasse für die jeweilige Gruppe. Die Bestimmung des Mittelwerts \pm SEM ergab: Kontrolle = $1,817 \pm 0,2974$ g; L1-9.3/IgG1 = $1,403 \pm 0,3061$ g; L1-9.3/IgG2a = $1,094 \pm 0,1535$ g; N = 9.

Neben der Tumorreduktion konnte auch eine Verringerung der Aszitesbildung beobachtet werden (Abb. 4.36). Die Therapie mit beiden Antikörpervarianten resultiert in einem Rückgang der Aszitesbildung um mehr als 70%.

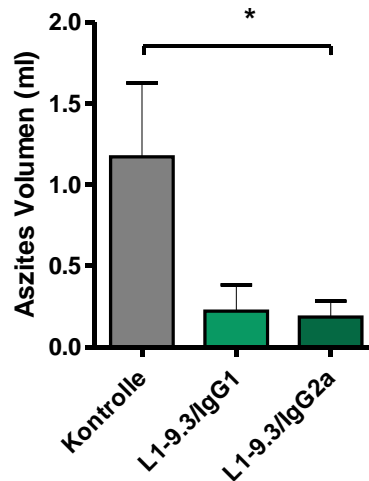


Abbildung 4.36: Aszitesmenge nach Antikörpertherapie am Tag 27. Nach Abschluss des Experiments wurde der Aszites aus dem Bauchraum entnommen und das Volumen bestimmt. Es zeigte sich eine deutliche Reduktion der Aszitesbildung nach Behandlung mit beiden Isotypvarianten von L1-9.3. Mittelwert \pm SEM: Kontrolle = $1,172 \pm 0,4553$ ml; L1-9.3/IgG1 = $0,2222 \pm 0,1614$ ml; L1-9.3/IgG2a = $0,1850 \pm 0,09890$ ml; N = 9. Signifikanzniveau : * $p < 0,05$.

Um ein homogeneres Tumorstadium zu erhalten, wurden die folgenden Experimente in BALB/c nu/nu durchgeführt. Athymische CD1 Mäuse werden durch Auszucht vermehrt, wobei die Zuchtpartner so ausgewählt werden, dass sie möglichst kleine Verwandtschaftsgrade besitzen. Die genetische Varianz und der Grad der Heterozygotie bleiben weitgehend konstant, da es zu keinem Verlust von Allelen führt. Dieser Mausstamm ist sehr robust und stabil in der Herstellung. Durch die Auszuchtmethodik kommt es aber zu einer größeren genetischen Varianz, was nach Tumordinokulation auch zu einem Einfluss auf das Tumorstadium der einzelnen Tiere führen kann. Bei einigen Mäusen kann es zu einer teilweisen oder vollständigen Spontanremission des Tumors kommen. BALB/c nu/nu hingegen gehören einem Inzuchtstamm an. Das Genom dieser Tiere ist zu über 98% homozygot.

Im folgenden Experiment wurden jeweils vier Tiere pro Gruppe mit Luciferase exprimierenden SKOV3ip Zellen i.p. inokuliert. Nach zwei Tagen erfolgte die Therapie mit der L1-9.3/IgG2a Variante bzw. der Isotyp-Kontrolle. Es wurden dreimal wöchentlich jeweils 200 μ g Antikörper pro Maus injiziert. Während der Therapie wurde die Luciferase Aktivität gemessen, wodurch das Tumorstadium bestimmt werden konnte. In Abbildung 4.37 ist das Tumorstadium der Mäuse nach 26 Tagen dargestellt. In die Luciferasemessung ist eine deutliche Tumorstadiumreduktion der L1-9.3/IgG2a therapierten Gruppe zu erkennen. Die Auswertung in Abbildung 4.38 ergab

eine signifikante Reduktion ($p=0,008$) der Luciferaseaktivität in den therapierten Mäusen gegenüber der Isotyp-Kontrolle.

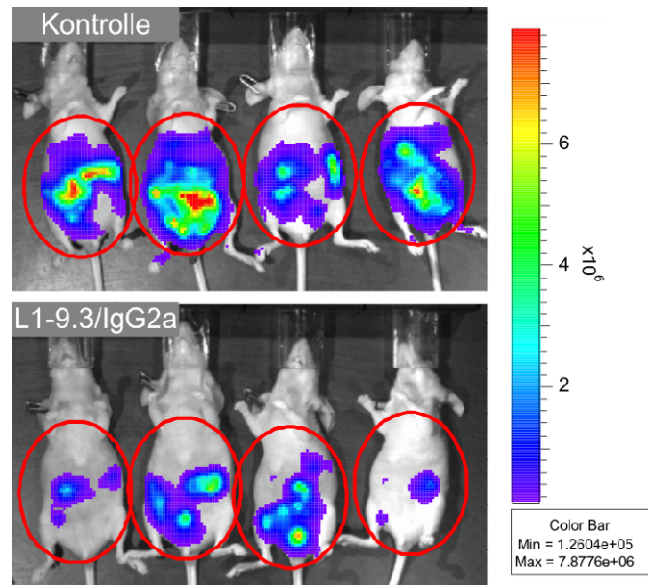


Abbildung 4.37: Tumorstärken nach 26 Tagen in BALB/c nu/nu Mäusen. Behandelt wurde entweder mit L1-9.3/IgG2a oder einer IgG2a Isotypkontrolle. Gemessen wurde die Biolumineszenz mit einer Belichtungszeit von 1 min.

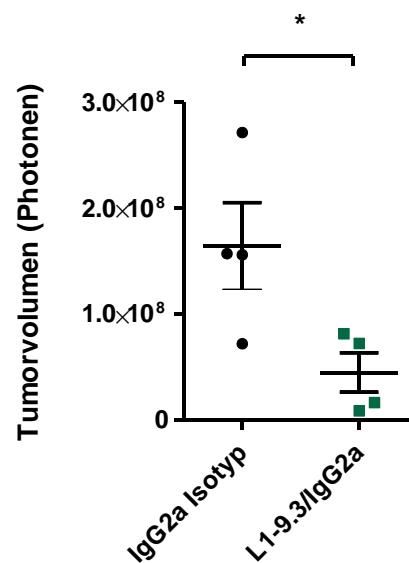


Abbildung 4.38: Auswertung der Tumorstärken über die Biolumineszenzmessung am Tag 26. Dargestellt sind die Photonenzahlen der einzelnen Mäuse nach Luciferininjektion. Die Bestimmung des Mittelwerts \pm SEM ergab: Kontrolle = $16,41 \times 10^7 \pm 4,1 \times 10^7$ Photonen; L1-9.3/IgG2a = $4,44 \times 10^7 \pm 1,8 \times 10^7$ Photonen, N = 4. Signifikanzniveau: * $p < 0,05$.

Nach 26 Tagen wurden die Mäuse getötet. Nach Tumorentnahme ergab sich ein ähnliches Bild wie bei der Luciferase-Messung. In Vergleich zu CD1 Mäusen konnte man in den BALB/c nu/nu Mäusen ein relativ homogenes Tumorstärke beobachten. Die Abbildung 4.39 zeigt die

Ergebnisse der Tumormassenbestimmung. Die Therapie mit L1-9.3/IgG2a resultierte in einer signifikanter Reduktion des Tumors um 75% ($p=0,028$).

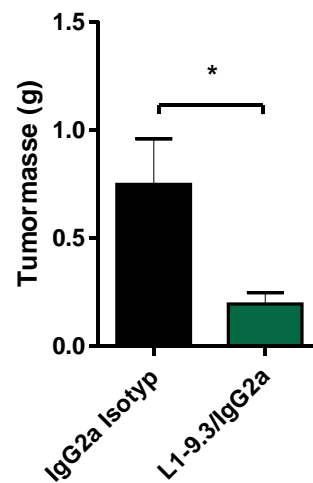


Abbildung 4.39: Tumormasse nach 26 Tagen in BALB/c nu/nu. Nach Therapieende wurden die Tumore entnommen und gravimetrisch bestimmt. Die Bestimmung des Mittelwerts \pm SEM ergab: Kontrolle = $0,7475 \pm 0,2118$ g; L1-9.3/IgG2a = $0,2450 \pm 0,0250$ g, N = 4. Signifikanzniveau: * $p < 0,05$

Auch zeigte sich eine signifikante Reduktion ($p=0,04$) des Aszitesvolumens (Abb. 4.40). Das Aszitesvolumen in BALB/c nu/nu Mäuse ist generell geringer als in CD1 nu/nu Tieren.

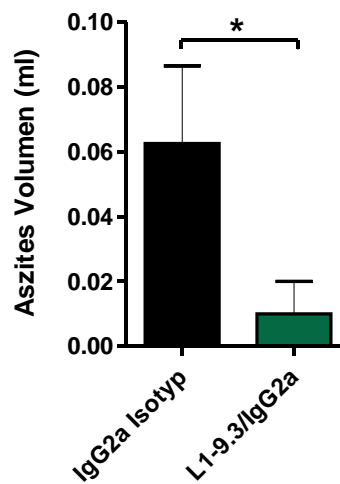


Abbildung 4.40: Aszitesvolumen nach Therapieende am Tag 26. Nach Beendigung des Experiments wurde vorhandener Aszites entnommen und die Menge bestimmt. Die Bestimmung des Mittelwerts \pm SEM ergab: Kontrolle = $0,065 \pm 0,02394$ m; L1-9.3/IgG2a = $0,0100 \pm 0,0100$ ml, N = 4. Signifikanzniveau * $p < 0,05$.

Auffallend in diesem Mausmodell war eine signifikante Reduktion des Körpergewichtes ($p=0,015$) um 15% durch Kachexie der Mäuse in der Kontrollgruppe. Die Therapiegruppe konnte hingegen ihr Ausgangskörpergewicht beibehalten (Abb. 4.41).

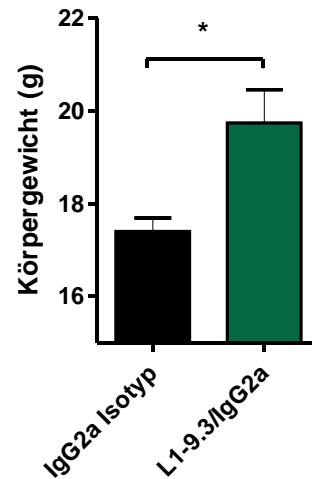


Abbildung 4.41: Körpergewichtsschwankungen durch Kachexie. Nach Beendung des Experiments wurde das Gewicht der Mäuse gravimetrisch bestimmt. Die Bestimmung des Mittelwerts \pm SEM ergab: Kontrolle=17,40 \pm 0,2944 g; L1-9.3/IgG2a=19,74 \pm 0,7194 g, N=4. Signifikanzniveau: * $p < 0,05$.

4.4.3 Analyse der Makrophageninfiltration nach L1-Antikörpertherapie

Wie zuvor gezeigt, hat der Isotyp des L1 mAk einen großen Einfluss auf den Therapieerfolg. L1-9.3/IgG2a zeigt im Gegensatz zu IgG1 oder IgG2b eine deutliche Verbesserung der Überlebensrate sowie eine drastische Tumor- und Aszitesreduktion. Um den genaueren Wirkmechanismus des L1 mAk zu untersuchen, wurden die Immunzellen im Tumorbereich analysiert. Hierzu wurde ein weiteres in vivo Experiment durchgeführt. Nach Inokulation von SKOV3ip Zellen wurde mit L1-9.3/IgG2a, L1-OV198.5 und einer IgG2a Isotypkontrolle therapiert, wobei jede Gruppe aus acht Mäusen bestand. Nach 33 Tagen der Therapie konnten signifikante Effekte im verringerten Tumorumfang in L1-OV198.5 und L1-9.3/IgG2a therapierten Mäusen im Vergleich zur Kontrolle detektiert werden ($p_{OV198}=0,022$; $p_{L1-9.3/IgG2a}=0,005$) (Abb. 4.42). Auch die Bildung von Aszites wurde durch beide mAk stark gehemmt.

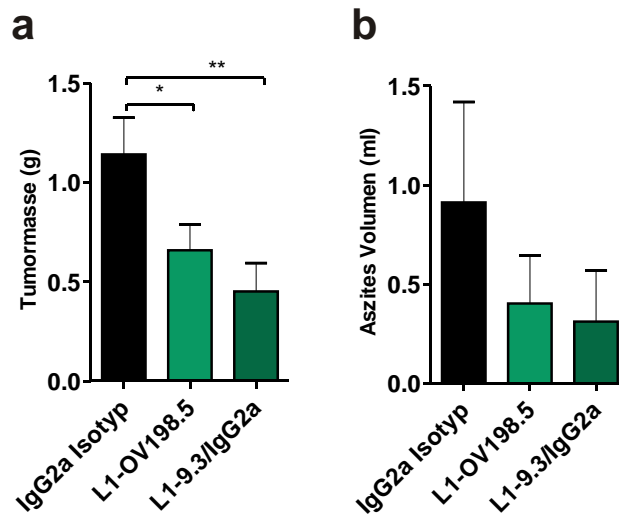


Abbildung 4.42: a) Tumorgewicht und b) Aszitesvolumen 33 Tage nach Tumorinokulation. Die Therapie erfolgte mit L1-9.3/IgG2a, L1-OV198.5 oder einer IgG2a Isotypkontrolle. Nach Beendigung des Experiments wurden die Tumore und das Aszites entnommen und deren Menge bestimmt. a) Tumormassen: Die Bestimmung des Mittelwerts \pm SEM ergab: Kontrolle = 1,141 \pm 0,1856 g; L1-OV198.5 = 0,6590 \pm 0,1294 g, L1-9.3/IgG2a = 0,4513 \pm 0,1431 g; N = 8. b) Statistik der Aszitesvolumen: Mittelwert \pm SEM: Kontrolle = 0,9125 \pm 0,5069 ml; L1-OV198.5 = 0,4040 \pm 0,2426 ml, L1-9.3/IgG2a = 0,3125 \pm 0,2580 ml; N = 8. Signifikanzniveau: * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$.

Zur Analyse von infiltrierenden inflammatorischen Zellen wurden einige frisch isolierte Tumore der Kontrollgruppe und der L1-9.3/IgG2a Gruppe in Paraffin eingebettet und für histologische Untersuchungen verwendet.

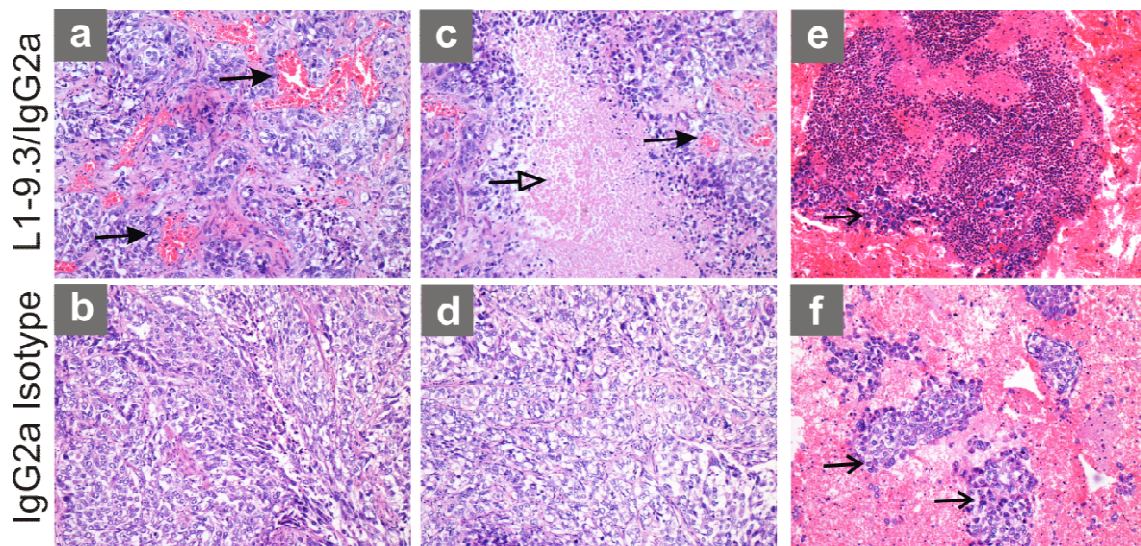


Abbildung 4.43: Histologische Untersuchung von Tumoren und Aszites nach der Antikörpertherapie. a) und c) zeigen repräsentative Tumorproben aus der L1-9.3/IgG2a behandelten Gruppe. Man findet vermehrt vaskularisierende Bereiche (v) und nekrotisierende Bereiche (w) im Vergleich zur Kontrolle (b und d). Im Aszites der therapierten Mäuse (e) finden sich viele infiltrierte Immunzellen und wenig Tumorzellen (→). f) Die Aufnahme zeigt repräsentativ die Asziten von Kontrollmäusen mit vielen Tumorzellen. Originalvergrößerung 100x (In Zusammenarbeit mit Prof. Mina Fogel, Kaplan Medical Center, Rehovot, Israel)

Nach Anfertigung von Gewebsschnitten wurden diese mit Hämatoxylin und Eosin angefärbt (Abb. 4.43) und histologisch untersucht. Zusätzlich wurden Zellsedimente vom Aszites genommen, eingebettet und gefärbt. In den Tumoren der L1-9.3/IgG2a Gruppe wie auch im Aszites sind verstärkt infiltrierende Immunzellen sowie nekrotische Bereiche (—w) erkennbar. Außerdem tritt eine verstärkte Vaskularisierung () im Tumorbereich auf (a bis d). In der Negativkontrolle ist die Anzahl der Tumorzellcluster (→) im Aszites erhöht (e und f).

Um zu untersuchen, welche Immunzellen insbesondere bei den therapierten Mäusen ins Tumorgewebe infiltrieren, wurden aus den frisch isolierten Tumoren von L1-9.3/IgG2a, L1-OV198.5 und der Isotypkontrolle Einzelsuspensionen hergestellt. Anschließend wurden die Zellen mit anti-F4/80 und anti-Gr1 gefärbt und durchflusszytometrisch analysiert. F4/80 ist ein Oberflächenantigen, welches insbesondere auf Monozyten/Makrophagen gefunden wird. Gr1 ist auf der Oberfläche von Granulozyten exprimiert.

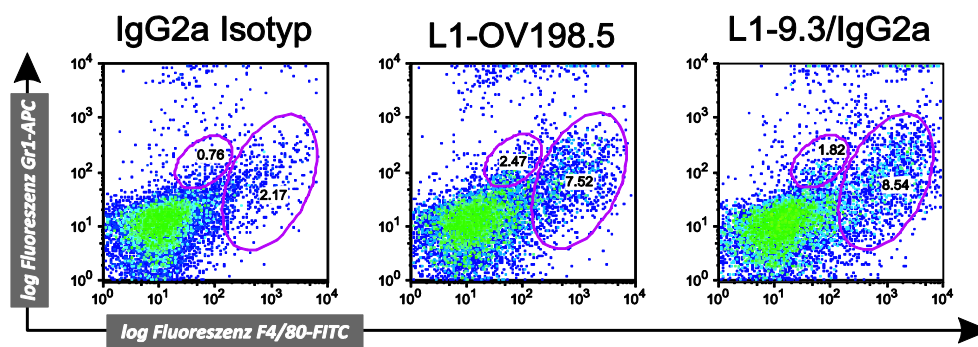


Abbildung 4.44: Durchflusszytometrische Analyse von Tumorzellsuspensionen auf Effektorzellinfiltrationen. Dargestellt sind repräsentative Ergebnisse im Dotplot. Analysiert wurden je 3 Maustumore pro Gruppe. Im rechten Bereich findet man die F4/80 positiven monozytären Zellen (große Ellipse). Es finden sich signifikant vermehrt Monozyten in Antikörper-therapierten Tumoren. Kein Unterschied konnte für die Gr1 positiven Granulozyten gefunden werden (kleine Ellipse).

In Abbildung 4.44 sind repräsentative Analysen der Tumore dargestellt. Die Anzahl der Gr1 positiven Zellen bleibt in Tumoren beider Behandlungsgruppen weitgehend gleich. In der Analyse der F4/80 monozytären Zellen ergibt sich eine deutliche Erhöhung der Zellzahl im Tumor durch L1-Antikörpertherapie mit L1-9.3/IgG2a wie auch mit L1-OV198.5 im Vergleich zur Kontrolle. Zum Vergleich wurden die Ergebnisse für F4/80 monozytäre Zellen in Abbildung 4.45 dargestellt. Die Therapie resultiert in einer signifikanten Erhöhung von monozytären Zellen in der Gruppe von Tumoren, welche mit L1 IgG2a-Antikörper behandelt wurden. Eine Steigerung von 2% auf ca. 6% monozytäre Zellanteile nach L1/IgG2a-Antikörpertherapie konnte detektiert werden.

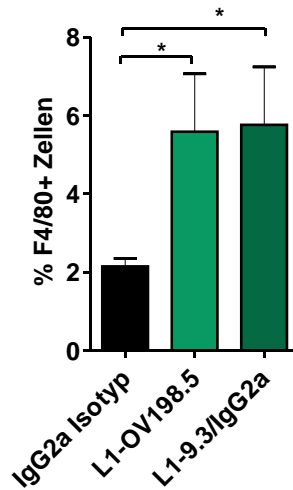


Abbildung 4.45: Anteil der F4/80 positive monozytäre Zellen in Tumorproben. Ausgewertet wurden die Ergebnisse der durchflusszytometrischen Bestimmung der Tumorproben. Die Bestimmung des Mittelwerts \pm SEM ergab: Kontrolle = $2,150 \pm 0,2023\%$; L1-OV198. = $5,587 \pm 1,480\%$, L1-9.3/IgG2a = $5,763 \pm 1,475\%$; N=3. F4/80 Makrophagenmarker; Signifikanzniveau: * $p < 0,05$.

4.4.4 Aufhebung der Therapieeffekte mit L1-IgG2a Antikörpern durch Makrophagendepletion

Im vorherigen Experiment konnte gezeigt werden, dass F4/80 positive monozytäre Zellen durch die Antikörpertherapie vermehrt ins Tumorgewebe infiltrieren. Welche Bedeutung haben die rekrutierten Immunzellen bei der Antikörpertherapie?

Monozyten/Makrophagen können direkt wie auch indirekt über Rezeptoren zytotoxische Effekte auslösen. Neben Natürlichen Killer (NK) Zellen sind sie auch an der antikörperabhängigen zellulären Toxizität beteiligt. (Oflazoglu et al., 2009) konnte kürzlich zeigen, dass ausschließlich Makrophagen, nicht aber Neutophile oder NK-Zellen, für den Erfolg einer CD40 Antikörpertherapie im Maus Xenograft-Modell verantwortlich waren.

Das folgende Experiment sollte klären, ob es durch eine Makrophagendepletion während der Therapie zur Aufhebung des Therapieeffektes kommt. Zur Makrophagendepletion wurde Clodronat verwendet. Clodronat (Dichlormethylen-diphosphonat, Cl2MDP) gehört zu der Stoffgruppe der Bisphosphonate. Es wurde ursprünglich für diagnostische und therapeutische Zwecke bei verschiedenen Knochen- und Kalziumstoffwechselerkrankungen entwickelt, mittlerweile jedoch auch in der Hämatologie und Onkologie eingesetzt (Saunders et al., 2004; Zito et al., 2001). Freies Clodronat ist hydrophil und negativ geladen, wodurch es kaum zellmembrangängig ist und rasch eliminiert werden kann. Zur Wirksamkeit in der Depletion von Monozyten/Makrophagen muss es daher zur intrazellulären Anreicherung liposomal verkapselt werden (Polfliet et al., 2001; van Rooijen et al., 1996). In Liposomen verkapselt wird

Clodronat von Makrophagen aufgenommen. Nach Internalisierung der Liposomen wird Clodronat aus Phagolysosomen freigesetzt und löst den apoptotischen Zelltod aus (Van Rooijen und Sanders, 1996; van Rooijen et al., 1996). Andere phagozytotisch wirkende Zellen, wie z.B. Neutrophile, Granulozyten und Endothelzellen, oder nicht-phagozytierende Zellen, wie z.B. T- und B-Lymphozyten, bleiben durch Clodronat allerdings unbeeinflusst (Claassen et al., 1990; Qian et al., 1994; Schmidt-Weber et al., 1996). Die genauen Wirkmechanismen sind derzeit noch unklar. In vitro Studien zeigen jedoch eine Hemmung der ADP/ATP-Translokase an der inneren mitochondrialen Membran, wodurch diese eine erhöhte Permeabilität aufweist. Dies hat eine erhöhte Freisetzung von pro-apoptotischem Cytochrom c und letztlich die Induktion der Caspase-Kaskade zur Folge (Lehenkari et al., 2002).

Zur Untersuchung funktioneller Aspekte in vivo kann die selektive Depletion von Makrophagen durch liposomal verkapseltes Clodronat angewandt werden (van Rooijen, 1992). Clodronat-Liposomen werden von Makrophagen in Milz, Leber, Lunge und Lymphknoten (Delemarre et al., 1990; Van Rooijen, 1989) sowie durch Blutmonozyten phagozytiert (Thepen et al., 1989).

Nach der intraperitonealen Injektion von SKOV3ip Zellen wurden den BALB/c nu/nu Mäusen zwei Tage später Clodronat-Liposomen (Cl₂MDP-Lip) bzw. Kontroll-Liposomen (PBS-Lip) gespritzt. Die Wirkung des Clodronats in den Mäusen hielt zirka eine Woche an, so dass die Injektion der Liposomen alle sechs Tage wiederholt wurde. Die Therapie startete drei Tage nach Tumorzellinokulation. Die Behandlung erfolgte mit L1-9.3/IgG2a und einer nicht bindenden Isotyp-Kontrolle. Therapiert wurde dreimal wöchentlich mit 10 mg Antikörper pro kg Körpergewicht für weitere 18 Tage.

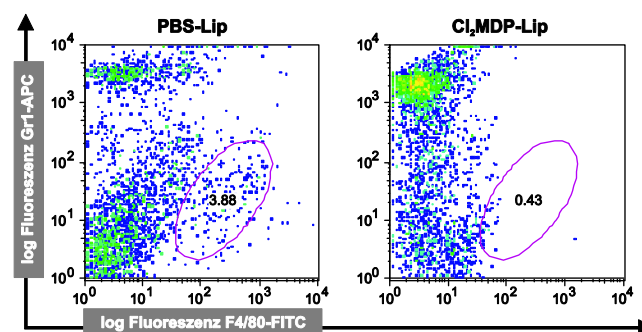


Abbildung 4.46: Blutproben nach Clodronatbehandlung. Dargestellt sind repräsentative durchflusszytometrische Analysen von Blutproben aus einer Kontrollmaus und einer Clodronat behandelten Maus. Die Messung erfolgte 2 Tage nach Clodronatgabe. Cl₂MDP-Lip: Clodronat-Liposomen, PBS-Lip: Kontroll-Liposomen, Gr1: Granulozytenmarker, F4/80: Makrophagenmarker.

Während der Therapie wurden Blutproben entnommen, welche auf Makrophagen überprüft wurden. Die Abbildung 4.46 zeigt repräsentative Proben dieser Untersuchung. Nach

Herstellung einer Einzelzellsuspension von Leukozyten wurden diese durchflusszytometrisch untersucht. Im gesunden Organismus sind ca. 2-8% der Leukozyten Monozyten. Nach Clodronat-Liposomen Injektion konnte eine starke Reduktion der Anzahl an Monozyten im Blut nachgewiesen werden. Hier betrug der Anteil der Monozyten weniger als 0,5%. Nach 22 Tagen wurden die Mäuse getötet und die Tumore analysiert. Die Analyse der Milz und der Tumore zeigte auch hier eine deutliche Reduktion von Makrophagen (Abb. 4.47).

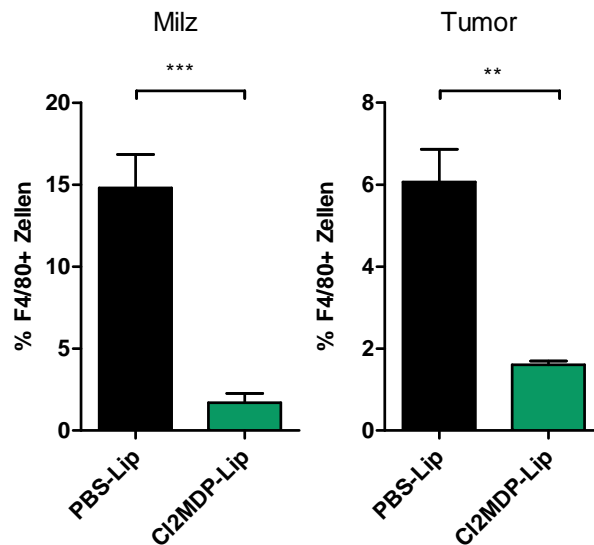


Abbildung 4.47: Analyse von Milz und Tumor auf Makrophagendepletion nach Clodronatgabe am Tag 22. Nach Therapie wurden die Organe entnommen. Eine hergestellte Einzelzellsuspension wurde in der Durchflusszytometrie auf F4/80 monozytäre Zellen untersucht. Dargestellt ist der Mittelwert aus je drei analysierten Proben der Clodronat behandelten Mäusen bzw. PBS therapierten Mäusen. Die Bestimmung des Mittelwerts \pm SEM ergab: Milz: Cl2MDP-Lip = $1,705 \pm 0,5597$; PBS-Lip = $14,80 \pm 2,050$ N=3; Tumor: Cl2MDP-Lip = $1,607 \pm 0,08819$; PBS-Lip = $6,068 \pm 0,7935$ N=3. Signifikanzniveau: ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$. Cl2MDP-Lip Clodronat-Liposomen, PBS-Lip Kontroll-Liposomen, F4/80 Makrophagenmarker.

Wie in Abbildung 4.48 dargestellt, resultierte die Therapie bei den Mäusen mit Kontroll-Liposomen-Behandlung, welche keinen Einfluss auf die Immunzellen hatte, in einer Reduktion des Tumors durch L1-9.3/IgG2a Behandlung. Dies bestätigte noch einmal die Ergebnisse vorangegangener Experimente. In den Makrophagen-depletierten Mäusen konnte die tumorreduzierende Wirkung des L1-9.3/IgG2a Antikörpers jedoch aufgehoben werden. Interessanterweise konnte man sogar eine Erhöhung der Tumormasse in den behandelten Mäusen feststellen. Es zeigte sich jedoch auch, dass eine Makrophagen-Depletion das Tumorwachstum in beiden Mausgruppen hemmt. Somit war der Tumor in den Clodronat-behandelten Mäusen generell kleiner. In früheren Publikationen wurde dieses Phänomen bereits beschrieben. So zeigte (Zeisberger et al., 2006), dass eine Eliminierung von tumorassoziierten Makrophagen (TAM) zur Reduktion des Tumorwachstums führt.

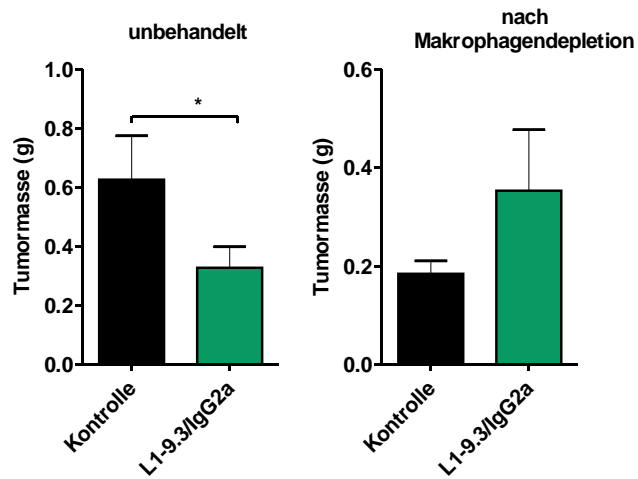


Abbildung 4.48: Tumorgewicht nach Antikörpertherapie und Makrophagendepletion. Dargestellt ist der Mittelwert der Tumormassen nach Antikörperbehandlung mit L1 9.3 IgG2a. a) Die Behandlung in PBS-Liposomen behandelten Mäusen. Die Bestimmung des Mittelwerts \pm SEM ergab: L1-9.3/IgG2a = $0,3275 \pm 0,07168$; Kontrolle = $0,6267 \pm 0,1484$; b) Tumormassen nach Makrophagendepletion durch Clodronatgabe. Mittelwert \pm SEM: L1-9.3/IgG2a = $0,3533 \pm 0,1241$; Kontrolle = $0,1843 \pm 0,02617$.

4.4.5 Analyse differentiell regulierter Gene nach L1-IgG2a Antikörpertherapie

Wie schon aus vorherigen Arbeiten unserer Arbeitsgruppe bekannt ist, kann die Antikörpertherapie mit L1 mAk zu alternativen Genexpressionen führen (Gast et al., 2008). Gast et al. (2008) analysierte dabei einzelne Gene auf RNA Ebene. Zur Analyse wurden in vitro antikörperbehandelte SKOV3ip Zellen verwendet. Eine Regulation konnte demnach für β 3-Inegrin, CRABP II, IER3 und STK39 gefunden werden. Zudem konnten für β 3-Inegrin und IER3 die Daten auch in vivo bestätigt werden.

Im den vorherigen Experimenten dieser Arbeit konnte insbesondere der Einfluss von Effektorzellen auf den Therapieerfolg nachgewiesen werden. Um daher die Wechselwirkungen der Antikörper mit dem Mikromilieu im Einfluss auf die Genregulation der Tumorzellen durch eine Antikörperbehandlung erfassen zu können, sollte ein Gesamtüberblick der involvierten Gene und deren funktionelle Rolle geschaffen werden. Dies kann durch eine Chip-basierte Genexpressionsanalyse erzielt werden. Hierfür wurden die Tumore der behandelten Mäuse aus dem vorherigen Experiment (Abbildung 4.38; L1-9.3 IgG2a und Negativkontrolle) isoliert und homogenisiert. Nach anschließender RNA Isolierung, wurden die Proben zur Analyse eingereicht (DKFZ Heidelberg, Core Facility Dr. B. Korn).

Es wurden pro Gruppe zwei Maustumore analysiert. Zur Auswertung der erhaltenen Datensätze wurde eine spezielle Software (Chipster) eingesetzt. Nach der Normalisierung der Daten wurde eine erste Selektion über die Standardabweichung vom Mittelwert aller genspezifischen Daten ermittelt. Im folgenden Venn-Diagramm sind die unterschiedlichen Selektionen bildlich dargestellt (Abb. 4.49). Nach einer Selektion über die einfache Standardabweichung ergaben sich 13662 differentiell regulierte Gene aus 48803 Transkripten. Erhöhte man die Stringenz auf die doppelte Standardabweichung, so erhielt man 2294 spezifische Gene. Mit der dreifachen Standardabweichung erfolgt eine Selektion auf insgesamt 147 Genen. Diese Gene zeigten mindestens eine 1,6-fache Regulierung im Vergleich zur Kontrolle.

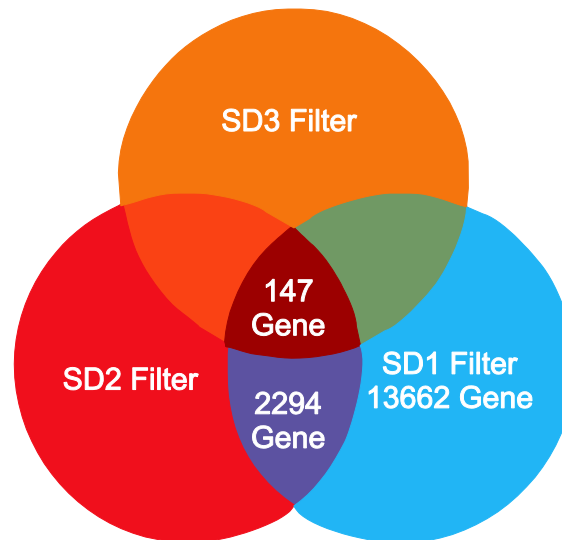


Abbildung 4.49: Venn-Diagramm nach Selektion der exprimierten Gene über die Standardabweichung. Die Anzahl der Gene mit einfacher Standardabweichung sind in blau dargestellt. Gene welche zu 95% (99,5%) vom Mittelwert abweichen sind rot (orange) dargestellt.

Nach genauerer Untersuchung befinden sich in dieser Auswahl 72 hoch und 75 herunterregulierte Gene. In Abbildung 4.50 sind die 147 differentiell regulierten Gene und die einzelnen Proben zugehörig zu ihrer Behandlungsgruppe abgebildet. Die farbliche Darstellung stellt dabei die jeweilige Expression des Genes in der Probe dar (Grün: schwach exprimierte Gene, rot: stark exprimierte Gene). Durch diesen Farbcode lassen sich leicht die Unterschiede in der Genexpression innerhalb der einzelnen Proben darstellen. So findet man Gene, die in der antikörpertherapierten Gruppe schwach exprimiert sind (grün dargestellt), und in der Kontrolle eher stärker exprimiert sind (schwarz oder rot; unterer Bereich der Abbildung). Ebenso findet man Gene, welche in der Kontrollgruppe schwach exprimiert sind (grün), aber in der behandelten Gruppe stark angeschaltet werden (rot).

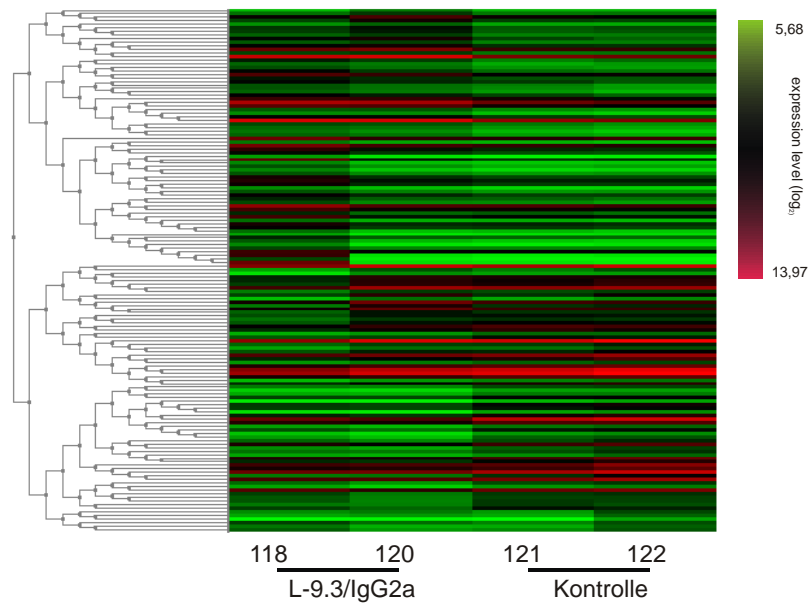


Abbildung 4.50: Hierarchische Gruppierung differentiell regulierter Gene. Abgebildet sind 147 geklusterte Gene in der Heatmap-Darstellung. Analysiert wurden je zwei Proben pro Gruppe. Die Zahlen geben dabei die Maus ID-Nummern an. Grün dargestellt sind schwach exprimierte Gene. Rot sind stark exprimierte Gene. Das Expressionsniveau ist in \log_2 angegeben. Die linken beiden Spalten stellen die beiden Proben der behandelten Tiere (L1-9.3/IgG2a) dar. Die rechten beiden Spalten gehören zur Kontrollgruppe. (Expressionslevel (\log_2) zwischen 5,68 bis 13,97)

Diese Gene besitzen innerhalb der Gruppe in beiden Proben den gleichen Phänotyp. Es gibt aber auch wenige Gene, welche innerhalb der Gruppe unterschiedlich reguliert werden, aber dennoch bei der Gesamtanalyse aufgrund der großen Differenz in der Expression gefiltert wurden. Auch dieses Phänomen ist durch die farbliche Markierung in der Heatmap dargestellt (mittlerer Bereich der Heatmap). 111 Gene können demnach zwischen den beiden Gruppen eindeutig differentiell reguliert werden. Für weiter 36 Gene konnte durch Abweichungen innerhalb einer Gruppe keine eindeutige Aussage zwischen den Gruppen getroffen werden.

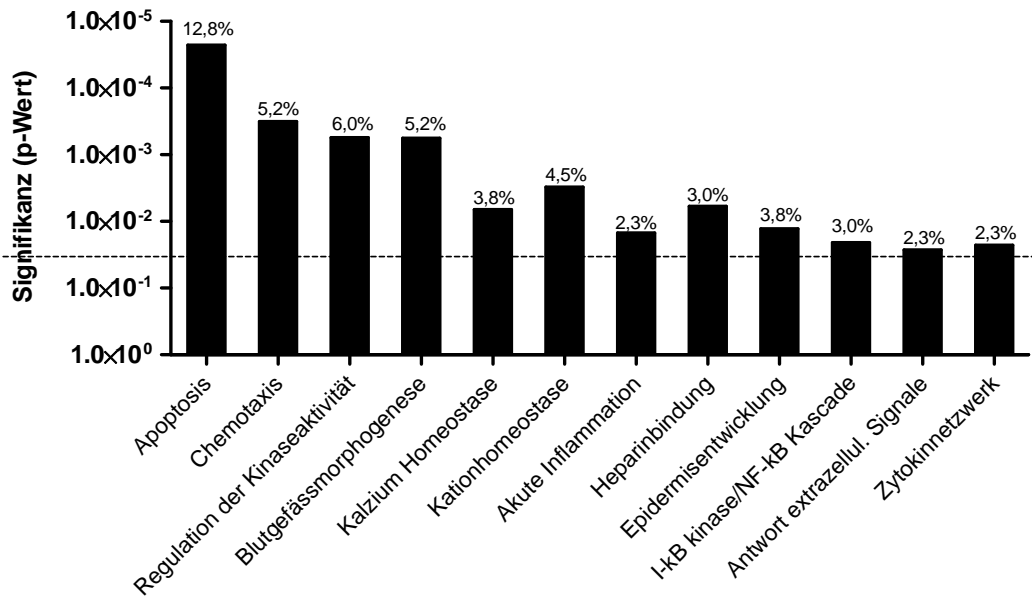


Abbildung 4.51: Signifikante funktionelle Gengruppen. 130 differenziell regulierte Gene wurden nach ihrer Funktionalität in Gruppen eingeteilt. Prozentzahlen über den Balken geben den Anteil der Gene in der funktionellen Gruppe an den gesamt analysierten Genen an. Die Signifikanz der funktionellen Gruppen ist als p-Wert dargestellt.

Mit Hilfe des DAVID Program (Database for annotation, visualisation and integrated discovery) (Huang da et al., 2009) konnte aus den 147 selektierten Genen funktionelle Cluster errechnet werden. Zur Analyse wurden 133 Gene herangezogen. 17 Gene konnten von der Software nicht identifiziert werden. Die selektierten Gene konnten zu 32 funktionellen Clustern zugeordnet werden. 12 Cluster zeigen hierbei eine hohe Signifikanz ($p < 0,05$). 17 von 133 Genen korrelieren funktionell mit der Apoptose ($p = 2,3 \times 10^{-5}$). Hierzu gehörten unter anderem IL-6, DDIT, TRAIL, ITGB2, APOE, BNIP3L, ANGPTL4, CXCR4 und CRYAB. Weitere 7 Gene konnten funktionell der Chemotaxis zugeordnet werden ($p = 3,2 \times 10^{-4}$) und weitere 7 der Blutgefäßmorphogenese ($p = 5,7 \times 10^{-4}$). Hierzu gehören TGM2, IL-8, ANGPTL4, CXCR4, APOLD1, HMOX1 und THBS1. Weitere signifikante Gencluster wurden für die folgenden funktionellen Einheiten gefunden: Protein-Kinase-Aktivität, Kalziumionen-Homöostase, Kation-Homöostase und Entzündungsreaktionen. In Abbildung 4.51 sind die signifikanten Cluster dargestellt. Der Anteil der Gene in der Gruppe zur Gesamtzahl der analysierten Gene ist in Prozent angegeben. Einige Gene können durch ihre funktionellen Eigenschaften zu mehreren Cluster-Gruppen zugeordnet werden. Die Signifikanz der funktionellen Gruppen wurde über den p-Wert ermittelt.

Wichtige Gene aus den funktionellen Gruppen der Apoptose, Chemotaxis und Angiogenese wurden in der qRT-PCR Analyse verifiziert. Diese Analyse wurden auf weitere Tumorproben

der Behandlungsgruppen ausgeweitet. In Abbildung 4.52 sind einige repräsentative Gene nach qRT-PCR Analyse dargestellt. Für einige Gene konnte eine Herunterregulierung nach Antikörpertherapie bestätigt werden. Diese Gene sind in der Apoptosefunktion involviert z.B. DDIT4 und APP. Die Überexpression von DNA-damage-inducible transcript 4 (DDIT4), auch REDD1 genannt, kann die Zellproliferation fördern (Chang et al., 2009). APP als Amyloid-Precursor-Protein fördert Androgen abhängiges Prostatakrebswachstum (Takayama et al., 2009). Trail, APOE und TNFalpha wurden ebenfalls in der Antikörper-behandelten Gruppe überexprimiert und sie sind als proapoptotische Gene beschrieben. Einige ausgewählte Gene in der Abbildung 4.52 sind nicht nur bei der Apoptose involviert, sondern auch bei der Angiogenese und der Chemotaxis funktionell. Nach Antikörpertherapie konnte CXCR4, ANGPTL4 und APOLD1 runterreguliert gefunden werden. Dieses bestätigte sich auch in der qRT-PCR Analyse. ANGPTL4 (Angiopietin-related protein 4) unterbricht endotheliale Zellkontakte, erhöht die Durchlässigkeit von Lungenkapillaren und fördert die transendotheliale Passage von Tumorzellen (Padua et al., 2008). CXCR4 ist ein Chemokinrezeptor und wurde als Funktionspartner der Metastasierung für Krebszellen beschrieben (Darash-Yahana et al., 2004). Die WISP2 Transkription wurde nach Antikörpertherapie gehemmt. WISP2 ist ein Mitglied der induzierbaren Wnt1 Signalkaskade (WISP) Unterfamilie. Hohe Expressionsmuster von WISP2 korrelieren mit einer schlechten Prognose in Brustkrebserkrankungen, und stimulieren somit aggressives Verhalten (Davies et al., 2007). Nach Antikörperbehandlung wird Integrin β 2 (ITGB2) runterreguliert. Es konnte gezeigt werden, dass Runterregulierung von ITGB2 im Kolonkarzinoma mit einer verbesserten Überlebensrate korreliert (Cavalieri et al., 2007).

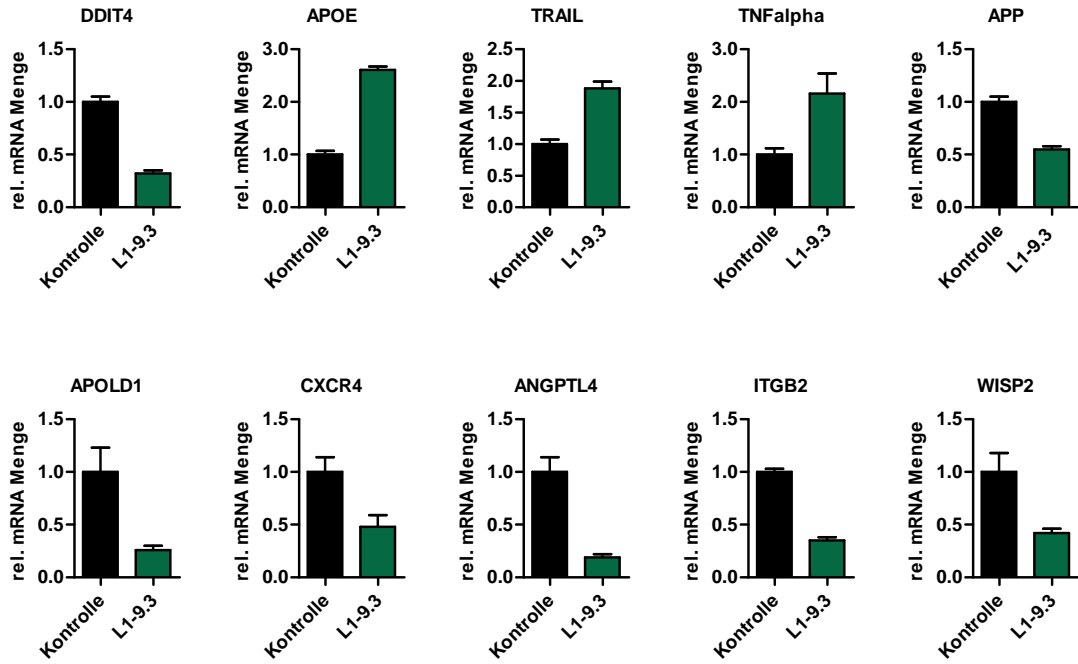


Abbildung 4.52: qRT-PCR Analyse der Regulierung selektierter Gene. Dargestellt sind repräsentative Analysen aus je vier unterschiedlichen Tumoren pro Gruppe. Die Gene gehören funktionellen Gruppen der Apoptose, Chemotaxis und Angiogenese an. Die Messwerte sind in Relation zur Kontrolle dargestellt, wobei diese als 1 gesetzt wurde. Zur Normalisierung der Werte auf die tatsächlich eingesetzte RNA Menge diente das Housekeeping Gen β -Aktin.

4.5 Charakterisierung und funktionelle Analyse humanisierte L1-Antikörper

Die Verwendung von murinen Antikörpern zur Krebstherapie ist durch die Induktion von Human-Anti-Maus-Antikörpern (HAMA) limitiert. Die normale Halbwertszeit von murinen Antikörpern in der menschlichen Blutzirkulation kann durch die Bildung von HAMA stark reduziert werden. Dies führt zu hohen Wirkungseinbußen der Therapie. Durch gentechnologische Methoden ist es möglich, Antikörper mit einer großen Homologie zum humanen IgG-Molekül herzustellen und somit eine Reduktion der Immunogenität der mAk zu erzielen. Es gibt chimäre Antikörper (konstanter Anteil human, variabler Anteil murin), humanisierte Antikörper (nur Aminosäuresequenzen der CDR murin) und vollständig humane Antikörper. Die Aminosäuresequenzen zwischen den CDR-Regionen tragen signifikant zur Antikörperaffinität bei. Es ist deshalb bei verschiedenen humanisierten Antikörpern nicht möglich, nur die CDR-Regionen zu erhalten, sondern man braucht häufig konservierte Sequenzen vom Maus-Antikörper auch in den Regionen zwischen den CDR-Anteilen des Antikörpers.

Zur Herstellung der humanisierten Antikörper wurde der mAk L1-9.3 ausgewählt.

4.5.1 Herstellung eines chimärisierten und eines humanisierten Antikörpers

Die Humanisierung des L1-9.3 erfolgte auf zwei unterschiedlichen Wegen. Ein chimersierter mAk wurde durch homologe Rekombination der Maushybridomzelle (Lüttgau, et al. 2010 in Bearbeitung) hergestellt. Hierbei wurde der murine konstante Bereich des Antikörpers durch einen humanen IgG1 konstanten Bereich ersetzt. Zusätzlich wurde auch ein vollhumanisierter mAk von L1-9.3. hergestellt. Die Produktion erfolgte nach Austausch des Fc-Teils und Sequenzen des CDR in humane Bestandteile durch Klonierungsstrategien. Diese beiden Antikörpervarianten wurden freundlicherweise von Dr. G. Moldenhauer bzw. von der Firma Medigene AG (München) zur Verfügung gestellt.

4.5.2 Charakterisierung der humanisierte L1-9.3 Varianten

Nach erfolgreicher Produktion und Aufreinigung erfolgte die Charakterisierung der humanisierten Antikörpervarianten. Zunächst wurden die Bindungsreaktivitäten der humanen Antikörper mit dem murinen mAk in der Durchflusszytometrie verglichen. Analysiert wurden hierbei CHO und CHO-L1 Zelllinien, sowie die L1 exprimierenden Ovarialkarzinom-Zelllinien OVMz und SKOV3ip. Die Abbildung 4.53 zeigt eine gleichbleibende Bindungsstärke der

humanen Antikörpern gegenüber der Mausvariante. Die Analyse der Bindungsaffinität mit Hilfe der Biacore-Analyse ergibt eine gleichbleibende Bindungsaffinität (Tabelle 4.3).

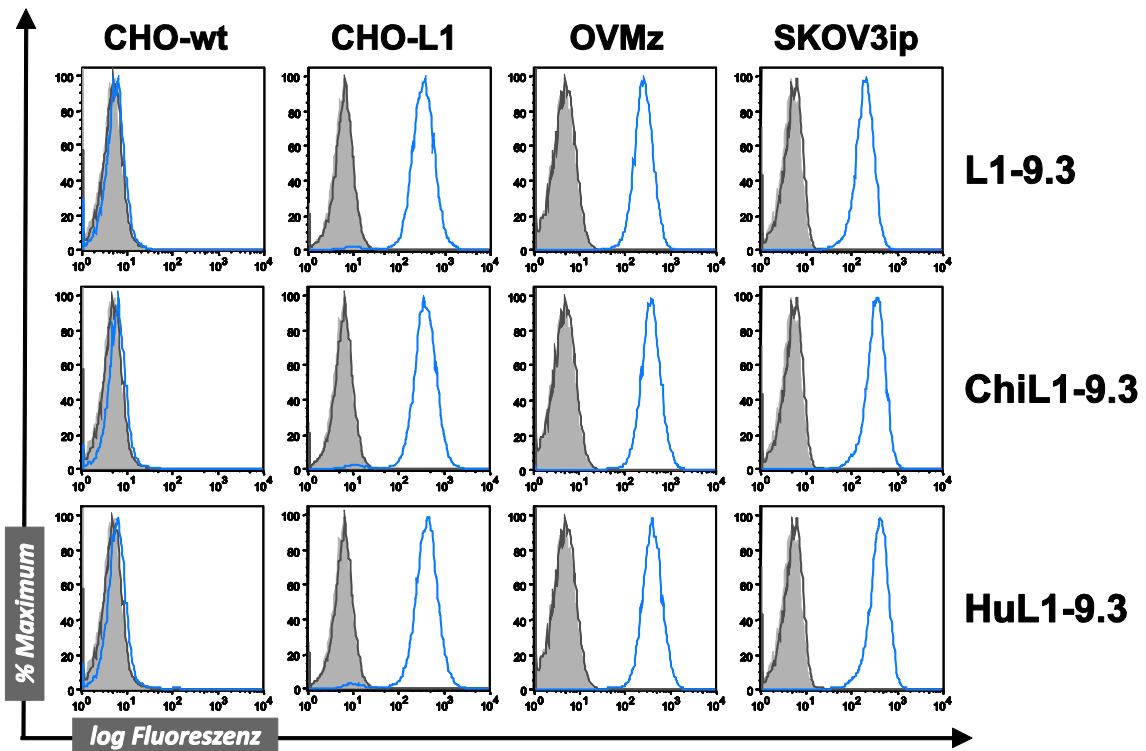


Abbildung 4.53: Bindungsreaktivität der verschiedenen L1-9.3 Varianten in der Durchflusszytometrie. Analysiert wurde die Bindungsspezifität von L1-9.3 mAk (ChiL1-9.3, HuL1-9.3 und muriner L1-9.3) an CHO-wt, CHO-L1 sowie den zwei Ovarialkarzinom-Zelllinien OVMz und SKOV3ip.

4.5.3 Untersuchung der Antikörpertherapie mit humanisierten L1-9.3 Varianten in vivo

Die Chimärisierung bzw. Humanisierung hat die charakteristischen Eigenschaften des L1-9.3 Antikörpers nicht verändert. Zur Analyse der Funktionalität der chimärisierten bzw. humanisierten mAk wurden in vivo Experimente durchgeführt. CD1 nu/nu Mäuse wurden mit SKOV3ip Tumorzellen inokuliert. Nach drei Tagen begann die Therapie. Hierzu wurden die Tiere in drei Gruppen zu je 10 Mäusen eingeteilt. Eine Antikörpertherapie erfolgt dreimal wöchentlich mit 10 mg/kg Körpergewicht. Analysiert wurde die mAk ChiL1-9.3, HuL1-9.3 und eine Kontrollgruppe, welche nur PBS erhielt. Während der Therapie konnte das Tumorwachstum über die Luciferase-Expression der SKOV3ip-Zellen verfolgt werden.

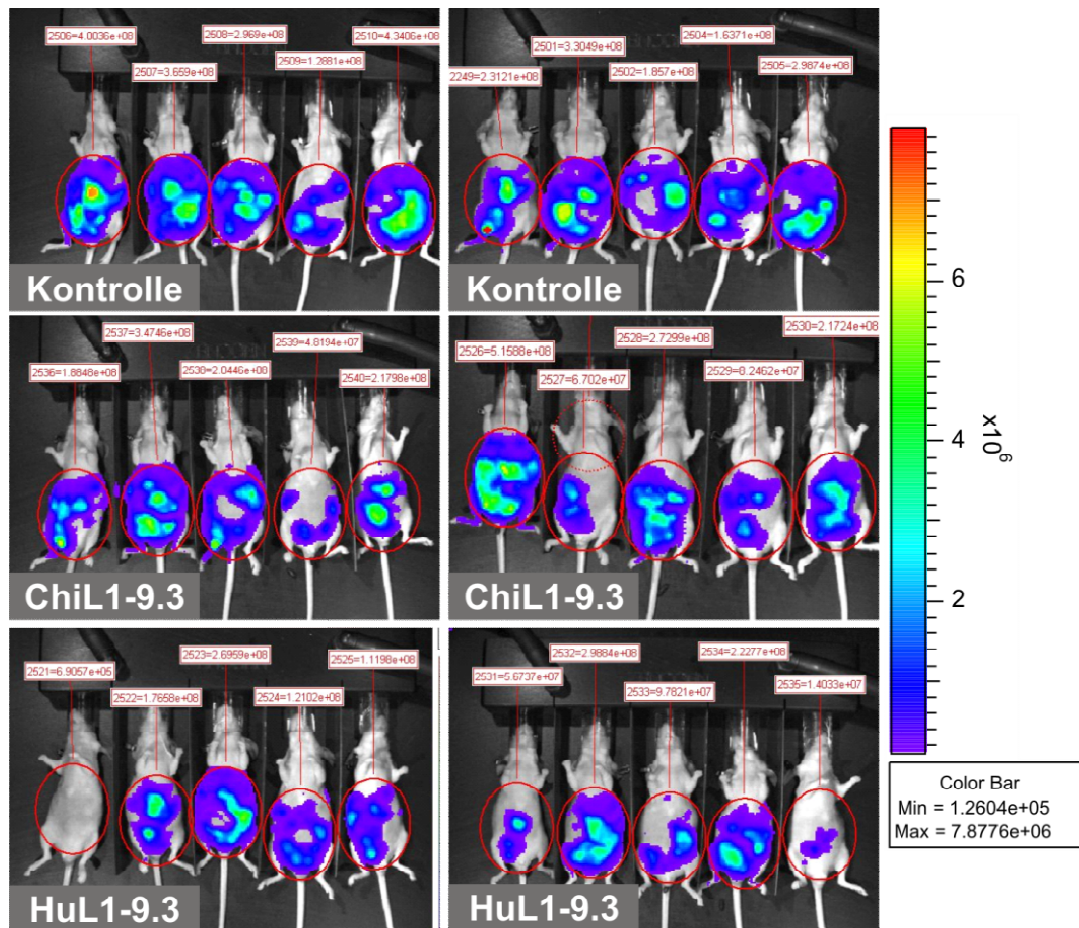


Abbildung 4.54: Luciferase-Aktivitätsmessung am Tag 26 nach Tumorinokulation. Nach Injektion von Luciferin i.p. konnte die Umsetzung durch Luciferase über die Lichtemission gemessen werden. Dargestellt sind jeweils 10 Mäuse der Kontrollgruppe, der ChiL1-9.3 und der HuL1-9.3 behandelten Gruppe.

Die Abbildung 4.54 zeigt die Messung der Biolumineszenz nach 26 Tagen. Eine Reduktion des Tumors ist für Mäuse aus der ChiL1-9.3-Gruppe sowie für HuL1-9.3 behandelte Mäuse zu erkennen. Nach Beendigung des Experiments nach 36 Tagen wurden die Tumore entnommen und gewogen. Abbildung 4.55 zeigt die Auswertung der Tumormassen. Eine Therapie mit beiden humanisierten Antikörpern resultiert in einer signifikanten Reduktion der Tumormasse. So ergab sich für die ChiL1-9.3 ($p=0,01$) sowie für HuL1-9.3 Therapie ($p=0,02$) eine signifikante Reduktion des Tumors um ca. 40%.

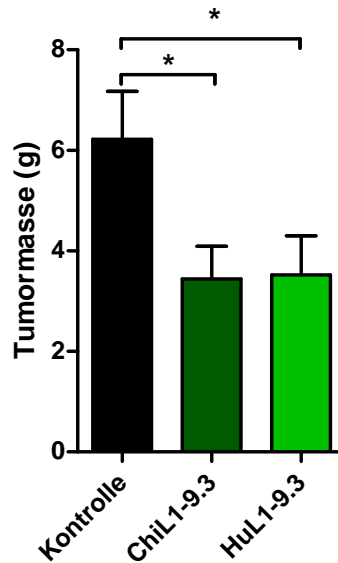


Abbildung 4.55: Tumormasse nach 36 Tagen. Nach Beendigung des Experimentes wurden die Tumore entnommen und gravimetrisch bestimmt. Die Bestimmung des Mittelwerts \pm SEM ergab: Kontrolle = $6,220 \pm 0,9547$ g; N = 10; chiL1-9.3 = $3,440 \pm 0,6508$ g, N = 10; huL1-9.3 = $3,520 \pm 0,7787$ g, N = 10. Signifikanzniveau: * $p < 0,05$

Die Ergebnisse der Therapie mit den murinen L1-9.3 Antikörpern können sowohl mit dem chimärisierte mAk wie auch mit dem humanisierten mAk bestätigt werden.

4.5.4 Analyse der ADCC-Fähigkeit

Die Therapie mit dem L1-9.3/IgG2a-Antikörper führt zu einer Erhöhung von infiltrierenden Immunzellen in den Tumorbereich. Durchflusszytometrische Analysen zeigten, dass es sich hierbei besonders um monozytäre Zellen handelt (s. Abschnitt 4.4.3). Monozyten und Makrophagen können über ihre Rezeptoren mit Hilfe von tumorzellgebundenen Antikörpern zytotoxische Effekte in Tumorzellen hervorrufen. Um die Rolle dieses indirekten Einflusses zu klären, wurde daher die ADCC-Fähigkeit untersucht. Auf Basis der Mausantikörper konnte hierfür kein stabiler Assay etabliert werden. Da die murine IgG2a-Variante der humanen IgG1-Variante in ihrer Funktionalität entspricht, wurden daher die humanisierten mAk zur Analyse verwendet. ChiL1-9.3 wie auch HuL1-9.3 besitzen einen konstanten Teil des IgG1-Typs.

Zur Analyse der humanisierten mAk wurden SKOV3ip Zellen als Zielzellen eingesetzt. Als Effektorzellen wurde aufgereinigte PBMCs aus frischen Blutkonserven verwendet. Die Zellen wurden in einem Verhältnis von 50:1 (Effektorzelle/Zielzelle) eingesetzt.

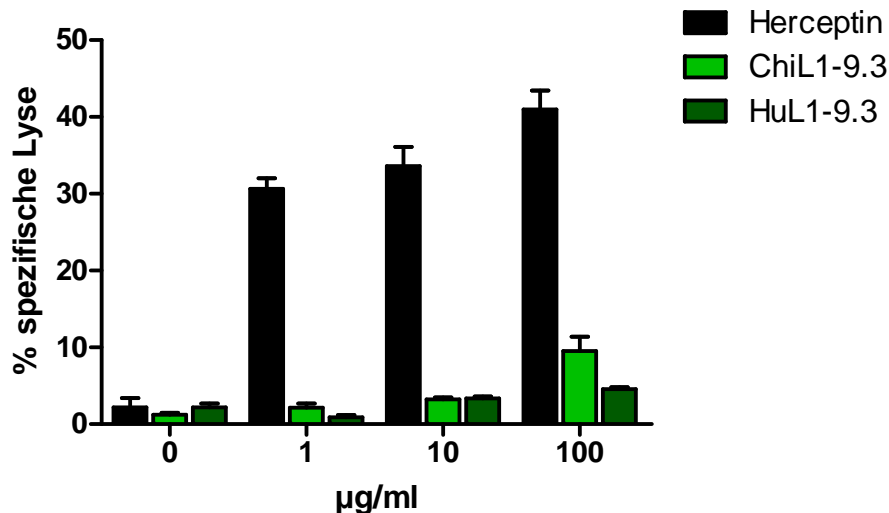


Abbildung 4.56: ADCC-Analyse mit humanisierten L1 mAk. SKOV3ip Zellen wurden mit ^{51}Cr markiert. Anschließend wurden die Zellen mit den verschiedenen Antikörpern inkubiert (ChL1-9.3, HuL1-9.3 und Herceptin®). Als Effektorzellen wurden frische humane PBMC verwendet. Die Effektorzelle-Zielzelle Ratio betrug dabei 50:1. Nach Zugabe der Effektorzellen wurde für 4 h bei 37°C inkubiert. Zur Detektion der spezifischen Lyse wurde der Mediumüberstand radioaktiv vermessen. Als Positivkontrolle diente der humanisierte Herceptin® Antikörper.

In der Abbildung 4.56 sind die Ergebnisse des zytotoxischen Tests dargestellt. Verwendet wurden hierbei die beiden humanisierten Varianten des L1-9.3 Antikörpers, sowie Trastuzumab (Herceptin®) als Positivkontrolle. Herceptin® ist ein humanisierter mAk gegen das Oberflächen-Antigen Her2/neu. Dieses Antigen ist auch auf SKOV3ip Zellen exprimiert. Nach Inkubation von 4 h bei 37°C wurde der Test beendet. Die Auswertung ergab für Herceptin® eine konzentrationsabhängige spezifische Lyse von SKOV3ip Zellen. Mit 100 µg/ml Antikörper kann eine Lyse von 40% erreicht werden. Die beiden humanisierten Varianten von L1-9.3 hingegen lösten keine spezifische Lyse aus.

4.5.5 Bestimmung der Glykosylierungsstruktur der humanisierten Antikörper

Im vorangegangenen Experiment konnte für die verwendeten humanisierten L1 mAk keine ADCC-Aktivität nachgewiesen werden. Was ist der Grund für diesen fehlenden Wirkungsmechanismus? Aus der Literatur ist bekannt, dass die Glykosylierungsstruktur am Asn-297 Einfluss auf die Effektorfunktion, insbesondere auf die ADCC-Funktion hat (Jefferis, 2005). In Abbildung 4.57 ist die allgemeine Glykosylierungsstruktur am Asn-297 abgebildet. Des Weiteren zeigt die Abbildung auch mögliche Modifikationen (G0F, G1, G1F, G2, G2F) der Glykosylierung.

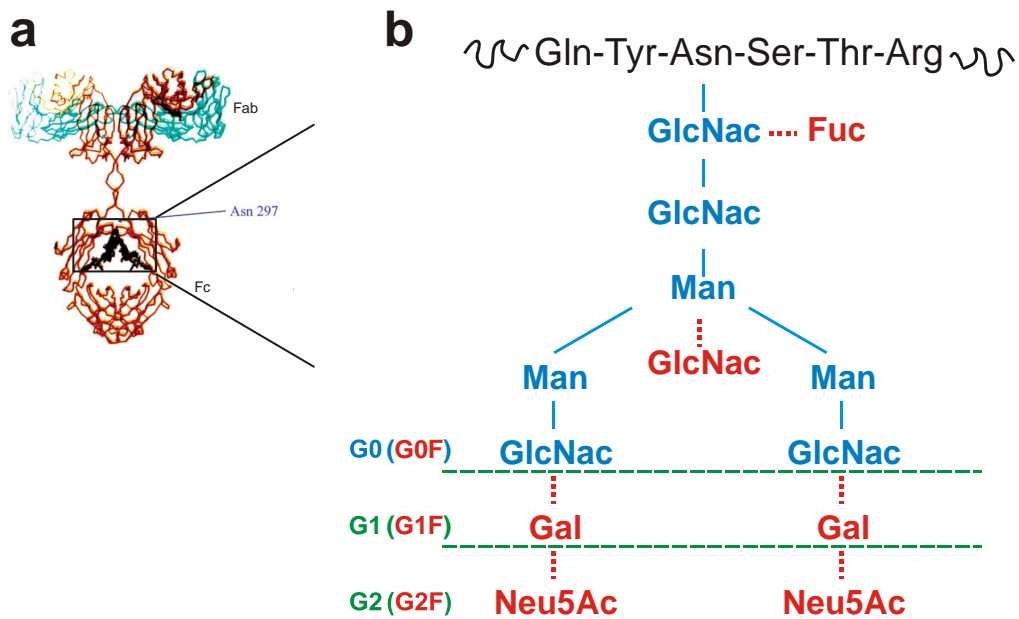


Abbildung 4.57: a) Humane IgG Struktur. b) Mögliche Glykosylierungsstrukturen der N-Glykosylierung am Asn-297 des konstanten IgG Teils. Das Heptasaccharid, welches in normalem menschlichem IgG vorhanden ist, ist Blau dargestellt; dieses bildet die Struktur G0. Zusätzliche Zuckerreste, die angebracht werden können, sind im Rot gezeigt. G0F ist die fukosylierte G0 Struktur. GlcNAc N-Acetylglucosamine; Fuc Fukose, Man Mannose; Gal Galaktose; Neu5Ac Sialinsäure. (aus Jefferis, 2005)

Um einen Überblick über die Glykosylierungsvarianten der getesteten mAk zu erhalten, wurde ein Lektin-ELISA entwickelt, welcher bestimmte Glykosylierungsstrukturen erkennt. Lektine sind komplexe Proteine oder Glykoproteine, die spezifische Kohlenhydratstrukturen erkennen und binden und dadurch in der Lage sind, spezifisch an Zellen bzw. Zellmembranen zu binden und von dort aus biochemische Reaktionen auszulösen. Sie stammen zumeist aus Pflanzen, können aber auch tierischen oder bakteriellen Ursprungs sein. Lektine spielen unter anderem eine besondere Rolle im Immunsystem. Sie können bestimmte Kohlenhydrat-Strukturen erkennen, welche ausschließlich auf Pathogenen vorhanden sind. Im folgenden ELISA wurden Lektine aus Tabelle 4.4 verwendet.

Tabelle 4.4 Herkunft und Spezifität von Lektinen. Beschrieben sind 5 verschiedene Lektine, welche im ELISA verwendet wurden.

Lektin	Pflanze	Spezifität
SNA	Sambucus nigra Agglutinin (Holunderbeere)	Sialinsäure
Con A	Canavalia ensiformis Agglutinin (Jackbohne)	Mannose, Glukose
MPA	Maclura pomifera Agglutinin (Osagebaum)	Galaktose
UEA	Ulex europaeus Agglutinin (Ginster)	Fukose
LTA	Lotus tetragonolobus Agglutinin (gemeiner Hornklee)	Fukose

Die mAk wurden auf ELISA Platten immobilisiert. Anschließend erfolgte die Inkubation mit den verschiedenen biotinylierten Lektinen. Gebundene Lektine wurden dann mit einem entsprechenden Zweitantikörper nachgewiesen.

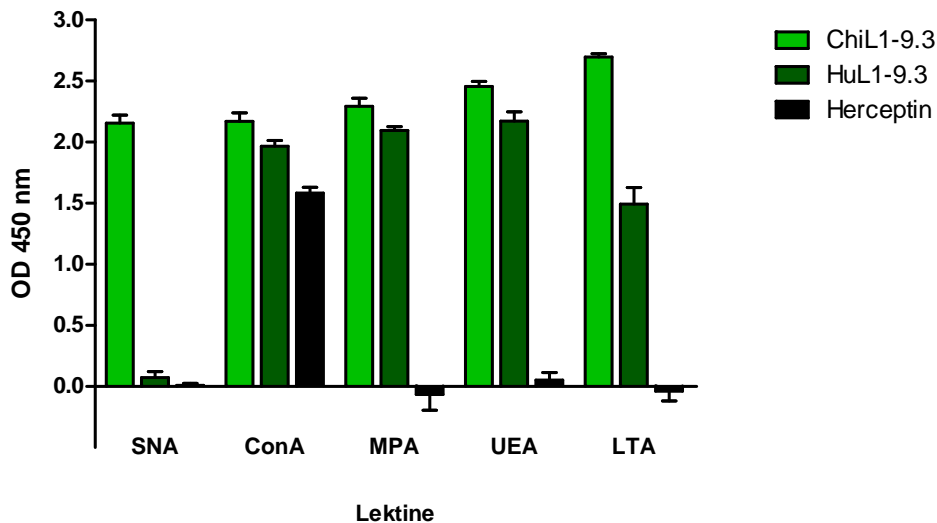


Abbildung 4.58: Lektin-ELISA. Abgebildet sind die Ergebnisse mit ChiL1-9.3, HuL1-9.3 und Herceptin®. Die mAk wurden auf 96-Lochplatten immobilisiert. Anschließend erfolgte eine Inkubation mit den Lektinen, gefolgt von einem Peroxidase-gekoppelten Streptavidinkomplex.

In Abbildung 4.58 sind die Ergebnisse dieser Analyse dargestellt. Für Herceptin® ergab sich nur eine Bindung an ConA. Somit konnten lediglich Mannose bzw. Glucose-Strukturen nachgewiesen werden. Für ChiL1-9.3 ergab sich für alle getesteten Lektine eine positive Reaktion. ChiL1-9.3 besitzt folgende Glycosylierungsreste: Sialinsäure, Mannose, Galaktose und Fukose. Für den HuL1-9.3 mAk resultierte eine ähnliche Struktur. Dieser mAk zeigte jedoch keine Bindung an SNA, somit konnte keine Sialinsäure nachgewiesen werden. In Tabelle 4.5 sind die analysierten Zuckerstrukturen zusammengefasst.

Tabelle 4.5: Übersicht über die Ergebnisse des Lektin-ELISA. Gelistet sind die jeweiligen Zuckerstrukturen der analysierten Antikörper.

Lektin	Spezifität	ChiL1-9.3	HuL1-9.3	Herceptin®
SNA	Sialinsäure	+++	-	-
Con A	Mannose, Glukose	+++	+++	+++
MPA	Galaktose	+++	+++	-
UEA	Fukose	+++	+++	-
LTA	Fukose	+++	++	-

Somit zeigt Herceptin® einen deutlichen Unterschied gegenüber den L1-Antikörpern. Herceptin® weist weder Galaktose noch Fukose Strukturen auf. Wie bei HuL1-9.3 fehlt auch Sialinsäure in der Struktur.

Unterschiedliche Glykosylierungsmuster in der N-Glykosylierung am Asn-297 können die ADCC-Effekte beeinflussen; zusammengefasst in (Jefferis, 2009). So konnte gezeigt werden, dass insbesondere ein Fehlen der Fukose die ADCC-Aktivität drastisch erhöht.

4.5.6 Untersuchung der ADCC-Effekte eines modifizierten HuL1-9.3 Antikörpers

Das vorangegangene Experiment macht deutlich, dass sich die Zuckerstrukturen der mAk klar unterscheiden, und dies wiederum eine Ursache für die mangelnde ADCC-Funktion der L1 mAk sein kann. Um dennoch ADCC-Effekte mit humanisierten L1 mAk zu erreichen, wurde die Glykosylierungsstruktur des HuL1-9.3 modifiziert.

Die Glykosylierung eines Antikörpers hängt von Enzymen im endoplasmatischen Retikulum und im Golgiapparat der eukaryotischen Wirtszelle ab. Zusätzlich wird die Glykosylierung des Antikörpers durch das verwendete Kulturmedium, die Effizienz der Proteinexpression und dem physiologischen Zustand der Wirtszelle beeinflusst. Die am häufigsten verwendeten Wirtszellen sind CHO (chinese hamster ovary) Zellen und murine NS0 und Sp2/0 Zellen. Oftmals wurden diese noch gentechnisch in ihrer Enzymbeschaffenheit modifiziert. Um eine verbesserte Glykosylierung der mAk zu erhalten, wurde in der vorliegenden Arbeit das Wirtszellsystem verändert. Das Plasmid für den HuL1-9.3 mAk wurde in eine neue Fusionszelle transfiziert. Diese humane F2N-Zelllinie wurde hergestellt, indem 293 Zellen mit Namalwa Zellen fusioniert wurden. Dies führt zu einer Hybridzelle mit verbesserter Glykosylierung.

Der daraus resultierende mAk HuL1-9.3/F2N wurde von Celltrion Biopharmaceutical Plant (Incheon, South Korea) produziert und zur Verfügung gestellt.

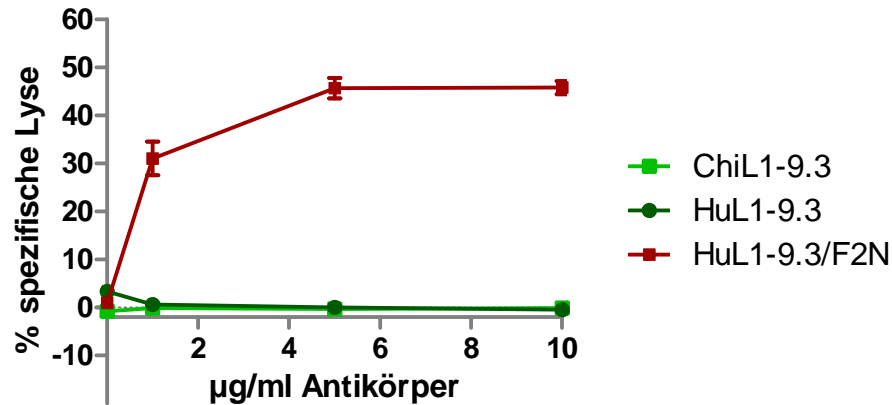


Abbildung 4.59: ADCC-Analyse des modifizierten L1-Antikörpers. SKOV3ip Zellen wurden mit ^{51}Cr markiert. Anschließend wurden die Zellen mit den verschiedenen Antikörpern inkubiert (ChiL1-9.3, HuL1-9.3 und HuL1-9.3/F2N). Als Effektorzellen wurden frische humane PBMC verwendet. Die Effektorzelle-Zielzelle Ratio betrug dabei 50:1. Nach Zugabe der Effektorzellen wurde für 4 h bei 37°C inkubiert. Zur Detektion der spezifischen Lyse wurde der Mediumüberstand radioaktiv vermessen.

Zur Analyse der Zytotoxizität wurde ein weiterer ADCC-Test durchgeführt. SKOV3ip Zellen wurden radioaktiv mit ^{51}Cr markiert. Anschließend erfolgte eine 4 stündige Inkubation der Zellen mit den jeweiligen Antikörpern und frisch isolierten humanen PBMCs. Mit ChiL1-9.3 und HuL1-9.3 konnte keine spezifische Lyse von Tumorzellen erzielt werden. Allerdings führt der modifizierte mAk HUL1-9.3/F2N, wie in Abbildung 4.59 dargestellt, zu einer konzentrationsabhängigen spezifischen Lyse. Dabei wird eine 45%ige spezifische Tumorzelllyse bereits mit 5µg/ml erreicht.

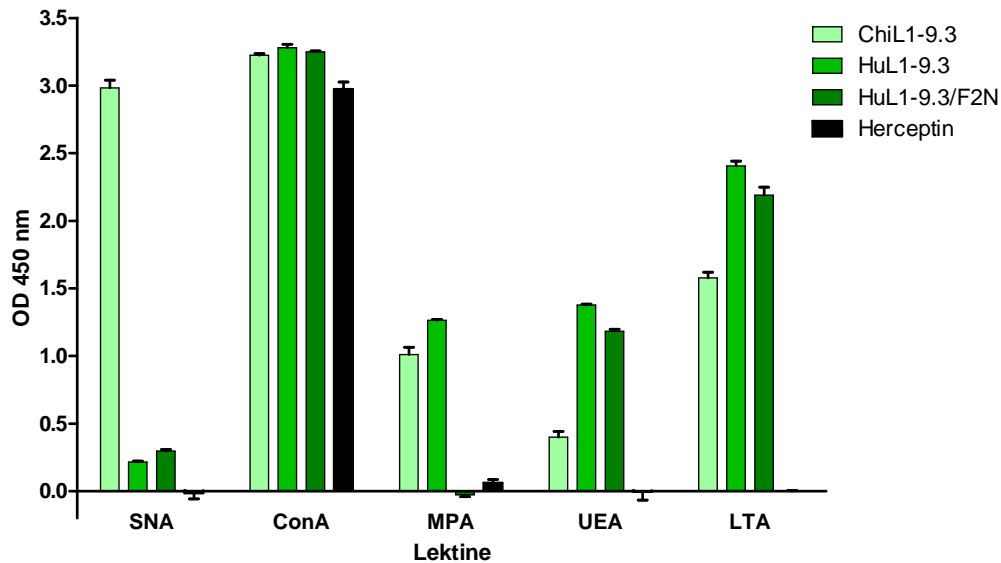


Abbildung 4.60: Lektin-ELISA. Abgebildet sind die Ergebnisse mit ChiL1-9.3, HuL1-9.3, HuL1-9.3/F2N und Herceptin®. Die mAk wurden auf 96-Lochplatten immobilisiert. Anschließend erfolgte eine Inkubation mit den Lektinen, gefolgt von einem Peroxidase gekoppelten Streptavidinkomplex.

In einer abschließenden Analyse mittels Lektin-ELISA sollte geklärt werden, ob die verbesserte ADCC-Funktion des modifizierten Antikörpers durch eine veränderte Glykosylierungsstruktur verursacht worden sein könnte. In Abbildung 4.60 sind die Ergebnisse des Lektin-ELISA grafisch dargestellt. Für den Herceptin®-Antikörper wie auch für ChiL1-9.3 und HuL1-9.3 wurden ähnliche Ergebnisse wie im vorherigen Experiment erzielt. Der modifizierte HuL1-9.3/F2N mAk zeigt jedoch im Vergleich zu HuL1-9.3 keine Bindung mit dem Lektin MPA. Somit besitzt dieser Antikörper durch den Wechsel des Expressionssystem keine Galaktosereste mehr in seiner Glykanstruktur. Ansonsten wurden keine Unterschiede in der Glykosylierungsstruktur der beiden mAk festgestellt.

5. DISKUSSION

In der Behandlung des Ovarialkarzinoms besteht ein weiterer Bedarf an neuen Therapiemöglichkeiten. Das tumor-assoziierte Antigen L1 erfüllt alle wichtigen Kriterien als Zielmolekül für eine Antikörper-basierende Therapie des Ovarialkarzinoms. Neben anderen Tumorgeweben ist L1 besonders im Ovarialkarzinom stark überexprimiert (Fogel et al., 2003a; Huszar et al., 2006). Hier konnte bereits gezeigt werden, dass die L1 Expression mit einer schlechten Prognose der Patientinnen korreliert. Eine L1 Expression erhöht die Zellmotilität, Invasions- und Metastasierungsfähigkeit (Gavert et al., 2005; Gavert et al., 2007; Meier et al., 2006; Silletti et al., 2004). Im gesunden Organismus wird L1 im zentralen Nervensystem und in peripheren Nerven exprimiert. Ferner ist eine Expression in den Zellen der Sammelrohre der Niere und im geringen Maße auch auf Leukozyten vorhanden. Durch diese restriktive Expression ist im Hinblick auf eine Antikörper-basierte Therapie eine geringe bis keine Nebenwirkung zu erwarten. Da über die Blut-Hirn-Schranke die Passage von IgG-Antikörpern verhindert wird (Bidros und Vogelbaum, 2009; Brightman, 1977), werden keine Antigen-Antikörper Interaktionen auf den neuronalen Zellen im Gehirn erwartet. Beachtet werden sollte aber, dass in seltenen Fällen eine krankheitsbedingte Dysfunktion der Blut-Hirn-Schranke auftreten kann. Eine erhöhte Permeabilität der Blut-Hirn-Schranke konnte in einigen neuronalen Erkrankungen (u.a. Alzheimer, Multiple Sklerose, Parkinson) und bei Diabetes Mellitus Typ II nachgewiesen werden (Horani und Mooradian, 2003; Pahnke et al., 2009; Weiss et al., 2009). Jedoch wurden bisher keine Zusammenhänge mit einer möglichen Permeabilität von therapeutischen Antikörpern beschrieben.

Eine prospektive Studie unserer Arbeitsgruppe in Mäusen untersuchte die Zytotoxizität von L1-Antikörpern (Daten nicht publiziert). Die wöchentliche Injektion eines monoklonalen Antikörpers gegen murines L1 (mAk 555) über eine längere Zeit zeigt bei den Tieren keine Nebenwirkungen oder auffälliges Verhalten. Ähnliche Beobachtungen wurden auch in einer ersten Zytotoxizitätsstudie mit Cynomolgus-Affen (Makaken) gemacht. Diese Studie wurde im Auftrag der Medigene AG München extern durchgeführt. Die L1 Expression im Menschen ist zum Cynomolgus-Affen vergleichbar. Eine immunhistochemische Analyse der L1 Expression auf Gewebeschnitten von Mensch und Cynomolgus-Affen zeigt, dass Unterschiede in der L1 Expression nur im Gewebe der Nebenniere und in der Prostata auftreten (Abb. 5.1).

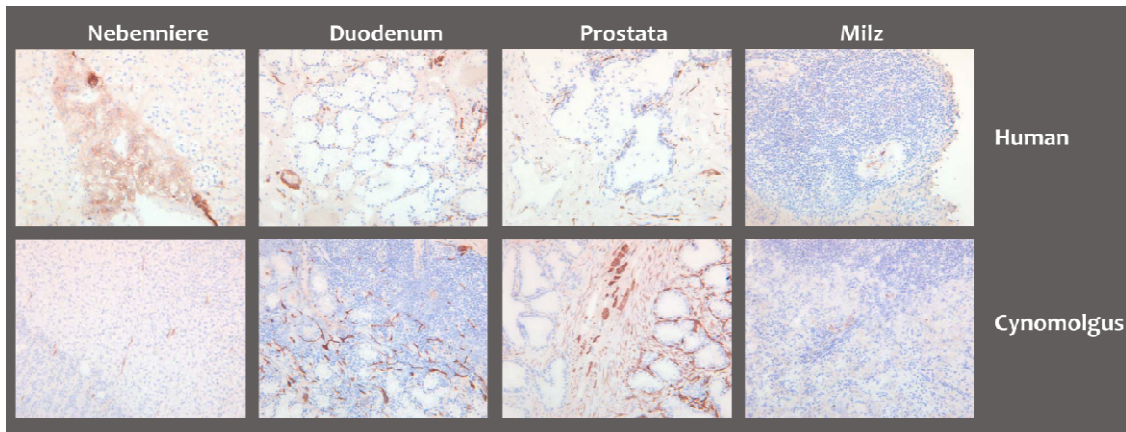


Abbildung 5.1: Vergleich der L1 Expression auf Geweben von Mensch und Cynomolgus. Der immunhistologische Vergleich wurde mit L1-9.3 durchgeführt, welcher mit L1 aus Kaninchen, Hund und Affen kreuzreagiert. Originalvergrößerung 200x. (Durchgeführt von Yvonne Hirle, Medigene AG, München)

Nach der Injektion von je zwei Dosen des HuL1-9.3 mAk zeigten die beiden Cynomolgus-Affen keine ungewöhnlichen Verhaltensweisen im Verlauf des Experiments. Immunhistochemische Untersuchungen der Organe dieser Tiere detektierten nur in der Niere den gebundenen L1 mAk. Die lokale renale Färbung könnte durch eine spezifische Bindung des Antikörpers an L1 der Sammelrohre hervorgerufen worden sein oder aber durch die natürliche renale Clearance bedingt sein. Durch die filtrierende Eigenschaft der Niere können sich Antikörper, aber auch Medikamente und Serumbestandteile anreichern, da sie aufgrund ihrer Größe (> 80 kDa) nicht nierengängig sind. Die Studie zeigt, dass eine kurzzeitige Injektion von HuL1-9.3 sehr gut toleriert wird. Der finale Antikörper, welcher letztendlich in der klinischen Studie eingesetzt werden soll, weicht jedoch durch Modifikationen im Expressionssystem vom HuL1-9.3 mAk ab. Dieser modifizierte mAk HuL1-9.3/F2N besitzt eine verbesserte ADCC-Funktion (Abb. 4.59). Allerdings sollte eine weitere ausführliche Zytotoxizitätsstudie durchgeführt werden, bevor eine Phase-I-Studie mit dem HuL1-9.3/F2N mAk erfolgen kann, denn neben den Einflüssen des Fab-Teils des Antikörpers können insbesondere auch die Modifikationen im Fc-Teil zu Toxizitäten führen.

In Rahmen dieser Arbeit wurden die charakteristischen Eigenschaften und therapeutischen Effekte von neun unterschiedlichen Antikörpern gegen L1 zur Behandlung von Ovarialkarzinomen untersucht. Zusätzlich wurden vom potentiell aktivsten mAk humanisierte Varianten produziert und funktionell bewertet.

5.1 Charakteristische Eigenschaften der L1-Antikörper

Die Antikörper wurden mit Hilfe der konventionelle Hybridomtechnologie hergestellt. Mehr als die Hälfte der mAk erkennen ein Epitop innerhalb der ersten Ig-Domäne. Des Weiteren sind

Antikörper produziert worden, welche ein Epitop in der dritten (L1-14.10) und sechsten (L1.35.9) Domäne sowie im Fibronectin-Bereich detektieren (L1-OV52.24, L1-OV549.20). Gegen andere Bereiche, unter anderem Ig 4 und Ig 5, konnten keine mAk generiert werden (Abb. 4.14). Die natürliche Faltung von L1 bedingt, dass L1 entweder linearisiert oder als Hufeisenstruktur vorliegt (Abb. 5.2). Die Hufeisenform wird aus den Ig 1-4 Domänen gebildet, wobei jeweils Ig 1 und Ig 4 bzw. Ig 2 und Ig 3 Wasserstoffbrücken ausbilden (Haspel und Grumet, 2003; Su et al., 1998). Durch die räumliche Struktur von L1 sind einige Domänen evtl. schlechter zugänglich und könnten somit weniger immunogen sein. Dass gegen Ig 2, Ig 4 und Ig 5 keine mAk generiert werden konnten, lässt vermuten, dass diese Bereiche schlechter zugänglich sind oder in der Maus wenig immunogen sind.

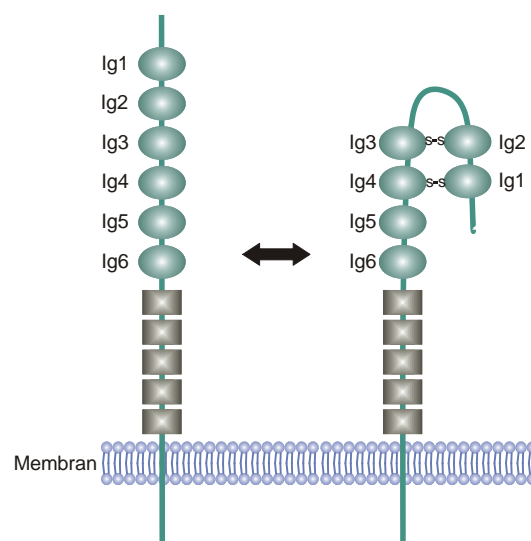


Abbildung 5.2: L1-Hufeisenstruktur. Dargestellt sind das linearisierte Molekül und die Hufeisenstruktur von L1. Die Hufeisenstruktur wird durch Disulfidbrücken zwischen den einzelnen Ig Domänen stabilisiert. Abgewandelt nach (Haspel und Grumet, 2003).

Vergleicht man die Assoziationskonstanten der einzelnen mAk miteinander, so findet man für alle mAk gute Assoziationsraten. Der Wert der Assoziationskonstante k_a liegt für alle Antikörper zwischen 1×10^4 und 1×10^6 1/Ms (Abb. 4.17). Nur L1-14.10, L1-38.12 und L1-35.9 zeigen schwächere Assoziationen. Diese schwächere Assoziationsfähigkeit wird durch ihre geringere Bindungsfähigkeit in der Durchflusszytometrie verdeutlicht (Abb. 4.4). Da eine vollständige Dissoziation erst nach mehr als 16 h erreicht werden konnte, war es schwierig, die Dissoziationsrate k_d zu ermitteln. Deshalb wurde für jeden mAk ein Dissoziationswert bereits nach 5 h bestimmt. Über die k_d und k_a Raten konnten anschließend die in Abbildung 4.18 und Tabelle 3.3 beschriebenen Bindungsassoziationen K_D errechnet werden. Insgesamt kann für alle mAk eine stabile Interaktion mit dem L1-Antigen ermittelt werden. So zeigen auch L1-38.12, L1-14.10 und L1-35.9 trotz ihrer schwächeren Assoziation eine sehr gute Bindungskonstante K_D . Hingegen sind die K_D -Werte für L1-OV543.18, L1-OV52.24, L1-OV366.1,

L1-OV549.20 aufgrund ihrer schnelleren Dissoziation etwas schlechter. Da bei der Bestimmung der Dissoziationsrate nach 5h keine vollständige Dissoziation vorliegt, ist bei der vorliegenden Biacore-Analyse die Assoziationsrate aussagekräftiger. Aufgrund der Oberflächen-basierenden Technologie der Biacore-Methode kann die Bestimmung der Dissoziationsrate von Antikörpern aufgrund ihrer hohen Affinität problematisch sein (Drake et al., 2004). Beachtet werden müssen dabei insbesondere Massentransport-Artefakte, sterische Blockaden durch Immobilisierung des Antigens sowie Aggregationen von Antikörpern.

L1-OV198.5 ist der einzige Antikörper, der im Western Blot nur unter nicht reduzierten Bedingungen sein Epitop erkennt. Dieser mAk detektiert vermutlich ein diskontinuierliches Epitop, für dessen Erkennung eine native Faltung des L1 Moleküls erforderlich ist.

5.1.1 L1-Antikörper in der Diagnostik

Zur Überprüfung einer möglichen diagnostischen Anwendung wurden die verschiedenen mAk auf Paraffinschnitten histopathologisch getestet. Insbesondere L1-14.10 zeigt eine starke spezifische Bindung. Trotz der schwächeren Bindung im Durchflusszytometer und der geringeren Assoziationskonstante eignet sich dieser mAk zum Nachweis von L1 auf paraffingebetteten Tumoren von Patientinnen. Durch die vorherige Antigenbehandlung ist das Epitop für L1-14.10 vermutlich besser erkennbar. Akzeptable Ergebnisse zeigen auch L1-35.9 und L1-OV52.24. Die mAk L1-9.3 und L1-OV198.5 zeigen eine schwächere Färbung in der IHC-Analyse. Überraschende Ergebnisse liefert L1-38.12. Dieser mAk zeigt keine Färbung im Tumorgewebe, aber detektiert spezifisch L1 auf peripheren Nerven. Dies führt zu der Annahme, das L1-38.12 spezifisch an die neuronale Form bindet. Da der mAk ein Epitop innerhalb der ersten Domäne erkennt, liegt die Vermutung nahe, dass er für das alternativ gespleißte Exon 2 spezifisch sein könnte. Die Beweisführung wurde über eine durchflusszytometrische Analyse mit den L1-Spleißvarianten durchgeführt. L1-38.12 bindet dabei an die neuronale Form, aber nicht an die Exon 2 depletierte Form. Daher scheint dieser Ak für einen Therapieansatz zwar nicht geeignet, kann aber für weitere Forschungsansätze in Bezug auf die alternativ gespleißten L1-Varianten sehr nützlich sein. Alle anderen mAk sind aufgrund ihrer geringen Reaktivität für eine immunhistochemische Analyse nicht geeignet.

Die immunhistochemische Bestimmung der L1 Expression auf Tumoren ist notwendig, um die Eignung für eine Antikörpertherapie zu beurteilen. Es konnte bereits gezeigt werden, dass eine Expression von L1 mit einer schlechten Prognose im Patienten korreliert (Allory et al., 2005; Boo et al., 2007; Fogel et al., 2003a; Fogel et al., 2003b; Kaifi et al., 2007; Thies et al., 2002; Zecchini et al., 2008). Neben der Detektion von L1 auf Tumorgewebe ist aber auch ein

Nachweis des löslichen L1 in Aszites und Plasma von Patienten möglich (Abb. 4.2). Gerade im Hinblick auf einen Schnelltest erscheint die Einführung eines sL1-ELISAs in der klinischen Diagnostik sinnvoll. Schon vor dem operativen Eingriff kann durch eine Blut- oder Aszitesanalyse bei Anwesenheit von sL1 ein fortgeschrittenes Stadium des Tumors vermutet werden. Fogel et al. (2003) detektierte bei 80% der L1 positiven Ovarialkarzinome sL1 im Serum der Patientinnen. Zusätzlich wurden in neun von zehn L1 exprimierenden Endometrialkarzinomen sL1 im Patienten-Serum nachgewiesen. In L1 negativen Tumoren wurde kein sL1 im Serum detektiert. In der vorliegenden Arbeit enthielten knapp 40% der analysierten Aszitesproben lösliches L1 und bei 14% dieser Patientinnen konnte zusätzlich sL1 im Plasma nachgewiesen werden. Diese Patientinnen besitzen einen L1-positiven Tumor, der durch eine L1-Antikörpertherapie behandelt werden könnte. Ferner wurde eine Korrelation zwischen sL1 im Blut und nicht vollständig entferntem Tumor nachgewiesen (Abb. 4.3). Gerade diese Patientinnen würden durch einen raschen Therapiestart mit L1 mAk profitieren.

5.1.2 Funktionalität von L1-Antikörpern in vitro

chCE7 ist ein chimärisierter L1 mAk, welcher von einer Schweizer Arbeitsgruppe intensiv analysiert wird (Amstutz et al., 1993). Dieser Ak bindet wie L1-35.9 an ein Epitop in der sechsten Ig-Domäne (Friedli et al., 2009). chCE7 inhibiert die Proliferation verschiedener L1 exprimierender Zelllinien in vitro (Arlt et al., 2006). Auch L1-35.9 zeigt eine anti-proliferative Wirkung auf Ovarialkarzinom-Zelllinien (Daten nicht gezeigt). Die Integrin-vermittelte Adhäsion von SKOV3ip Zellen an sL1 oder L1/Ig1-6 kann durch chCE7 blockiert werden (Friedli et al., 2009). chCE7 beeinflusst die RGD-abhängige Integrin-Bindung an sL1, aber nicht die homophilische Interaktion von L1. Des Weiteren zeigt dieser Ak eine Inhibition der Invasion und der Angiogenese in vitro (Friedli et al., 2009). Als Ursache vermuten die Autoren die Blockierung der Integrinbindung an die RGD-Sequenz von sL1 durch den chCE7 Antikörper. Integrine interagieren mit extrazellulären Proteinen und Bindungspartnern auf anderen Zellen. Die Bindung eines Liganden an ein Integrin löst Signaltransduktion in der Zelle aus. Dies hat u. a. eine Umstrukturierung des Zytoskeletts, Veränderungen im Adhäsionsverhalten und Migrationsverhalten und der Proliferation zur Folge. Insbesondere in Bereich der Tumorprogression spielt die Integrin-Bindung aufgrund ihrer Beteiligung an der Proliferation, Invasion, Angiogenese und Metastasierung eine große Rolle (Guo et al., 2007). Eine Integrin-Bindung an L1 führt im Pankreaskarzinom zur Bildung von IL-1 β , welches in autokrin/parakriner Bindung eine NF κ B-Aktivierung hervorruft (Kiefel et al., 2010 Oncogene versandt).

Die ähnlichen Eigenschaften von chCE7 und L1-35.9 lassen auch für L1-35.9 eine Blockierungsfähigkeit der RGD-abhängigen Integrinbindung und der damit zusammenhängenden Hemmung der Signaltransduktionewege vermuten. Aufgrund der schwachen Bindung an L1 exprimierende Zellen und der geringen Affinitätskonstante wurde dieser mAk aber für weitere therapeutische Analysen in dieser Arbeit nicht in Betracht gezogen. Daher stehen Versuche zur Analyse des Einflusses von L1-35.9 auf die Hemmung der Tumorprogression noch aus. Erste Hinweise konnten kürzlich in unserer Arbeitsgruppe auf Transkript-Ebene erzielt werden. Die Behandlung von Pankreaskarzinomzelllinien mit L1-35.9 führte zu einer verminderten IL1 β Expression (Kiefel et al., 2010 Oncogene versandt). Ein mAk gegen die erste Ig-Domäne (L1-9.3) zeigt diesen Effekt nicht.

Während der Untersuchung der L1-L1 Interaktion zeigten einige mAk eine Blockade der homophilen Bindung (Abb. 4.28). Nach genauerer Analyse wurde festgestellt, dass nur Antikörper, deren Epitop in der ersten Ig Domäne von L1 liegt, eine erfolgreiche Inhibition hervorrufen können. In den letzten 15 Jahren beschäftigten sich viele Studien intensiv mit der Aufklärung der homophilen L1-Bindung in cis und in trans. Die homophile L1-Interaktion hat funktionell eine essentielle Bedeutung. Demnach sind insbesondere die Ig-Domänen 1-4 von L1 hierfür verantwortlich. Für das Auswachsen von Neuriten werden zusätzlich auch Ig 5-6 benötigt (Haspel et al., 2000). (Gouveia et al., 2008) untersuchte die Kinetik der homophilen Bindung. Er fand heraus, dass insbesondere die Anwesenheit der ersten und vierten Ig-Domäne notwendig ist. So zeigen Fusionsproteine mit Deletionen der 1. oder 4. Ig Domänen keine Bindung mehr. Somit können vermutlich nur L1 mAk, deren Epitope in der Ig 1 Domäne liegen, eine homophile Bindung blockieren. Auch mAk gegen die 4. Domäne könnten einen Einfluss haben; da aber im Rahmen dieser Arbeit keine mAk gegen Ig 4 generiert werden konnten, konnte dies nicht geklärt werden.

Durch die Bindung an die erste Domäne kann aber nicht nur die homophile L1-Bindung blockiert werden, sondern vermutlich auch Bindungen von L1 an Neurophilin (NRP-1) und Neurocan. Beide Moleküle binden an die erste Domäne von L1. Eine Bindung von L1CAM an NRP-1 wurde bisher hauptsächlich für neuronale Zellen beschrieben (Castellani et al., 2002; Itoh et al., 2004). 2006 wurde erstmals über eine Interaktion von L1-positiven Ovarialkarzinomzellen mit auf Mesothelzellen exprimiertem NRP-1 berichtet (Stoek et al., 2006b). Durch Bindung an VEGF-A165 verstärkt NRP-1 die Funktion des VEGFR2 auf Endothelzellen (Soker et al., 1998). Somit scheint NRP-1 ein Co-Rezeptor für VEGFR-2 auf Endothelzellen zu sein und ist in die VEGF-vermittelte Angiogenese involviert. Eine mögliche Interaktion von L1 auf Tumor-Endothelzellen mit NRP-1 während der Transmigration von Panc-

1 Tumorzellen wird von (Issa et al., 2009) beschrieben. So bewirkt eine erhöhte L1 Expression der Tumor-Endothelzellen eine selektiv gesteigerte Zelladhäsion und -transmigration von Tumorzellen und eine Ausbildung tubulärer Fortsätze in vitro, welche durch eine Antikörperbehandlung mit anti-L1 oder anti-NRP-1 inhibiert werden können. Somit könnte eine L1-Antikörpertherapie eine Blockierung der L1-NRP-1 Bindung auslösen, was evtl. zu einer Inhibition der Angiogenese und zur Blockade von Metastasierungsprozessen führen könnte.

5.1.3 Antikörper-Kreuzreaktivität mit Zelladhäsionsmolekülen der L1-Ig-Superfamilie

Die Expression von L1 in Ovarialkarzinomen ist weitreichend bekannt (Daponte et al., 2008; Euer et al., 2005; Fogel et al., 2003a; Fogel et al., 2004; Huszar et al., 2006; Zecchini et al., 2008). Kontrovers wird jedoch die Expression von L1 auf gesundem ovarialem Epithel beschrieben. So wurde von (Zecchini et al., 2008) eine Detektion von L1 auf normalem ovarialem Epithelgewebe (OSE) nachgewiesen. Im Gegensatz dazu zeigte aber eine frühere Publikation keine L1 Expression in gesundem Ovarialepithel (Fogel et al., 2003a). Da für die Analyse der L1 Expression unterschiedliche Antikörper verwendet wurden, kann eine Kreuzreaktivität mit homologen Molekülen nicht ausgeschlossen werden. Zu den Mitgliedern der L1-Immunglobulin-Superfamilie gehören neben L1 auch CHL1, Nfasc und NrCAM. Alle transmembranen Glykoproteine besitzen einen ähnlichen strukturellen Aufbau von sechs Ig-Domänen und vier bis fünf Fibronektinelementen im extrazellulären Bereich. Insbesondere der zytoplasmatische Bereich ist hochkonserviert. Alle Mitglieder besitzen hier eine Ankyrin-Binderegion, über die sie mit dem Zytoplasma interagieren können (Abb. 4.20). Das CHL1 Molekül besitzt wie auch Nfasc und NrCAM die größte Sequenz-Homologie zu L1 im zytoplasmatischen Bereich. Sie beträgt hier fast 70%, im extrazellulären Bereich hingegen nur 50%. CHL1 ist auf Neuronen, sowie Astrozyten und Schwann Zellen exprimiert (Herron et al., 2009). Die Funktionen von CHL1 sind bisher kaum analysiert worden. CHL1 ist wie L1 in der neuronalen Entwicklung involviert. Es fördert durch Komplexbildung mit NRP-1 über SemA3 die Repulsion von Axonen (Chen et al., 1999; Schlatter et al., 2008; Wright et al., 2007). CHL1 rekrutiert Hsc70 und dieser Komplex fördert die Abspaltung von Clathrin an synaptischen Vesikeln (Leshchyn'ska et al., 2006). Im Gegensatz zu L1 kann sowohl die lösliche Form als auch die transmembrane Isoform von CHL1 ein Auswachsen der Neuriten fördern (Hillenbrand et al., 1999). CHL1 kann über eine Integrin Interaktion die Migration fördern, welche im Gegensatz zu L1 durch $\alpha 1\beta 1$ und $\alpha 2\beta 1$ Integrine vermittelt wird (Bhusi et al., 2003). Erst kürzlich wurde eine Überexpression von CHL1 auf einigen Ovarialkarzinomen nachgewiesen (Manderson et al., 2009). In der Publikation wurde jedoch nur die Expression auf

Transkriptebene analysiert. Ein Nachweis auf Proteinebene wurde bisher nicht durchgeführt. Da L1 in 80% der Ovarialkarzinome exprimiert wird, sollte eine Kreuzreaktivität der L1 mAk mit dem CHL1-Molekül ausgeschlossen werden. Im ELISA konnte nachgewiesen werden, dass keiner der neu hergestellten L1 mAk mit CHL1 kreuzreagiert (Abb. 4.23). Bei dieser Methode wurden Fc-Fusionsproteine eingesetzt, welche den extrazellulären Bereich von CHL1 bzw. L1 besitzen.

Um den Nachweis auf das gesamte Molekül zu erweitern, erfolgte neben einer durchflusszytometrischen Bestimmung zusätzlich ein proteinbiochemischer Nachweis (Abb. 4.21). Hierfür wurde die Endometrialkarzinom-Zelllinie IK mit L1 bzw. CHL1 transfiziert. Die Zellysate wurden anschließend im Western Blot analysiert. Alle extrazellulären L1 mAk zeigen eine Affinität zu L1 exprimierenden Zellen, nicht aber zu CHL1 oder zu Kontrollzellen. Zum Nachweis der CHL1 Expression wurde ein extrazellulärer Ak gegen CHL1 mitgeführt, welcher spezifisch CHL1 bindet, nicht aber L1. Des Weiteren wurde beobachtet, dass Ak gegen die zytoplasmatische Domäne von L1 auch mit dem zytoplasmatischen Teil von CHL1 kreuzreagieren. Um dieses Phänomen genauer zu untersuchen, wurden GSTFusionsproteine von den zytoplasmatischen Bereichen der beiden Moleküle hergestellt und mittels Western Blot Analyse und ELISA untersucht. Zur Detektion wurden verschiedene Ak gegen die zytoplasmatische Region von L1 eingesetzt. Alle drei getesteten Ak (pcytL1, 745H7 und 2C2) binden nicht nur an L1, sondern auch an cytoplasmatisches CHL1. Für 745H7 ist das spezifische Epitop schon bekannt (Schaefer et al., 2002). Die Peptidsequenz KDETFGY befindet sich nicht nur im L1-Molekül, sondern ist auch aufgrund der hohen Homologie im zytoplasmatischen Bereich des CHL1-Moleküls vorhanden (Abb. 4.20). Im ELISA bindet aber nicht nur 745H7, sondern auch der 2C2 Ak gegen die Peptidsequenz. Dieses Ergebnis lässt vermuten, dass auch 2C2 ein Epitop in diesem Bereich erkennt. Die genannten zytoplasmatischen Ak wurden zur Detektion von L1 verwendet. Insbesondere Zecchini et al. (2008) verwendete zytoplasmatische L1-Antikörper zur Detektion von L1 auf OSE sowie auf epithelialen Ovarialkarzinomgeweben (EOC). Im Gegensatz zu den Ergebnissen in (Fogel et al., 2003a) zeigte Zecchini et al. (2008) mit dem 2C2 Ak in der immunhistochemischen Analyse auch eine L1 Expression auf gesundem ovarialem Epithel. Aufgrund der in der vorliegenden Arbeit festgestellten Kreuzreaktivität der intrazellulären Antikörper, könnten die Ergebnisse im gesunden Epithel also falsch positiv bewertet worden sein. Statt L1 könnte hier CHL1 detektiert worden sein. In immunhistologischen Analysen wurde mit den extrazellulären Antikörpern kein L1 auf normalem Ovarialepithel detektiert (M.Fogel, Rehovot, Israel; nicht publiziert).

5.2 Funktionalität der L1-Antikörper in vivo

5.2.1 Überlebensanalysen und Tumorwachstum

Ein bedeutender Aspekt dieser Arbeit war die funktionelle Analyse von L1-Antikörpern in vivo. In Vorarbeiten unserer Arbeitsgruppe konnte eine tumorreduzierende Wirkung von L1 mAk in SKOV3ip Maus-Xenograft-Modellen gezeigt werden (Arlt et al., 2006; Gast et al., 2008). Vermutet wird hier ein Zusammenhang mit proliferationsinhibierenden und signalwegblockierenden Funktionen, welche in vitro nachgewiesen wurden. Um zu klären, ob durch eine L1-Antikörpertherapie auch eine Verlängerung des Überlebens erzielt wird, wurden zwei der bereits getesteten mAk (L1-9.3 und L1-11A), sowie ein weiterer mAk (L1-OV198.5) in einem SKOV3ip Modell eingesetzt. Im Gegensatz zu den publizierten Vorexperimenten von Arlt et al. (2006) führte weder die Behandlung mit L1-9.3 noch mit L1-11A zu einem signifikant verlängerten Überleben (Abb. 4.29). Knogler et al. (2007) testete erstmals L1-11A in anderem Zusammenhang im SKOV3ip-Mausmodell bezüglich einer längeren Lebenserwartung. Hier zeigte sich eine leichte Überlebensverlängerung, allerdings ohne signifikante Relevanz (Knogler et al., 2007). Im Gegensatz dazu resultierte die Behandlung mit L1-OV198.5 mAk in meinen eigenen Untersuchungen in eine signifikante Verlängerung des Überlebens der Mäuse (Abb. 4.29). Alle mAk (L1-9.3, L1-11A, L1-OV198.5) binden L1 mit ähnlichen Affinitäten (Abb. 4.17 und 4.18). Die Ursache der unterschiedlichen Wirkungsweise liegt daher anscheinend im konstanten Bereich des Antikörpers. Bei OV198.5 handelt es sich um einen Maus IgG2a Isotyp, während L1-11A und L1-9.3 einen Maus IgG1 Isotyp haben.

Nimmerjahn und Ravetch berichteten schon im Jahr 2005, dass die verschiedenen Isotypen große Unterschiede in ihrer Fähigkeit aufweisen, Immun-Effektor-Mechanismen zu aktivieren. IgG2a besitzt gegenüber IgG1 eine höhere Affinität zu aktivierenden Fc γ -Rezeptoren (insbesondere Fc γ RIV), und eine schwächere Affinität zu dem inhibierenden Rezeptor (Fc γ RIIb) (Nimmerjahn et al., 2005; Nimmerjahn und Ravetch, 2005). IgG1 zeigt eine höhere Affinität zum inhibitorischen Fc γ -Rezeptor und zu Fc γ RIII, aber eine geringere Affinität zu Fc γ RIV. Fc γ -Rezeptoren sind auf Effektorzellen, insbesondere Mastzelle, Makrophagen und Neutrophilen vorhanden (Nimmerjahn und Ravetch, 2006). Die Aktivierung dieser Zellen wird durch simultane Expression von aktivierenden (ITAM) und inhibierenden (ITIM) Fc γ -Rezeptoren kontrolliert (Ravetch und Lanier, 2000). Inflammatorische Faktoren können die Expression dieser Rezeptoren beeinflussen und somit das Verhältnis auf der Zelloberfläche verändern (Nimmerjahn und Ravetch, 2005). Durch die stärkere Bindungsaffinität von IgG1 zu Fc γ RIIb und die schwächere Bindungsaffinität zu Fc γ RIII kommt es in der Effektorzelle eher zu einer Inhibition. Die ermittelte A/I-Ratio (Verhältnis der Affinität zu aktivierende Rezeptoren zur

Affinität zu inhibierende Rezeptoren) ist kleiner 1. IgG2a hingegen besitzt eine starke Affinität zu FcγRIV und eine schwächere Affinität zu FcγRIIb, wodurch es insgesamt zu einer Aktivierung der Effektorzelle kommt (A/I-Ratio >70) (Nimmerjahn et al., 2005). Die aktivierte Effektorzelle kann dann die Lyse oder Phagozytose der Tumorzelle einleiten. In einem Metastasierungsmodell einer Melanom-Zelllinie in der murinen Lunge zeigt nur die IgG2a Isotypvariante des Antikörpers gegen ein Melanom-Oberflächenantigen eine signifikante Reduktion von Tumorzellen in der Lunge. Die IgG1, IgG2b und IgG3 Isotypen des Antikörpers wiesen keine Anti-Tumoraktivität auf (Nimmerjahn und Ravetch, 2005).

Die Analyse der verschiedenen murinen Isotypen des L1-9.3 Antikörpers zeigt eine signifikante Verlängerung des Überlebens der tumortragenden Mäuse mit dem IgG2a Isotyp. IgG2b oder IgG1 zeigen keine Effekte (Abb. 4.32). Somit scheint der Einfluss des Fc-Teils der mAk größer zu sein als die direkten Effekte des Antikörpers. Die Bedeutung des Fc-Teils wird aber nicht nur innerhalb der Überlebensexperimente deutlich, sondern auch in der Analyse der Tumorreduktion. In mehreren Experimenten führt die Behandlung mit allen Isotypen zwar zu einer Reduktion des Tumors und der Aszitesproduktion, eine signifikante Reduktion wird aber nur mit der IgG2a Variante erreicht (Abb. 4.33 - 4.42). Studien zu antikörperbasierten Therapien zeigen, dass gute Therapieerfolge hauptsächlich durch Interaktionen des Fc-Teils hervorgerufen werden (Nimmerjahn und Ravetch, 2007). Die Bindung des Antikörpers über den F(ab)₂ an das Antigen auf der Tumorzelle ist hierfür Voraussetzung, löst aber in den wenigsten Fällen eine ausreichende Anti-Tumor-Wirkung aus. So fördert die Behandlung mit Rituximab in vivo neben ADCC und CDC auch Apoptose und eine Inhibition der Proliferation (Shan et al., 1998; Shan et al., 2000). Untersuchungen zeigen aber, dass nach Ausschalten der aktivierenden Fc-Rezeptoren die tumorreduzierende Wirkung aufgehoben wird (Clynes et al., 2000).

5.2.2 Mechanismen der Tumor-reduzierenden Funktion von IgG2a-Antikörpern

Über den konstanten Fc-Teil können gebundene Ak verschiedene Effektorzellen rekrutieren, welche dann über ihre Fc-Rezeptoren den Immunkomplex binden. Dadurch kommt es zur Aktivierung der Effektorzelle und je nach Zelltyp zur Phagozytose oder Lyse der Tumorzelle (Steplewski et al., 1983). Dabei interagieren IgG2a-Antikörper insbesondere mit Makrophagen (Steplewski et al., 1983). Daneben kann über den konstanten Teil das Komplementsystem aktiviert werden, welches als Folge die Tumorzelle lysiert. (Gorter und Meri, 1999).

Der Vergleich von HE-gefärbten Tumorgewebe nach L1-9.3/IgG2a Antikörpertherapie zeigt einen deutlichen Anstieg von inflammatorischen Zellen im Tumorgewebe im Vergleich zur

Isotypkontrolle (Abb. 4.43) oder zur L1-9.3/IgG1 Behandlung (Daten nicht gezeigt). Des Weiteren zeigen sich große Bereiche mit nekrotischem Gewebe. Die Therapie mit L1/IgG2a-Antikörpern resultierte zudem in einer Anreicherung von Makrophagen im Tumorgewebe (Abb. 4.44).

Zu den Effektorzellen, welche ADCC auslösen können, gehören Makrophagen, Granulozyten und NK-Zellen. Sie tragen auf Ihrer Oberfläche Fc-Rezeptoren, mit denen sie indirekt über den gebundenen Ak die Tumorzelle erkennen und abtöten können. Murine Makrophagen exprimieren alle vier Fc γ -Rezeptoren, wobei zur Aktivierung von ADCC insbesondere der aktivierende Fc γ RIII und der hoch affine Fc γ RIV Rezeptor beitragen. NK-Zellen besitzen den murinen Fc γ RIII-Rezeptor, aber keinen inhibierenden Rezeptor.

Durch die Behandlung mit den L1/IgG2a-Antikörpern ist der Effekt der NK-Zellen limitiert, da diese nur den weniger affinen Fc γ RIII tragen. Viel wahrscheinlicher ist es, dass die rekrutierten Makrophagen über die beiden Rezeptoren Fc γ RIII und Fc γ RIV zur Tumorzell-Eliminierung beitragen. Verschiedene Publikationen zeigten, dass die Erfolge eine Antikörperbehandlung von der Interaktion von Makrophagen und Fc-Rezeptoren abhängen, wohingegen NK-Zellen oder Granulozyten keine Rolle spielen (Oflazoglu et al., 2009; Oflazoglu et al., 2007). In beiden Publikationen wurde die Wirkung eines CD30 bzw. CD40 Antikörpers in vivo im Maus-Xenograft-Modell getestet. Nach selektiver Depletion der verschiedenen Effektorzelltypen zeigten nur Makrophagen einen Einfluss auf das Überleben. Interessant wäre es, in diesem Zusammenhang den Einfluss der NK-Zellen in der L1-Antikörper-vermittelten Therapie zu untersuchen. Über eine Gr1-Färbung konnte keine Erhöhung der Granulozyteninfiltration nach Antikörperbehandlung detektiert werden. Ob aber eine Anreicherung von NK-Zellen auftritt, wurde in dieser Arbeit nicht analysiert.

Nach L1/IgG2a-Antikörperbehandlung sind vermehrt Makrophagen im Tumor vorhanden. Um den Einfluss der Makrophageninfiltration auf die Tumorthherapie zu untersuchen, wurden diese selektiv mit Clodronat depletiert. Dabei wurde deutlich, dass eine Eliminierung der Makrophagen in der Maus-Peripherie die Therapieeffekte nach L1-9.3/IgG2a-Behandlung aufhebt (Abb. 4.48). Trotz der Injektion von L1-9.3/IgG2a konnte das Tumorstadium nicht gehemmt werden. Somit scheint eine Interaktion zwischen Antikörper und Makrophagen für eine erfolgreiche Therapie essentiell zu sein. Interessanterweise war das Tumorstadium nach L1/IgG2a-Behandlung in den Makrophagen-depletierten Mäusen sogar größer als in den Isotyp-behandelten Mäusen. Auffällig war auch, dass die Tumore in den Makrophagen-depletierten Mäusen insgesamt wesentlich kleiner waren, als bei der ursprünglichen Antikörper-Behandlung. Dieses Phänomen ist weitreichend bekannt. So lassen sich sogenannte

tumorassoziierte Makrophagen (TAM) durch eine Clodronatbehandlung in verschiedenen Tumoren im Mausmodell effektiv depletieren, was zur signifikanten Inhibition des Tumorwachstums führt (Zeisberger et al., 2006). Makrophagen spielen also nicht nur eine Rolle in der Tumorbekämpfung, sondern können andererseits auch das Wachstum des Tumors fördern. Diese tumorassoziierten Makrophagen begünstigen damit die Tumorprogression. TAM werden über Chemokine (u.a. CCL2, MCP-1, M-CSF, CSF-1, VEGF, CCL3, CCL4, CCL5, CCL8, MIP1 α , MIF) als Monozyten aus dem Blut zum Tumor rekrutiert (Coussens und Werb, 2002; Mantovani, 1994). Dort begünstigen sie das Tumorwachstum, sowie die Invasivität und das Migrationsverhalten der Tumorzellen, was die Metastasierung von Tumorzellen fördert. Von den Tumorzellen produzierte Wachstumsfaktoren (FGF, VEGF, TGF- β) und andere Monokine (IL-1, IL-6, IL-8, Thrombospondin (THBS1)), können die Makrophagen aktivieren und beeinflussen infolge dessen angiogenetische Prozesse (Ueno et al., 2000; White et al., 2001). Zusätzlich produzieren TAM Metalloproteasen (MMP), welche eine Mikrovaskularisierung des Tumors fördern (Pepper, 2001). Makrophagen lassen sich also je nach äußerem Stimuli in zwei Klassen einteilen (Balkwill et al., 2005). M1-Phänotypen fördern die Abtötung von Bakterien und Tumorzellen, präsentieren Antigene und produzieren immunstimulierende Zytokine. M2-Phänotypen hingegen fördern die Angiogenese und das Tumorwachstum, hemmen die T-Zell Proliferation und unterstützen den Wundheilungsprozess (Mantovani et al., 2002).

5.2.3 Einfluss der Antikörper auf das Tumor-Mikromillieu

Über den Einfluss einer L1-Antikörpertherapie auf die Genregulation wurde in unserer Arbeitsgruppe schon früher berichtet. So konnten Gast et al. (2008) einige differentiell regulierte Gene im Tumor nach L1-Antikörperbehandlung identifizieren. Verwendet wurden hierbei *in vitro* behandelte SKOV3ip Tumorzelllinien, sowie *in vivo* behandelte SKOV3ip Tumore im Maus-Xenograft-Modell. So beeinflusst eine L1-9.3/IgG1-Antikörperbehandlung die Expression von β 3-Integrin, CRABP II, IER3 und STK39. Eine Hemmung der L1 Expression mittels siRNA liefert vergleichbare Ergebnisse (Gast et al., 2008). *In vivo* zeigt eine Therapie mit der IgG1 Variante von L1-9.3 eine differentielle Regulation von IER3 und β 3-Integrin.

In dieser Dissertation konnte gezeigt werden, dass der Erfolg der L1-Antikörpertherapie insbesondere auch von rekrutierten Effektorzellen und somit auch vom Tumor-Mikromillieu abhängig ist. Um die Genregulation nach Antikörperbehandlung im Zusammenhang mit dem Tumor-Mikromillieu zu analysieren, wurde eine Analyse von humanen Genen nach Tumorthherapie im Maus-Xenograft-Modell durchgeführt. Der Human Sentrix-6 Chip (Illumina) trägt mehr als 48000 verschiedene Transkripte, Varianten und ESTs und wurde zur Analyse der RNA-Expression eingesetzt. 147 Gene wurden identifiziert, deren Expression die dreifache

Standardabweichung des Mittelwerts aller Proben des Genes übersteigt (Abb. 4.49 und 4.50). 133 dieser Gene konnten einem funktionellen Clustering unterzogen werden (Abb. 4.51).

Im Gegensatz zur Arbeit von Gast et al. (2007) konnte weder für IER3 noch für β 3-Integrin eine differentielle Regulation gefunden werden. Ursache könnte hier der Unterschied im eingesetzten Isotyp des L1 mAk sein. In der vorliegenden Arbeit zeigte die Therapie mit dem L1-9.3/IgG2a mAk insbesondere einen Einfluss auf die Signalwege der Apoptose wie auch der Angiogenese und der Chemotaxis. Einige beispielhafte Gene wurden in der RT-PCR verifiziert und zusätzlich in weiteren Tumoren nachgewiesen. Zu den differentiell regulierten Genen mit apoptotischer Funktion zählen u.a. IL-6, TRAIL, DDIT4, ITGB2, APOE, ANGPTL4, TNF α und CXCR4. Gerade die Expression von proapoptischen Faktoren wie APOE, TRAIL und TNF α wird durch eine Antikörpertherapie in den Tumorzellen erhöht. Hingegen findet man nach Antikörperbehandlung eine verminderte Expression für DDIT4 und APP. DDIT4 wurde als proliferationsförderndes Gen identifiziert (Chang et al., 2009). APP unterstützt das Androgenabhängige Prostatakarzinom-Wachstum (Takayama et al., 2009). Zu den angiogenetischen Faktoren gehören TGM2, IL-8, ANGPTL4, CXCR4, APOLD1, HMOX1 und THBS1. Einige Gene mit chemotaktischer Funktion sind differentiell reguliert, dazu gehören CXCL1, IL-8, CXCR4, ITGB2.

5.3 Humanisierte Antikörper

Die Therapie mit dem murinen IgG2a L1-Antikörper erzielt Erfolge im Hinblick auf Überleben, Tumorreduktion und Aszitesproduktion im Maus-Xenograft-Modell. Problematisch könnte aber der Einsatz dieses Antikörpers im Patienten sein. Beim Einsatz muriner Ak kommt es im menschlichen Organismus zur Bildung von anti-Maus Antikörpern (HAMA), welche die Wirkung des therapeutischen Antikörpers aufheben. Diese HAMA-Reaktionen sind weitläufig bekannt. In einer zusammenfassenden Analyse von Studien über 44 murine therapeutische mAk konnte in 84% der behandelten Patienten eine starke anti-Maus Antikörperreaktion nachgewiesen werden (Hwang und Foote, 2005). Diese immunogenen Reaktionen können durch Generierung eines chimärisierten/humanisierten Antikörpers vermieden werden (Hwang und Foote, 2005).

Zur Produktion des chimärisierten Antikörpers wurde durch homologe Rekombination der Fc-Teil in der Maushybridom-Zelllinie durch einen humanen IgG1-Teil ersetzt. Ein humanisierter mAk wurde in CHO-DG44 Zellen hergestellt. Hierfür wurden im L1-9.3 mAk die Sequenzen des variablen Teil so umgewandelt, das nur noch die CDRs murine Anteile besitzen. Alle anderen Sequenzen sowie der konstante Teil bestehen aus humanen Sequenzen. Nach Klonierung konnte das Plasmid in CHO-DG44 Zellen transfiziert werden.

Eine Humanisierung bzw. Chimärisierung des L1-9.3 Antikörpers hatte keinerlei Einbußen in der Bindungsfähigkeit mittels Durchflusszytometrie oder in der Analyse der Bindungskonstante zur Folge (Abb. 4.53). Beide mAk wurden zudem erfolgreich in Tumorwachstums-Experimenten im SKOV3ip Maus-Xenograft-Modell eingesetzt. Die Therapie resultiert in einer signifikanten Reduktion des Tumorwachstums in vivo nach Anwendung der Antikörper (Abb. 4.54). Bei beiden mAk handelt es sich um humane IgG1 Isotyp-Varianten. Ein humaner IgG1 Isotyp entspricht bezogen auf seine Aktivität dem murinen IgG2a-Antikörper (Nimmerjahn und Ravetch, 2006). Er zeigt eine hohe Affinität zu aktivierenden Fc γ RI, welche auf Monozyten/Makrophagen exprimiert werden und eine mittlere Affinität zu Fc γ RIIIa, welche vorwiegend auf NK-Zellen aber auch auf Monozyten vorhanden sind. In der Maus entspricht dies der Affinität von IgG2a zu Fc γ RIV und Fc γ RIII.

Die Behandlung mit dem L1 mAk des IgG2a Isotyps resultiert in einer Anreicherung von Makrophagen im Tumorgewebe. Die Interaktion von Makrophagen mit dem Ak führt dabei in vivo zur Tumorreduktion. Ein direkter Nachweis einer möglichen ADCC-Funktion als Wirkprinzip konnte in vitro nicht erbracht werden. Getestet wurden sowohl aus der Milz isolierte murine NK-Zellen, als auch aus dem Peritoneum (PEC peritoneal eudate cells) und dem Knochenmark isolierte murine Makrophagen. Keiner der isolierten Zellpopulationen konnte zur antikörperabhängigen Zellyse aktiviert werden (Daten nicht gezeigt). Es ist unwahrscheinlich, mit Maus-Effektorzellen eine ausreichende Aktivität für eine ADCC-Analyse zu erhalten. Diese Problematik ist weitläufig bekannt.

Daher wurden zur Analyse der ADCC-Effekte humane PBMC verwendet. Untersucht wurden dabei die humanisierten mAk ChiL1-9.3 und HuL1-9.3. Die ADCC-Analyse erbrachte jedoch für keinen der beiden mAk eine spezifische Lyse mit den verwendeten humanen PBMCs. Der als Positivkontrolle eingesetzte Herceptin® mAk hingegen zeigt eine konzentrationsabhängige spezifische Lyse von über 40%. ChiL1-9.3 wurde in Maus-Hybridomzellen generiert, HuL1-9.3 in CHO-DG44 Zellen. Herceptin® ist ein von Roche bezogener Antikörper, welcher in modifizierten CHO Zellen produziert wurde. Die Vermutung liegt daher nahe, dass das Expressionssystem der Antikörper einen Einfluss auf die ADCC-Funktion hat. Die Firma Celltrion Biopharmaceutical Plant (Incheon, South Korea) entwickelte ein neues Zellsystem zur Verbesserung der ADCC-Funktion von mAk. Sie konstruierte eine neue humane Zelllinie F2N, welche eine Fusion aus 293 Zellen und Namalwa Zellen darstellt. Die Produktion des HuL1-9.3 mAk in dieser Hybridomzelle resultierte in einem modifizierten mAk (HuL1-9.3/F2N), welcher in vitro eine konzentrationsabhängige spezifische Lyse von L1-positiven Zellen bewirkt (Abb. 4.60).

5.4 Die Rolle der Glykosylierung am mAk

Die Wirkung der ADCC-Effekte hängt von der Interaktion der Fc γ -Rezeptoren mit dem Fc-Teil des mAk ab. Diese Bindung kann durch verschiedene Faktoren beeinflusst werden. Insbesondere spielt die Glykosylierung am Asn-297 eine große Rolle. Antikörper gleicher Klassen können durch ihre Glykosylierungsstruktur in ihrer Affinität und somit ihrer Lysefähigkeit variieren (Arnold et al., 2007). So zeigt ein afukosylierter Ak eine 10-mal höhere Bindung an humane Fc γ RIIIa und an Maus Fc γ RVI, welches zu einer erhöhten Antikörper-Aktivität in vivo führt (Nimmerjahn und Ravetch, 2005; Shields et al., 2002; Shinkawa et al., 2003). Im Gegensatz dazu weisen Ak mit endständiger Sialinsäure am Glykan eine geringere Affinität zu Fc γ R auf und haben somit eine geringere ADCC-Fähigkeit in vivo (Kaneko et al., 2006). Die N-Glykosylierung von mAk kann aus unterschiedlichen Oligosacchariden bestehen. Polyklonale humane IgG-Fc im Serum besitzen ein zentrales Heptasaccharid mit variierenden zusätzlichen Zuckerresten, wodurch mehr als 30 verschiedene Oligosaccharide gebildet werden können (Jefferis, 2005). Die am häufigsten vertretenen Glykane besitzen eine fukosylierte zentrale Struktur mit zusätzlich möglichen Galaktose- und Sialinsäureresten (G0F, G1F, G2F) (Abb. 5.3) (Raju, 2008). In CHO Zellen produzierte therapeutische mAk weisen hauptsächlich die G0F oder die G1F Struktur auf. Häufig kommt es aber auch unter nicht optimalen Bedingungen zur Bildung von abnormalen Glykosylierungsstrukturen, welche weniger leistungsfähig sind oder aber immunogen wirken (Jefferis, 2005). In der vorliegenden Arbeit wurde zur Analyse vorhandener Zuckerstrukturen ein Lektin-ELISA durchgeführt. Dabei zeigten sich Unterschiede in der Glykosylierung zwischen Herceptin[®] und den drei humanisierten L1 mAk ChiL1-9.3, HuL1-9.3/F2N und HuL1-9.3. Herceptin[®] besitzt wie auch HuL1-9.3/F2N keine Galaktose am Glykan. Zusätzlich konnte im Herceptin[®] mAk auch keine Fukose nachgewiesen werden. ChiL1-9.3 und HuL1-9.3 besitzen Fukose- und Galaktosestrukturen. Zusätzlich weist ChiL1-9.3 noch Sialinsäurereste auf, welche bei den anderen mAk fehlen. Somit besitzt Herceptin[®] vermutlich vorrangig die G0-Struktur und HuL1-9.3/F2N eine G0F-Struktur. Dagegen weist HuL1-9.3 eine G1F-Struktur und ChiL1-9.3 eine G2F Struktur auf.

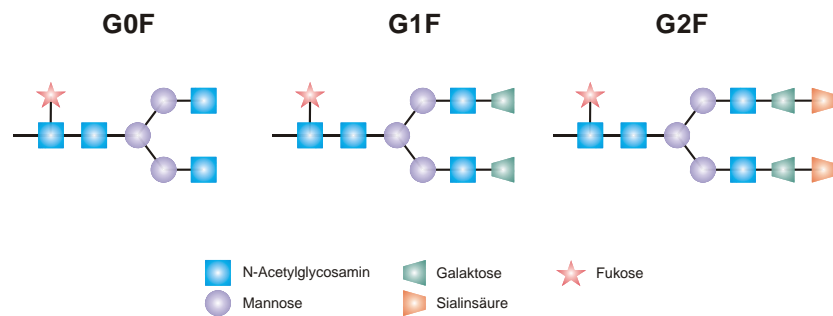


Abbildung 5.3: Beispiele für mögliche N-Glykanstrukturen am IgG-Fc. Dargestellt sind die fukosylierten Glykosylierungsstrukturen. G0F besteht aus dem reinen Heptasaccharid. G1F besitzt zusätzlich endständige Galaktose und G2F darüber hinaus endständige Sialinsäure.

Stadlmann und Kollegen untersuchten 2008 die Glykosylierungsstruktur verschiedener in CHO Zellen produzierter mAk (Stadlmann et al., 2008). Demnach besitzt Trastuzumab (Herceptin®) ein einfaches Glykanprofil. Es besteht aus fukosyliertem neutralem Glykan und zeigt keine Sialysierung und nur wenig Galaktosylierung. Die Analyse stimmt mit der in meiner Arbeit ermittelten Struktur der Herceptin®-Glykosylierung weitgehend überein. Unterschiede ergeben sich allerdings bezüglich der Fucoseanteile. In der vorliegenden Arbeit konnte über den Lektin-ELISA keine Fucose detektiert werden. Daher sollte die Untersuchung mit einer genaueren Methode, z.B. Maldi-TOF Analyse, wiederholt werden. Herceptin® besitzt wie auch HuL1-9.3/F2N eine G0(F) Struktur. Nur diese beiden mAk sind in der Lage eine konzentrationsabhängige Lyse in L1 positiven Zellen auszulösen. mAk mit G1F- (HuL1-9.3) oder G2F- (ChiL1-9.3) Glykanen fehlt diese Fähigkeit. Somit scheint eine Agalaktosylierung von Glykanen am mAk einen positiven Einfluss auf die ADCC-Funktion zu haben. In einer Publikation von Nimmerjahn und Kollegen (2007) konnte durch Abwesenheit von Galaktose nur ein geringer Einfluss auf die Bindungsaffinitäten der mAk zu den verschiedenen Fc-Rezeptoren nachgewiesen werden, welcher zu einer leicht verbesserten A/I-Ratio führte (Nimmerjahn et al., 2007). Jedoch wurde in dieser Studie nur die weniger aktiven murinen Isotypen IgG1 und IgG2b untersucht. Interessant wäre in diesem Zusammenhang eine Analyse von murinen IgG2a bzw. humanen IgG1 mAk.

5.5 Ausblick

Die Antikörpertherapie stellt im onkologischen Bereich eine bedeutende Entwicklung mit hohem Potential zur gezielten Bekämpfung von Tumorzellen dar. L1 als tumorassoziiertes Antigen besitzt dabei eine potentielle Bedeutung als Ziel-Antigen.

In dieser Arbeit konnten verschiedene mAk gegen L1 hergestellt werden. Die mAk richten sich dabei gegen verschiedenste Epitope im L1-Molekül. Einige mAk konnten die homophile L1-Bindung blockieren. Im SKOV3ip Maus-Xenograft-Modell zeigten einzelne mAk eine Tumor-

und Aszitesreduktion in vivo. Insbesondere die murine IgG2a Variante besitzt dabei nicht nur tumor-reduzierende Potential, sondern konnte auch das Überleben der Mäuse verlängern. Die Anti-Tumor-Wirkung beruht dabei hauptsächlich auf der Interaktion mit rekrutierten Makrophagen. Über die Genexpressionsanalyse wurde ein Zusammenhang der Therapie mit apoptotischen, anti-angiogenetischen und chemotaktischen Funktionen nachgewiesen.

Nach Chimärisierung bzw. Humanisierung des L1-9.3 Antikörpers konnten die biologischen Funktionen des Antikörpers beibehalten werden, so dass auch mit diesen Varianten eine tumorreduzierende Wirkung in vivo hervorgerufen wurde. Durch Modifikationen im Expressionssystem der Antikörper war es möglich, einen humanisierten mAk herzustellen, der die ADCC-Funktion unterstützt. Diese verbesserte zytotoxische Wirkung des Antikörpers birgt das Potential zu einer effektiveren Therapie, bei der die Menge des eingesetzten Antikörpers weiter reduziert werden könnte. Neben der unkonjugierten Form könnte der mAk aber auch als eine Toxin-konjugierte Variante in der Therapie eingesetzt werden. Einige Studien berichteten schon über die Erfolge eines radioaktiv markierten L1 mAk in der Behandlung von Neuroblastomen. Abgesehen von der Anwendung im Ovariakarzinom könnten daher auch weitere L1 exprimierende Karzinome zur Behandlung in Betracht gezogen werden. Die Voraussetzung einer L1 Expression auf dem Tumorgewebe ist dabei in vielen Fällen gegeben.

6. LITERATURVERZEICHNIS

- Adams, G.P., Shaller, C.C., Dadachova, E., Simmons, H.H., Horak, E.M., Tesfaye, A., Klein-Szanto, A.J., Marks, J.D., Brechbiel, M.W., und Weiner, L.M. (2004). A single treatment of yttrium-90-labeled CHX-A"-C6.5 diabody inhibits the growth of established human tumor xenografts in immunodeficient mice. *Cancer Res.* 64:6200-6.
- Allory, Y., Matsuoka, Y., Bazille, C., Christensen, E.I., Ronco, P., und Debiec, H. (2005). The L1 cell adhesion molecule is induced in renal cancer cells and correlates with metastasis in clear cell carcinomas. *Clin Cancer Res.* 11:1190-7.
- Amstutz, H., Rytz, C., Novak-Hofer, I., Spycher, M., Schubiger, P.A., Blaser, K., und Morgenthaler, J.J. (1993). Production and characterization of a mouse/human chimeric antibody directed against human neuroblastoma. *Int J Cancer.* 53:147-52.
- Anderson, P., Louie, J., Lau, A., und Broder, M. (2005). Mechanisms of differential immunogenicity of tumor necrosis factor inhibitors. *Curr Rheumatol Rep.* 7:3-9.
- Arlt, M.J., Novak-Hofer, I., Gast, D., Gschwend, V., Moldenhauer, G., Grunberg, J., Honer, M., Schubiger, P.A., Altevogt, P., und Kruger, A. (2006). Efficient inhibition of intra-peritoneal tumor growth and dissemination of human ovarian carcinoma cells in nude mice by anti-L1-cell adhesion molecule monoclonal antibody treatment. *Cancer Res.* 66:936-43.
- Arnold, J.N., Wormald, M.R., Sim, R.B., Rudd, P.M., und Dwek, R.A. (2007). The impact of glycosylation on the biological function and structure of human immunoglobulins. *Annu Rev Immunol.* 25:21-50.
- Balaian, L.B., Moehler, T., und Montgomery, A.M. (2000). The human neural cell adhesion molecule L1 functions as a costimulatory molecule in T cell activation. *Eur J Immunol.* 30:938-43.
- Balkwill, F., Charles, K.A., und Mantovani, A. (2005). Smoldering and polarized inflammation in the initiation and promotion of malignant disease. *Cancer Cell.* 7:211-7.
- Bao, S., Wu, Q., Li, Z., Sathornsumetee, S., Wang, H., McLendon, R.E., Hjelmeland, A.B., und Rich, J.N. (2008). Targeting cancer stem cells through L1CAM suppresses glioma growth. *Cancer Res.* 68:6043-8.
- Barbas, C.F., 3rd, Kang, A.S., Lerner, R.A., und Benkovic, S.J. (1991). Assembly of combinatorial antibody libraries on phage surfaces: the gene III site. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 88:7978-82.
- Barnes, N., Gavin, A.L., Tan, P.S., Mottram, P., Koentgen, F., und Hogarth, P.M. (2002). FcgammaRI-deficient mice show multiple alterations to inflammatory and immune responses. *Immunity.* 16:379-89.
- Bell, D.A. (2005). Origins and molecular pathology of ovarian cancer. *Mod Pathol.* 18 Suppl 2:S19-32.
- Berek, J.S., Trope, C., und Vergote, I. (1999). Surgery during chemotherapy and at relapse of ovarian cancer. *Ann Oncol.* 10 Suppl 1:3-7.
- Bergtold, A., Desai, D.D., Gavhane, A., und Clynes, R. (2005). Cell surface recycling of internalized antigen permits dendritic cell priming of B cells. *Immunity.* 23:503-14.
- Bevaart, L., Jansen, M.J., van Vugt, M.J., Verbeek, J.S., van de Winkel, J.G., und Leusen, J.H. (2006). The high-affinity IgG receptor, FcgammaRI, plays a central role in antibody therapy of experimental melanoma. *Cancer Res.* 66:1261-4.

- Bidros, D.S., und Vogelbaum, M.A. (2009). Novel drug delivery strategies in neuro-oncology. *Neurotherapeutics*. 6:539-46.
- Bieber, A.J., Snow, P.M., Hortsch, M., Patel, N.H., Jacobs, J.R., Traquina, Z.R., Schilling, J., und Goodman, C.S. (1989). Drosophila neuroglian: a member of the immunoglobulin superfamily with extensive homology to the vertebrate neural adhesion molecule L1. *Cell*. 59:447-60.
- Blaess, S., Kammerer, R.A., und Hall, H. (1998). Structural analysis of the sixth immunoglobulin-like domain of mouse neural cell adhesion molecule L1 and its interactions with alpha(v)beta3, alpha(IIb)beta3, and alpha5beta1 integrins. *J Neurochem*. 71:2615-25.
- Boo, Y.J., Park, J.M., Kim, J., Chae, Y.S., Min, B.W., Um, J.W., und Moon, H.Y. (2007). L1 expression as a marker for poor prognosis, tumor progression, and short survival in patients with colorectal cancer. *Ann Surg Oncol*. 14:1703-11.
- Boruchov, A.M., Heller, G., Veri, M.C., Bonvini, E., Ravetch, J.V., und Young, J.W. (2005). Activating and inhibitory IgG Fc receptors on human DCs mediate opposing functions. *J Clin Invest*. 115:2914-23.
- Boyd, P.N., Lines, A.C., und Patel, A.K. (1995). The effect of the removal of sialic acid, galactose and total carbohydrate on the functional activity of Campath-1H. *Mol Immunol*. 32:1311-8.
- Breitling, F., Dubel, S., Seehaus, T., Klewinghaus, I., und Little, M. (1991). A surface expression vector for antibody screening. *Gene*. 104:147-53.
- Brightman, M.W. (1977). Morphology of blood-brain interfaces. *Exp Eye Res*. 25 Suppl:1-25.
- Bross, P.F., Beitz, J., Chen, G., Chen, X.H., Duffy, E., Kieffer, L., Roy, S., Sridhara, R., Rahman, A., Williams, G., et al. (2001). Approval summary: gemtuzumab ozogamicin in relapsed acute myeloid leukemia. *Clin Cancer Res*. 7:1490-6.
- Brouwers, A., Mulders, P., Oosterwijk, E., Buijs, W., Corstens, F., Boerman, O., und Oyen, W. (2004). Pharmacokinetics and tumor targeting of 131I-labeled F(ab')₂ fragments of the chimeric monoclonal antibody G250: preclinical and clinical pilot studies. *Cancer Biother Radiopharm*. 19:466-77.
- Brummendorf, T., Hubert, M., Treubert, U., Leuschner, R., Tarnok, A., und Rathjen, F.G. (1993). The axonal recognition molecule F11 is a multifunctional protein: specific domains mediate interactions with Ng-CAM and restrictin. *Neuron*. 10:711-27.
- Brummendorf, T., Kenwrick, S., und Rathjen, F.G. (1998). Neural cell recognition molecule L1: from cell biology to human hereditary brain malformations. *Curr Opin Neurobiol*. 8:87-97.
- Brummendorf, T., und Rathjen, F.G. (1995). Cell adhesion molecules 1: immunoglobulin superfamily. *Protein Profile*. 2:963-1108.
- Brummendorf, T., und Rathjen, F.G. (1996). Structure/function relationships of axon-associated adhesion receptors of the immunoglobulin superfamily. *Curr Opin Neurobiol*. 6:584-93.
- Buhusi, M., Midkiff, B.R., Gates, A.M., Richter, M., Schachner, M., und Maness, P.F. (2003). Close homolog of L1 is an enhancer of integrin-mediated cell migration. *J Biol Chem*. 278:25024-31.
- Burger, R.A., Sill, M.W., Monk, B.J., Greer, B.E., und Sorosky, J.I. (2007). Phase II trial of bevacizumab in persistent or recurrent epithelial ovarian cancer or primary peritoneal cancer: a Gynecologic Oncology Group Study. *J Clin Oncol*. 25:5165-71.

- Burvenich, I.J., Schoonooghe, S., Blanckaert, P., Bacher, K., Vervoort, L., Coene, E., Mertens, N., De Vos, F., und Slegers, G. (2007). Biodistribution and planar gamma camera imaging of (123)I- and (131)I-labeled F(ab')(2) and Fab fragments of monoclonal antibody 14C5 in nude mice bearing an A549 lung tumor. *Nucl Med Biol.* 34:257-65.
- Carter, P. (2001). Improving the efficacy of antibody-based cancer therapies. *Nat Rev Cancer.* 1:118-29.
- Castellani, V. (2002). The function of neuropilin/L1 complex. *Adv Exp Med Biol.* 515:91-102.
- Castellani, V., Chedotal, A., Schachner, M., Faivre-Sarrailh, C., und Rougon, G. (2000). Analysis of the L1-deficient mouse phenotype reveals cross-talk between Sema3A and L1 signaling pathways in axonal guidance. *Neuron.* 27:237-49.
- Castellani, V., De Angelis, E., Kenwrick, S., und Rougon, G. (2002). Cis and trans interactions of L1 with neuropilin-1 control axonal responses to semaphorin 3A. *EMBO J.* 21:6348-57.
- Castellani, V., Falk, J., und Rougon, G. (2004). Semaphorin3A-induced receptor endocytosis during axon guidance responses is mediated by L1 CAM. *Mol Cell Neurosci.* 26:89-100.
- Cavalieri, D., Dolara, P., Mini, E., Luceri, C., Castagnini, C., Toti, S., Maciag, K., De Filippo, C., Nobili, S., Morganti, M., et al. (2007). Analysis of gene expression profiles reveals novel correlations with the clinical course of colorectal cancer. *Oncol Res.* 16:535-48.
- Chang, B., Liu, G., Yang, G., Mercado-Uribe, I., Huang, M., und Liu, J. (2009). REDD1 is required for RAS-mediated transformation of human ovarian epithelial cells. *Cell Cycle.* 8:780-6.
- Chang, S., Rathjen, F.G., und Raper, J.A. (1987). Extension of neurites on axons is impaired by antibodies against specific neural cell surface glycoproteins. *J Cell Biol.* 104:355-62.
- Chen, S., Mantei, N., Dong, L., und Schachner, M. (1999). Prevention of neuronal cell death by neural adhesion molecules L1 and CHL1. *J Neurobiol.* 38:428-39.
- Cheng, L., Lemmon, S., und Lemmon, V. (2005). RanBPM is an L1-interacting protein that regulates L1-mediated mitogen-activated protein kinase activation. *J Neurochem.* 94:1102-10.
- Cho, K.R., und Shih Ie, M. (2009). Ovarian cancer. *Annu Rev Pathol.* 4:287-313.
- Claassen, I., Van Rooijen, N., und Claassen, E. (1990). A new method for removal of mononuclear phagocytes from heterogeneous cell populations in vitro, using the liposome-mediated macrophage 'suicide' technique. *J Immunol Methods.* 134:153-61.
- Clynes, R.A., Towers, T.L., Presta, L.G., und Ravetch, J.V. (2000). Inhibitory Fc receptors modulate in vivo cytotoxicity against tumor targets. *Nat Med.* 6:443-6.
- Codony-Servat, J., Albanell, J., Lopez-Talavera, J.C., Arribas, J., und Baselga, J. (1999). Cleavage of the HER2 ectodomain is a pervanadate-activable process that is inhibited by the tissue inhibitor of metalloproteases-1 in breast cancer cells. *Cancer Res.* 59:1196-201.
- Colombo, N., Van Gorp, T., Parma, G., Amant, F., Gatta, G., Sessa, C., und Vergote, I. (2006). Ovarian cancer. *Crit Rev Oncol Hematol.* 60:159-79.
- Coussens, L.M., und Werb, Z. (2002). Inflammation and cancer. *Nature.* 420:860-7.
- Coutelle, O., Nyakatura, G., Taudien, S., Elgar, G., Brenner, S., Platzer, M., Drescher, B., Jouet, M., Kenwrick, S., und Rosenthal, A. (1998). The neural cell adhesion molecule L1: genomic organisation and differential splicing is conserved between man and the pufferfish *Fugu*. *Gene.* 208:7-15.

- Daponte, A., Kostopoulou, E., Kollia, P., Papamichali, R., Vanakara, P., Hadjichristodoulou, C., Nakou, M., Samara, S., Koukoulis, G., und Messinis, I.E. (2008). L1 (CAM) (CD171) in ovarian serous neoplasms. *Eur J Gynaecol Oncol.* 29:26-30.
- Darash-Yahana, M., Pikarsky, E., Abramovitch, R., Zeira, E., Pal, B., Karplus, R., Beider, K., Avniel, S., Kasem, S., Galun, E., et al. (2004). Role of high expression levels of CXCR4 in tumor growth, vascularization, and metastasis. *FASEB J.* 18:1240-2.
- Davies, J., Jiang, L., Pan, L.Z., LaBarre, M.J., Anderson, D., und Reff, M. (2001). Expression of GnTIII in a recombinant anti-CD20 CHO production cell line: Expression of antibodies with altered glycoforms leads to an increase in ADCC through higher affinity for FC gamma RIII. *Biotechnol Bioeng.* 74:288-94.
- Davies, S.R., Watkins, G., Mansel, R.E., und Jiang, W.G. (2007). Differential expression and prognostic implications of the CCN family members WISP-1, WISP-2, and WISP-3 in human breast cancer. *Ann Surg Oncol.* 14:1909-18.
- Davis, J.Q., und Bennett, V. (1994). Ankyrin binding activity shared by the neurofascin/L1/NrCAM family of nervous system cell adhesion molecules. *J Biol Chem.* 269:27163-6.
- Davis, T.A., Kaminski, M.S., Leonard, J.P., Hsu, F.J., Wilkinson, M., Zelenetz, A., Wahl, R.L., Kroll, S., Coleman, M., Goris, M., et al. (2004). The radioisotope contributes significantly to the activity of radioimmunotherapy. *Clin Cancer Res.* 10:7792-8.
- De Angelis, E., MacFarlane, J., Du, J.S., Yeo, G., Hicks, R., Rathjen, F.G., Kenwrick, S., und Brummendorf, T. (1999). Pathological missense mutations of neural cell adhesion molecule L1 affect homophilic and heterophilic binding activities. *EMBO J.* 18:4744-53.
- De Angelis, E., Watkins, A., Schafer, M., Brummendorf, T., und Kenwrick, S. (2002). Disease-associated mutations in L1 CAM interfere with ligand interactions and cell-surface expression. *Hum Mol Genet.* 11:1-12.
- Debatin, K.M., und Krammer, P.H. (1995). Resistance to APO-1 (CD95) induced apoptosis in T-ALL is determined by a BCL-2 independent anti-apoptotic program. *Leukemia.* 9:815-20.
- Debiec, H., Christensen, E.I., und Ronco, P.M. (1998). The cell adhesion molecule L1 is developmentally regulated in the renal epithelium and is involved in kidney branching morphogenesis. *J Cell Biol.* 143:2067-79.
- Deleamarre, F.G., Kors, N., und van Rooijen, N. (1990). Elimination of spleen and of lymph node macrophages and its difference in the effect on the immune response to particulate antigens. *Immunobiology.* 182:70-8.
- Di Sciuillo, G., Donahue, T., Schachner, M., und Bogen, S.A. (1998). L1 antibodies block lymph node fibroblastic reticular matrix remodeling in vivo. *J Exp Med.* 187:1953-63.
- Dihne, M., Bernreuther, C., Sibbe, M., Paulus, W., und Schachner, M. (2003). A new role for the cell adhesion molecule L1 in neural precursor cell proliferation, differentiation, and transmitter-specific subtype generation. *J Neurosci.* 23:6638-50.
- Djabali, M., Mattei, M.G., Nguyen, C., Roux, D., Demengeot, J., Denizot, F., Moos, M., Schachner, M., Goridis, C., und Jordan, B.R. (1990). The gene encoding L1, a neural adhesion molecule of the immunoglobulin family, is located on the X chromosome in mouse and man. *Genomics.* 7:587-93.
- Doherty, P., Williams, E., und Walsh, F.S. (1995). A soluble chimeric form of the L1 glycoprotein stimulates neurite outgrowth. *Neuron.* 14:57-66.

- Drake, A.W., Myszka, D.G., und Klakamp, S.L. (2004). Characterizing high-affinity antigen/antibody complexes by kinetic- and equilibrium-based methods. *Anal Biochem.* 328:35-43.
- Ebeling, O., Duczmal, A., Aigner, S., Geiger, C., Schollhammer, S., Kemshead, J.T., Moller, P., Schwartz-Albiez, R., und Altevogt, P. (1996). L1 adhesion molecule on human lymphocytes and monocytes: expression and involvement in binding to alpha v beta 3 integrin. *Eur J Immunol.* 26:2508-16.
- Euer, N.I., Kaul, S., Deissler, H., Mobus, V.J., Zeillinger, R., und Weidle, U.H. (2005). Identification of L1CAM, Jagged2 and Neuromedin U as ovarian cancer-associated antigens. *Oncol Rep.* 13:375-87.
- Fan, H., und Derynck, R. (1999). Ectodomain shedding of TGF-alpha and other transmembrane proteins is induced by receptor tyrosine kinase activation and MAP kinase signaling cascades. *EMBO J.* 18:6962-72.
- Feeley, K.M., und Wells, M. (2001). Precursor lesions of ovarian epithelial malignancy. *Histopathology.* 38:87-95.
- Felding-Habermann, B., Silletti, S., Mei, F., Siu, C.H., Yip, P.M., Brooks, P.C., Cheresch, D.A., O'Toole, T.E., Ginsberg, M.H., und Montgomery, A.M. (1997). A single immunoglobulin-like domain of the human neural cell adhesion molecule L1 supports adhesion by multiple vascular and platelet integrins. *J Cell Biol.* 139:1567-81.
- Ferrara, C., Brunker, P., Suter, T., Moser, S., Puntener, U., und Umana, P. (2006). Modulation of therapeutic antibody effector functions by glycosylation engineering: influence of Golgi enzyme localization domain and co-expression of heterologous beta1, 4-N-acetylglucosaminyltransferase III and Golgi alpha-mannosidase II. *Biotechnol Bioeng.* 93:851-61.
- Fischer, G., Kunemund, V., und Schachner, M. (1986). Neurite outgrowth patterns in cerebellar microexplant cultures are affected by antibodies to the cell surface glycoprotein L1. *J Neurosci.* 6:605-12.
- Fitzli, D., Stoeckli, E.T., Kunz, S., Siribour, K., Rader, C., Kunz, B., Kozlov, S.V., Buchstaller, A., Lane, R.P., Suter, D.M., et al. (2000). A direct interaction of axonin-1 with NgCAM-related cell adhesion molecule (NrCAM) results in guidance, but not growth of commissural axons. *J Cell Biol.* 149:951-68.
- Fogel, M., Gutwein, P., Mechtersheimer, S., Riedle, S., Stoeck, A., Smirnov, A., Edler, L., Ben-Arie, A., Huszar, M., und Altevogt, P. (2003a). L1 expression as a predictor of progression and survival in patients with uterine and ovarian carcinomas. *Lancet.* 362:869-75.
- Fogel, M., Huszar, M., Altevogt, P., und Ben-Arie, A. (2004). L1 (CD171) as a novel biomarker for ovarian and endometrial carcinomas. *Expert Rev Mol Diagn.* 4:455-62.
- Fogel, M., Mechtersheimer, S., Huszar, M., Smirnov, A., Abu-Dahi, A., Tilgen, W., Reichrath, J., Georg, T., Altevogt, P., und Gutwein, P. (2003b). L1 adhesion molecule (CD 171) in development and progression of human malignant melanoma. *Cancer Lett.* 189:237-47.
- Fransen, E., Lemmon, V., Van Camp, G., Vits, L., Coucke, P., und Willems, P.J. (1995). CRASH syndrome: clinical spectrum of corpus callosum hypoplasia, retardation, adducted thumbs, spastic paraparesis and hydrocephalus due to mutations in one single gene, L1. *Eur J Hum Genet.* 3:273-84.

- Fransen, E., Schrandt-Stumpel, C., Vits, L., Coucke, P., Van Camp, G., und Willems, P.J. (1994). X-linked hydrocephalus and MASA syndrome present in one family are due to a single missense mutation in exon 28 of the L1CAM gene. *Hum Mol Genet.* 3:2255-6.
- Friedlander, D.R., Milev, P., Karthikeyan, L., Margolis, R.K., Margolis, R.U., und Grumet, M. (1994). The neuronal chondroitin sulfate proteoglycan neurocan binds to the neural cell adhesion molecules Ng-CAM/L1/NILE and N-CAM, and inhibits neuronal adhesion and neurite outgrowth. *J Cell Biol.* 125:669-80.
- Friedli, A., Fischer, E., Novak-Hofer, I., Cohrs, S., Ballmer-Hofer, K., Schubiger, P.A., Schibli, R., und Grunberg, J. (2009). The soluble form of the cancer-associated L1 cell adhesion molecule is a pro-angiogenic factor. *Int J Biochem Cell Biol.* 41:1572-80.
- Funaro, A., Horenstein, A.L., und Malavasi, F. (1996). Monoclonal antibodies in clinical applications. *J Biol Regul Homeost Agents.* 10:72-82.
- Garver, T.D., Ren, Q., Tuvia, S., und Bennett, V. (1997). Tyrosine phosphorylation at a site highly conserved in the L1 family of cell adhesion molecules abolishes ankyrin binding and increases lateral mobility of neurofascin. *J Cell Biol.* 137:703-14.
- Gast, D., Riedle, S., Issa, Y., Pfeifer, M., Beckhove, P., Sanderson, M.P., Arlt, M., Moldenhauer, G., Fogel, M., Kruger, A., et al. (2008). The cytoplasmic part of L1-CAM controls growth and gene expression in human tumors that is reversed by therapeutic antibodies. *Oncogene.* 27:1281-9.
- Gast, D., Riedle, S., Schabath, H., Schlich, S., Schneider, A., Issa, Y., Stoeck, A., Fogel, M., Joumaa, S., Wenger, T., et al. (2005). L1 augments cell migration and tumor growth but not beta3 integrin expression in ovarian carcinomas. *Int J Cancer.* 115:658-65.
- Gavert, N., Conacci-Sorrell, M., Gast, D., Schneider, A., Altevogt, P., Brabletz, T., und Ben-Ze'ev, A. (2005). L1, a novel target of beta-catenin signaling, transforms cells and is expressed at the invasive front of colon cancers. *J Cell Biol.* 168:633-42.
- Gavert, N., Sheffer, M., Raveh, S., Spaderna, S., Shtutman, M., Brabletz, T., Barany, F., Paty, P., Notterman, D., Domany, E., et al. (2007). Expression of L1-CAM and ADAM10 in human colon cancer cells induces metastasis. *Cancer Res.* 67:7703-12.
- Geismann, C., Morscheck, M., Koch, D., Bergmann, F., Ungefroren, H., Arlt, A., Tsao, M.S., Bachem, M.G., Altevogt, P., Sipos, B., et al. (2009). Up-regulation of L1CAM in pancreatic duct cells is transforming growth factor beta1- and slug-dependent: role in malignant transformation of pancreatic cancer. *Cancer Res.* 69:4517-26.
- Gerber, H.P., Wu, X., Yu, L., Wiesmann, C., Liang, X.H., Lee, C.V., Fuh, G., Olsson, C., Damico, L., Xie, D., et al. (2007). Mice expressing a humanized form of VEGF-A may provide insights into the safety and efficacy of anti-VEGF antibodies. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 104:3478-83.
- Gordon, A.N., Finkler, N., Edwards, R.P., Garcia, A.A., Crozier, M., Irwin, D.H., und Barrett, E. (2005). Efficacy and safety of erlotinib HCl, an epidermal growth factor receptor (HER1/EGFR) tyrosine kinase inhibitor, in patients with advanced ovarian carcinoma: results from a phase II multicenter study. *Int J Gynecol Cancer.* 15:785-92.
- Gorter, A., und Meri, S. (1999). Immune evasion of tumor cells using membrane-bound complement regulatory proteins. *Immunol Today.* 20:576-82.
- Gouveia, R.M., Gomes, C.M., Sousa, M., Alves, P.M., und Costa, J. (2008). Kinetic analysis of L1 homophilic interaction: role of the first four immunoglobulin domains and implications on binding mechanism. *J Biol Chem.* 283:28038-47.

- Green, L.L., Hardy, M.C., Maynard-Currie, C.E., Tsuda, H., Louie, D.M., Mendez, M.J., Abderrahim, H., Noguchi, M., Smith, D.H., Zeng, Y., et al. (1994). Antigen-specific human monoclonal antibodies from mice engineered with human Ig heavy and light chain YACs. *Nat Genet.* 7:13-21.
- Greenlee, R.T., Hill-Harmon, M.B., Murray, T., und Thun, M. (2001). Cancer statistics, 2001. *CA Cancer J Clin.* 51:15-36.
- Grumet, M., Hoffman, S., und Edelman, G.M. (1984). Two antigenically related neuronal cell adhesion molecules of different specificities mediate neuron-neuron and neuron-glia adhesion. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 81:267-71.
- Grunberg, J., Novak-Hofer, I., Honer, M., Zimmermann, K., Knogler, K., Blauenstein, P., Ametamey, S., Maecke, H.R., und Schubiger, P.A. (2005). In vivo evaluation of ¹⁷⁷Lu- and ⁶⁷/64Cu-labeled recombinant fragments of antibody chCE7 for radioimmunotherapy and PET imaging of L1-CAM-positive tumors. *Clin Cancer Res.* 11:5112-20.
- Gunderson, K.L., Kruglyak, S., Graige, M.S., Garcia, F., Kermani, B.G., Zhao, C., Che, D., Dickinson, T., Wickham, E., Bierle, J., et al. (2004). Decoding randomly ordered DNA arrays. *Genome Res.* 14:870-7.
- Guo, W., Jiang, H., Gray, V., Dedhar, S., und Rao, Y. (2007). Role of the integrin-linked kinase (ILK) in determining neuronal polarity. *Dev Biol.* 306:457-68.
- Gutwein, P., Mechttersheimer, S., Riedle, S., Stoeck, A., Gast, D., Joumaa, S., Zentgraf, H., Fogel, M., und Altevogt, D.P. (2003). ADAM10-mediated cleavage of L1 adhesion molecule at the cell surface and in released membrane vesicles. *FASEB J.* 17:292-4.
- Gutwein, P., Oleszewski, M., Mechttersheimer, S., Agmon-Levin, N., Krauss, K., und Altevogt, P. (2000). Role of Src kinases in the ADAM-mediated release of L1 adhesion molecule from human tumor cells. *J Biol Chem.* 275:15490-7.
- Gutwein, P., Stoeck, A., Riedle, S., Gast, D., Runz, S., Condon, T.P., Marme, A., Phong, M.C., Linderkamp, O., Skorokhod, A., et al. (2005). Cleavage of L1 in exosomes and apoptotic membrane vesicles released from ovarian carcinoma cells. *Clin Cancer Res.* 11:2492-501.
- Hamaguchi, Y., Xiu, Y., Komura, K., Nimmerjahn, F., und Tedder, T.F. (2006). Antibody isotype-specific engagement of Fcγ receptors regulates B lymphocyte depletion during CD20 immunotherapy. *J Exp Med.* 203:743-53.
- Harries, M., und Smith, I. (2002). The development and clinical use of trastuzumab (Herceptin). *Endocr Relat Cancer.* 9:75-85.
- Haspel, J., Friedlander, D.R., Ivgy-May, N., Chickramane, S., Roonprapunt, C., Chen, S., Schachner, M., und Grumet, M. (2000). Critical and optimal Ig domains for promotion of neurite outgrowth by L1/Ng-CAM. *J Neurobiol.* 42:287-302.
- Haspel, J., und Grumet, M. (2003). The L1CAM extracellular region: a multi-domain protein with modular and cooperative binding modes. *Front Biosci.* 8:s1210-25.
- Heiland, P.C., Griffith, L.S., Lange, R., Schachner, M., Hertlein, B., Traub, O., und Schmitz, B. (1998). Tyrosine and serine phosphorylation of the neural cell adhesion molecule L1 is implicated in its oligomannosidic glycan dependent association with NCAM and neurite outgrowth. *Eur J Cell Biol.* 75:97-106.
- Helbert, M.J., Dauwe, S.E., und De Broe, M.E. (2001). Flow cytometric immunodissection of the human distal tubule and cortical collecting duct system. *Kidney Int.* 59:554-64.

- Herron, L.R., Hill, M., Davey, F., und Gunn-Moore, F.J. (2009). The intracellular interactions of the L1 family of cell adhesion molecules. *Biochem J.* 419:519-31.
- Hillenbrand, R., Molthagen, M., Montag, D., und Schachner, M. (1999). The close homologue of the neural adhesion molecule L1 (CHL1): patterns of expression and promotion of neurite outgrowth by heterophilic interactions. *Eur J Neurosci.* 11:813-26.
- Hoefnagel, C.A., Rutgers, M., Buitenhuis, C.K., Smets, L.A., de Kraker, J., Meli, M., Carrel, F., Amstutz, H., Schubiger, P.A., und Novak-Hofer, I. (2001). A comparison of targeting of neuroblastoma with mIBG and anti L1-CAM antibody mAb chCE7: therapeutic efficacy in a neuroblastoma xenograft model and imaging of neuroblastoma patients. *Eur J Nucl Med.* 28:359-68.
- Horani, M.H., und Mooradian, A.D. (2003). Effect of diabetes on the blood brain barrier. *Curr Pharm Des.* 9:833-40.
- Horstkorte, R., Schachner, M., Magyar, J.P., Vorherr, T., und Schmitz, B. (1993). The fourth immunoglobulin-like domain of NCAM contains a carbohydrate recognition domain for oligomannosidic glycans implicated in association with L1 and neurite outgrowth. *J Cell Biol.* 121:1409-21.
- Hortsch, M. (1996). The L1 family of neural cell adhesion molecules: old proteins performing new tricks. *Neuron.* 17:587-93.
- Hortsch, M., Nagaraj, K., und Godenschwege, T.A. (2009). The interaction between L1-type proteins and ankyrins--a master switch for L1-type CAM function. *Cell Mol Biol Lett.* 14:57-69.
- Hortsch, M., Paisley, K.L., Tian, M.Z., Qian, M., Bouley, M., und Chandler, R. (2001). The Two Major Protein Isoforms of Ankyrin 2 are Differentially Localized in Drosophila Neurons. *Cell Mol Biol Lett.* 6:209.
- Huang da, W., Sherman, B.T., und Lempicki, R.A. (2009). Systematic and integrative analysis of large gene lists using DAVID bioinformatics resources. *Nat Protoc.* 4:44-57.
- Huszar, M., Moldenhauer, G., Gschwend, V., Ben-Arie, A., Altevogt, P., und Fogel, M. (2006). Expression profile analysis in multiple human tumors identifies L1 (CD171) as a molecular marker for differential diagnosis and targeted therapy. *Hum Pathol.* 37:1000-8.
- Huzar, M., Pfeifer, M., Schirmer, U., Kiefel, H., Konecny, G., Ben-Arie, A., Edler, L., Münch, M., Müller-Holzner, E., Jerabek-Klestil, S., et al. (2010). Upregulation of L1CAM is linked to loss of hormone receptors and E-Cadherin in aggressive subtypes of endometrial carcinomas. *The Journal of Pathology.*
- Hwang, W.Y., und Foote, J. (2005). Immunogenicity of engineered antibodies. *Methods.* 36:3-10.
- Iannello, A., und Ahmad, A. (2005). Role of antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity in the efficacy of therapeutic anti-cancer monoclonal antibodies. *Cancer Metastasis Rev.* 24:487-99.
- Iida, S., Misaka, H., Inoue, M., Shibata, M., Nakano, R., Yamane-Ohnuki, N., Wakitani, M., Yano, K., Shitara, K., und Satoh, M. (2006). Nonfucosylated therapeutic IgG1 antibody can evade the inhibitory effect of serum immunoglobulin G on antibody-dependent cellular cytotoxicity through its high binding to FcγRIIIa. *Clin Cancer Res.* 12:2879-87.
- Issa, Y., Nummer, D., Seibel, T., Muerkoster, S.S., Koch, M., Schmitz-Winnenthal, F.H., Galindo, L., Weitz, J., Beckhove, P., und Altevogt, P. (2009). Enhanced L1CAM

- expression on pancreatic tumor endothelium mediates selective tumor cell transmigration. *J Mol Med.* 87:99-112.
- Itoh, K., Cheng, L., Kamei, Y., Fushiki, S., Kamiguchi, H., Gutwein, P., Stoeck, A., Arnold, B., Altevogt, P., und Lemmon, V. (2004). Brain development in mice lacking L1-L1 homophilic adhesion. *J Cell Biol.* 165:145-54.
- Jakovovits, A. (1995). Production of fully human antibodies by transgenic mice. *Curr Opin Biotechnol.* 6:561-6.
- Jefferis, R. (2005). Glycosylation of recombinant antibody therapeutics. *Biotechnol Prog.* 21:11-6.
- Jefferis, R. (2009). Glycosylation as a strategy to improve antibody-based therapeutics. *Nat Rev Drug Discov.* 8:226-34.
- Jefferis, R., Lund, J., und Pound, J.D. (1998). IgG-Fc-mediated effector functions: molecular definition of interaction sites for effector ligands and the role of glycosylation. *Immunol Rev.* 163:59-76.
- Jemal, A., Siegel, R., Ward, E., Murray, T., Xu, J., und Thun, M.J. (2007). Cancer statistics, 2007. *CA Cancer J Clin.* 57:43-66.
- Jones, P.T., Dear, P.H., Foote, J., Neuberger, M.S., und Winter, G. (1986). Replacing the complementarity-determining regions in a human antibody with those from a mouse. *Nature.* 321:522-5.
- Jouet, M., Moncla, A., Paterson, J., McKeown, C., Fryer, A., Carpenter, N., Holmberg, E., Wadelius, C., und Kenwrick, S. (1995a). New domains of neural cell-adhesion molecule L1 implicated in X-linked hydrocephalus and MASA syndrome. *Am J Hum Genet.* 56:1304-14.
- Jouet, M., Rosenthal, A., Armstrong, G., MacFarlane, J., Stevenson, R., Paterson, J., Metzberg, A., Ionasescu, V., Temple, K., und Kenwrick, S. (1994). X-linked spastic paraplegia (SPG1), MASA syndrome and X-linked hydrocephalus result from mutations in the L1 gene. *Nat Genet.* 7:402-7.
- Jouet, M., Rosenthal, A., und Kenwrick, S. (1995b). Exon 2 of the gene for neural cell adhesion molecule L1 is alternatively spliced in B cells. *Brain Res Mol Brain Res.* 30:378-80.
- Kabat, E.A., und Wu, T.T. (1991). Identical V region amino acid sequences and segments of sequences in antibodies of different specificities. Relative contributions of VH and VL genes, minigenes, and complementarity-determining regions to binding of antibody-combining sites. *J Immunol.* 147:1709-19.
- Kadmon, G., Kowitz, A., Altevogt, P., und Schachner, M. (1990). The neural cell adhesion molecule N-CAM enhances L1-dependent cell-cell interactions. *J Cell Biol.* 110:193-208.
- Kaifi, J.T., Reichelt, U., Quaas, A., Schurr, P.G., Wachowiak, R., Yekebas, E.F., Strate, T., Schneider, C., Pantel, K., Schachner, M., et al. (2007). L1 is associated with micrometastatic spread and poor outcome in colorectal cancer. *Mod Pathol.* 20:1183-90.
- Kaifi, J.T., Strelow, A., Schurr, P.G., Reichelt, U., Yekebas, E.F., Wachowiak, R., Quaas, A., Strate, T., Schaefer, H., Sauter, G., et al. (2006). L1 (CD171) is highly expressed in gastrointestinal stromal tumors. *Mod Pathol.* 19:399-406.
- Kalus, I., Schnegelsberg, B., Seidah, N.G., Kleene, R., und Schachner, M. (2003). The proprotein convertase PC5A and a metalloprotease are involved in the proteolytic processing of the neural adhesion molecule L1. *J Biol Chem.* 278:10381-8.

- Kamiguchi, H., Long, K.E., Pendergast, M., Schaefer, A.W., Rapoport, I., Kirchhausen, T., und Lemmon, V. (1998). The neural cell adhesion molecule L1 interacts with the AP-2 adaptor and is endocytosed via the clathrin-mediated pathway. *J Neurosci.* 18:5311-21.
- Kaneko, Y., Nimmerjahn, F., und Ravetch, J.V. (2006). Anti-inflammatory activity of immunoglobulin G resulting from Fc sialylation. *Science.* 313:670-3.
- Katayama, M., Iwamatsu, A., Masutani, H., Furuke, K., Takeda, K., Wada, H., Masuda, T., und Ishii, K. (1997). Expression of neural cell adhesion molecule L1 in human lung cancer cell lines. *Cell Struct Funct.* 22:511-6.
- Keilhauer, G., Faissner, A., und Schachner, M. (1985). Differential inhibition of neurone-neurone, neurone-astrocyte and astrocyte-astrocyte adhesion by L1, L2 and N-CAM antibodies. *Nature.* 316:728-30.
- Knogler, K., Grunberg, J., Zimmermann, K., Cohrs, S., Honer, M., Ametamey, S., Altevogt, P., Fogel, M., Schubiger, P.A., und Novak-Hofer, I. (2007). Copper-67 radioimmunotherapy and growth inhibition by anti-L1-cell adhesion molecule monoclonal antibodies in a therapy model of ovarian cancer metastasis. *Clin Cancer Res.* 13:603-11.
- Kohler, G., und Milstein, C. (1975). Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature.* 256:495-7.
- Kowitz, A., Kadmon, G., Eckert, M., Schirrmacher, V., Schachner, M., und Altevogt, P. (1992). Expression and function of the neural cell adhesion molecule L1 in mouse leukocytes. *Eur J Immunol.* 22:1199-205.
- Kowitz, A., Kadmon, G., Verschuere, H., Remels, L., De Baetselier, P., Hubbe, M., Schachner, M., Schirrmacher, V., und Altevogt, P. (1993). Expression of L1 cell adhesion molecule is associated with lymphoma growth and metastasis. *Clin Exp Metastasis.* 11:419-29.
- Kozbor, D., und Roder, J.C. (1981). Requirements for the establishment of high-titered human monoclonal antibodies against tetanus toxoid using the Epstein-Barr virus technique. *J Immunol.* 127:1275-80.
- Kuhn, T.B., Stoeckli, E.T., Condrau, M.A., Rathjen, F.G., und Sonderegger, P. (1991). Neurite outgrowth on immobilized axonin-1 is mediated by a heterophilic interaction with L1(G4). *J Cell Biol.* 115:1113-26.
- Kulahin, N., Li, S., Hinsby, A., Kiselyov, V., Berezin, V., und Bock, E. (2008). Fibronectin type III (FN3) modules of the neuronal cell adhesion molecule L1 interact directly with the fibroblast growth factor (FGF) receptor. *Mol Cell Neurosci.* 37:528-36.
- Kulahin, N., Li, S., Kiselyov, V., Bock, E., und Berezin, V. (2009). Identification of neural cell adhesion molecule L1-derived neuritogenic ligands of the fibroblast growth factor receptor. *J Neurosci Res.* 87:1806-12.
- Kumpel, B.M., Rademacher, T.W., Rook, G.A., Williams, P.J., und Wilson, I.B. (1994). Galactosylation of human IgG monoclonal anti-D produced by EBV-transformed B-lymphoblastoid cell lines is dependent on culture method and affects Fc receptor-mediated functional activity. *Hum Antibodies Hybridomas.* 5:143-51.
- Landman, N., und Kim, T.W. (2004). Got RIP? Presenilin-dependent intramembrane proteolysis in growth factor receptor signaling. *Cytokine Growth Factor Rev.* 15:337-51.
- Lanzavecchia, A., Corti, D., und Sallusto, F. (2007). Human monoclonal antibodies by immortalization of memory B cells. *Curr Opin Biotechnol.* 18:523-8.

- Lee, V.M., Greene, L., und Shelanski, M.L. (1981). Identification of neural and adrenal medullary surface membrane glycoproteins recognized by antisera to cultured rat sympathetic neurons and PC12 pheochromocytoma cells. *Neuroscience*. 6:2773-86.
- Lehenkari, P.P., Kellinsalmi, M., Napankangas, J.P., Ylitalo, K.V., Monkkonen, J., Rogers, M.J., Azhayev, A., Vaananen, H.K., und Hassinen, I.E. (2002). Further insight into mechanism of action of clodronate: inhibition of mitochondrial ADP/ATP translocase by a nonhydrolyzable, adenine-containing metabolite. *Mol Pharmacol*. 61:1255-62.
- Leshchyns'ka, I., Sytnyk, V., Richter, M., Andreyeva, A., Puchkov, D., und Schachner, M. (2006). The adhesion molecule CHL1 regulates uncoating of clathrin-coated synaptic vesicles. *Neuron*. 52:1011-25.
- Lindner, J., Rathjen, F.G., und Schachner, M. (1983). L1 mono- and polyclonal antibodies modify cell migration in early postnatal mouse cerebellum. *Nature*. 305:427-30.
- Liu, X.Y., Pop, L.M., und Vitetta, E.S. (2008). Engineering therapeutic monoclonal antibodies. *Immunol Rev*. 222:9-27.
- Long, K.E., Asou, H., Snider, M.D., und Lemmon, V. (2001). The role of endocytosis in regulating L1-mediated adhesion. *J Biol Chem*. 276:1285-90.
- Lukanova, A., und Kaaks, R. (2005). Endogenous hormones and ovarian cancer: epidemiology and current hypotheses. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 14:98-107.
- Lynch, H.T., Watson, P., Lynch, J.F., Conway, T.A., und Fili, M. (1993). Hereditary ovarian cancer. Heterogeneity in age at onset. *Cancer*. 71:573-81.
- Maddaluno, L., Verbrugge, S.E., Martinoli, C., Matteoli, G., Chiavelli, A., Zeng, Y., Williams, E.D., Rescigno, M., und Cavallaro, U. (2009). The adhesion molecule L1 regulates transendothelial migration and trafficking of dendritic cells. *J Exp Med*. 206:623-35.
- Manches, O., Lui, G., Chaperot, L., Gressin, R., Molens, J.P., Jacob, M.C., Sotto, J.J., Leroux, D., Bensa, J.C., und Plumas, J. (2003). In vitro mechanisms of action of rituximab on primary non-Hodgkin lymphomas. *Blood*. 101:949-54.
- Manderson, E.N., Birch, A.H., Shen, Z., Mes-Masson, A.M., Provencher, D., und Tonin, P.N. (2009). Molecular genetic analysis of a cell adhesion molecule with homology to L1CAM, contactin 6, and contactin 4 candidate chromosome 3p26pter tumor suppressor genes in ovarian cancer. *Int J Gynecol Cancer*. 19:513-25.
- Mantovani, A. (1994). Tumor-associated macrophages in neoplastic progression: a paradigm for the in vivo function of chemokines. *Lab Invest*. 71:5-16.
- Mantovani, A., Sozzani, S., Locati, M., Allavena, P., und Sica, A. (2002). Macrophage polarization: tumor-associated macrophages as a paradigm for polarized M2 mononuclear phagocytes. *Trends Immunol*. 23:549-55.
- Maretzky, T., Schulte, M., Ludwig, A., Rose-John, S., Blobel, C., Hartmann, D., Altevogt, P., Saftig, P., und Reiss, K. (2005). L1 is sequentially processed by two differently activated metalloproteases and presenilin/gamma-secretase and regulates neural cell adhesion, cell migration, and neurite outgrowth. *Mol Cell Biol*. 25:9040-53.
- Mechtersheimer, S., Gutwein, P., Agmon-Levin, N., Stoeck, A., Oleszewski, M., Riedle, S., Postina, R., Fahrenholz, F., Fogel, M., Lemmon, V., et al. (2001). Ectodomain shedding of L1 adhesion molecule promotes cell migration by autocrine binding to integrins. *J Cell Biol*. 155:661-73.
- Meier, F., Busch, S., Gast, D., Goppert, A., Altevogt, P., Maczey, E., Riedle, S., Garbe, C., und Schitteck, B. (2006). The adhesion molecule L1 (CD171) promotes melanoma progression. *Int J Cancer*. 119:549-55.

- Meli, M.L., Carrel, F., Waibel, R., Amstutz, H., Crompton, N., Jaussi, R., Moch, H., Schubiger, P.A., und Novak-Hofer, I. (1999). Anti-neuroblastoma antibody chCE7 binds to an isoform of L1-CAM present in renal carcinoma cells. *Int J Cancer*. 83:401-8.
- Miura, M., Kobayashi, M., Asou, H., und Uyemura, K. (1991). Molecular cloning of cDNA encoding the rat neural cell adhesion molecule L1. Two L1 isoforms in the cytoplasmic region are produced by differential splicing. *FEBS Lett*. 289:91-5.
- Mizuochi, T., Taniguchi, T., Shimizu, A., und Kobata, A. (1982). Structural and numerical variations of the carbohydrate moiety of immunoglobulin G. *J Immunol*. 129:2016-20.
- Montgomery, A.M., Becker, J.C., Siu, C.H., Lemmon, V.P., Cheresch, D.A., Pancook, J.D., Zhao, X., und Reisfeld, R.A. (1996). Human neural cell adhesion molecule L1 and rat homologue NILE are ligands for integrin alpha v beta 3. *J Cell Biol*. 132:475-85.
- Moos, M., Tacke, R., Scherer, H., Teplow, D., Fruh, K., und Schachner, M. (1988). Neural adhesion molecule L1 as a member of the immunoglobulin superfamily with binding domains similar to fibronectin. *Nature*. 334:701-3.
- Morrison, S.L., Johnson, M.J., Herzenberg, L.A., und Oi, V.T. (1984). Chimeric human antibody molecules: mouse antigen-binding domains with human constant region domains. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 81:6851-5.
- Mutch, D.G. (2002). Surgical management of ovarian cancer. *Semin Oncol*. 29:3-8.
- Nayeem, N., Silletti, S., Yang, X., Lemmon, V.P., Reisfeld, R.A., Stallcup, W.B., und Montgomery, A.M. (1999). A potential role for the plasmin(ogen) system in the posttranslational cleavage of the neural cell adhesion molecule L1. *J Cell Sci*. 112 (Pt 24):4739-49.
- Nimmerjahn, F., Anthony, R.M., und Ravetch, J.V. (2007). Agalactosylated IgG antibodies depend on cellular Fc receptors for in vivo activity. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 104:8433-7.
- Nimmerjahn, F., Bruhns, P., Horiuchi, K., und Ravetch, J.V. (2005). FcγR4: a novel FcR with distinct IgG subclass specificity. *Immunity*. 23:41-51.
- Nimmerjahn, F., und Ravetch, J.V. (2005). Divergent immunoglobulin g subclass activity through selective Fc receptor binding. *Science*. 310:1510-2.
- Nimmerjahn, F., und Ravetch, J.V. (2006). Fcγ receptors: old friends and new family members. *Immunity*. 24:19-28.
- Nimmerjahn, F., und Ravetch, J.V. (2007). Antibodies, Fc receptors and cancer. *Curr Opin Immunol*. 19:239-45.
- Novak-Hofer, I., Amstutz, H.P., Haldemann, A., Blaser, K., Morgenthaler, J.J., Blauenstein, P., und Schubiger, P.A. (1992). Radioimmunolocalization of neuroblastoma xenografts with chimeric antibody chCE7. *J Nucl Med*. 33:231-6.
- Novak-Hofer, I., Cohrs, S., Grunberg, J., Friedli, A., Schlatter, M.C., Pfeifer, M., Altevogt, P., und Schubiger, P.A. (2008). Antibodies directed against L1-CAM synergize with Genistein in inhibiting growth and survival pathways in SKOV3ip human ovarian cancer cells. *Cancer Lett*. 261:193-204.
- Novak-Hofer, I., Zimmermann, K., Maecke, H.R., Amstutz, H.P., Carrel, F., und Schubiger, P.A. (1997). Tumor uptake and metabolism of copper-67-labeled monoclonal antibody chCE7 in nude mice bearing neuroblastoma xenografts. *J Nucl Med*. 38:536-44.
- Oflazoglu, E., Stone, I.J., Brown, L., Gordon, K.A., van Rooijen, N., Jonas, M., Law, C.L., Grewal, I.S., und Gerber, H.P. (2009). Macrophages and Fc-receptor interactions

- contribute to the antitumour activities of the anti-CD40 antibody SGN-40. *Br J Cancer*. 100:113-7.
- Oflazoglu, E., Stone, I.J., Gordon, K.A., Grewal, I.S., van Rooijen, N., Law, C.L., und Gerber, H.P. (2007). Macrophages contribute to the antitumor activity of the anti-CD30 antibody SGN-30. *Blood*. 110:4370-2.
- Olafsen, T., Kenanova, V.E., Sundaresan, G., Anderson, A.L., Crow, D., Yazaki, P.J., Li, L., Press, M.F., Gambhir, S.S., Williams, L.E., et al. (2005). Optimizing radiolabeled engineered anti-p185HER2 antibody fragments for in vivo imaging. *Cancer Res*. 65:5907-16.
- Oleszewski, M., Beer, S., Katich, S., Geiger, C., Zeller, Y., Rauch, U., und Altevogt, P. (1999). Integrin and neurocan binding to L1 involves distinct Ig domains. *J Biol Chem*. 274:24602-10.
- Ozols, R.F., Bundy, B.N., Greer, B.E., Fowler, J.M., Clarke-Pearson, D., Burger, R.A., Mannel, R.S., DeGeest, K., Hartenbach, E.M., und Baergen, R. (2003). Phase III trial of carboplatin and paclitaxel compared with cisplatin and paclitaxel in patients with optimally resected stage III ovarian cancer: a Gynecologic Oncology Group study. *J Clin Oncol*. 21:3194-200.
- Padlan, E.A. (1994). Anatomy of the antibody molecule. *Mol Immunol*. 31:169-217.
- Padua, D., Zhang, X.H., Wang, Q., Nadal, C., Gerald, W.L., Gomis, R.R., und Massague, J. (2008). TGFbeta primes breast tumors for lung metastasis seeding through angiopoietin-like 4. *Cell*. 133:66-77.
- Pahnke, J., Walker, L.C., Scheffler, K., und Krohn, M. (2009). Alzheimer's disease and blood-brain barrier function-Why have anti-beta-amyloid therapies failed to prevent dementia progression? *Neurosci Biobehav Rev*. 33:1099-108.
- Pancook, J.D., Reisfeld, R.A., Varki, N., Vitiello, A., Fox, R.I., und Montgomery, A.M. (1997). Expression and regulation of the neural cell adhesion molecule L1 on human cells of myelomonocytic and lymphoid origin. *J Immunol*. 158:4413-21.
- Park, T.W., und Kuhn, W.C. (2004). Neoadjuvant chemotherapy in ovarian cancer. *Expert Rev Anticancer Ther*. 4:639-47.
- Pepper, M.S. (2001). Role of the matrix metalloproteinase and plasminogen activator-plasmin systems in angiogenesis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 21:1104-17.
- Polakis, P. (2007). The many ways of Wnt in cancer. *Curr Opin Genet Dev*. 17:45-51.
- Polfliet, M.M., Goede, P.H., van Kesteren-Hendriks, E.M., van Rooijen, N., Dijkstra, C.D., und van den Berg, T.K. (2001). A method for the selective depletion of perivascular and meningeal macrophages in the central nervous system. *J Neuroimmunol*. 116:188-95.
- Primiano, T., Baig, M., Maliyekkel, A., Chang, B.D., Fellars, S., Sadhu, J., Axenovich, S.A., Holzmayer, T.A., und Roninson, I.B. (2003). Identification of potential anticancer drug targets through the selection of growth-inhibitory genetic suppressor elements. *Cancer Cell*. 4:41-53.
- Qian, Q., Jutila, M.A., Van Rooijen, N., und Cutler, J.E. (1994). Elimination of mouse splenic macrophages correlates with increased susceptibility to experimental disseminated candidiasis. *J Immunol*. 152:5000-8.
- Rader, C., Kunz, B., Lierheimer, R., Giger, R.J., Berger, P., Tittmann, P., Gross, H., und Sonderegger, P. (1996). Implications for the domain arrangement of axonin-1 derived from the mapping of its NgCAM binding site. *EMBO J*. 15:2056-68.

- Raju, T.S. (2008). Terminal sugars of Fc glycans influence antibody effector functions of IgGs. *Curr Opin Immunol.* 20:471-8.
- Ramsland, P.A., und Farrugia, W. (2002). Crystal structures of human antibodies: a detailed and unfinished tapestry of immunoglobulin gene products. *J Mol Recognit.* 15:248-59.
- Rauch, U., Feng, K., und Zhou, X.H. (2001). Neurocan: a brain chondroitin sulfate proteoglycan. *Cell Mol Life Sci.* 58:1842-56.
- Ravetch, J.V., und Lanier, L.L. (2000). Immune inhibitory receptors. *Science.* 290:84-9.
- Reff, M.E., Carner, K., Chambers, K.S., Chinn, P.C., Leonard, J.E., Raab, R., Newman, R.A., Hanna, N., und Anderson, D.R. (1994). Depletion of B cells in vivo by a chimeric mouse human monoclonal antibody to CD20. *Blood.* 83:435-45.
- Riedle, S., Kiefel, H., Gast, D., Bondong, S., Wolterink, S., Gutwein, P., und Altevogt, P. (2009). Nuclear translocation and signalling of L1-CAM in human carcinoma cells requires ADAM10 and presenilin/gamma-secretase activity. *Biochem J.* 420:391-402.
- Rosenthal, A., Jouet, M., und Kenwrick, S. (1992). Aberrant splicing of neural cell adhesion molecule L1 mRNA in a family with X-linked hydrocephalus. *Nat Genet.* 2:107-12.
- Ruppert, M., Aigner, S., Hubbe, M., Yagita, H., und Altevogt, P. (1995). The L1 adhesion molecule is a cellular ligand for VLA-5. *J Cell Biol.* 131:1881-91.
- Sablitzky, F., Radbruch, A., und Rajewsky, K. (1982). Spontaneous immunoglobulin class switching in myeloma and hybridoma cell lines differs from physiological class switching. *Immunol Rev.* 67:59-72.
- Sadoul, K., Sadoul, R., Faissner, A., und Schachner, M. (1988). Biochemical characterization of different molecular forms of the neural cell adhesion molecule L1. *J Neurochem.* 50:510-21.
- Sandercock, J., Parmar, M.K., Torri, V., und Qian, W. (2002). First-line treatment for advanced ovarian cancer: paclitaxel, platinum and the evidence. *Br J Cancer.* 87:815-24.
- Saunders, Y., Ross, J.R., Broadley, K.E., Edmonds, P.M., und Patel, S. (2004). Systematic review of bisphosphonates for hypercalcaemia of malignancy. *Palliat Med.* 18:418-31.
- Scallon, B.J., Tam, S.H., McCarthy, S.G., Cai, A.N., und Raju, T.S. (2007). Higher levels of sialylated Fc glycans in immunoglobulin G molecules can adversely impact functionality. *Mol Immunol.* 44:1524-34.
- Schaefer, A.W., Kamei, Y., Kamiguchi, H., Wong, E.V., Rapoport, I., Kirchhausen, T., Beach, C.M., Landreth, G., Lemmon, S.K., und Lemmon, V. (2002). L1 endocytosis is controlled by a phosphorylation-dephosphorylation cycle stimulated by outside-in signaling by L1. *J Cell Biol.* 157:1223-32.
- Schaefer, A.W., Kamiguchi, H., Wong, E.V., Beach, C.M., Landreth, G., und Lemmon, V. (1999). Activation of the MAPK signal cascade by the neural cell adhesion molecule L1 requires L1 internalization. *J Biol Chem.* 274:37965-73.
- Schilder, R.J., Sill, M.W., Chen, X., Darcy, K.M., Decesare, S.L., Lewandowski, G., Lee, R.B., Arciero, C.A., Wu, H., und Godwin, A.K. (2005). Phase II study of gefitinib in patients with relapsed or persistent ovarian or primary peritoneal carcinoma and evaluation of epidermal growth factor receptor mutations and immunohistochemical expression: a Gynecologic Oncology Group Study. *Clin Cancer Res.* 11:5539-48.
- Schlatter, M.C., Buhusi, M., Wright, A.G., und Maness, P.F. (2008). CHL1 promotes Sema3A-induced growth cone collapse and neurite elaboration through a motif required for recruitment of ERM proteins to the plasma membrane. *J Neurochem.* 104:731-44.

- Schmidt-Weber, C.B., Rittig, M., Buchner, E., Hauser, I., Schmidt, I., Palombo-Kinne, E., Emmrich, F., und Kinne, R.W. (1996). Apoptotic cell death in activated monocytes following incorporation of clodronate-liposomes. *J Leukoc Biol.* 60:230-44.
- Schuster, M., Umana, P., Ferrara, C., Brunker, P., Gerdes, C., Waxenecker, G., Wiederkum, S., Schwager, C., Loibner, H., Himmler, G., et al. (2005). Improved effector functions of a therapeutic monoclonal Lewis Y-specific antibody by glycoform engineering. *Cancer Res.* 65:7934-41.
- Sebens Muerkoster, S., Werbing, V., Sipos, B., Debus, M.A., Witt, M., Grossmann, M., Leisner, D., Kotteritzsch, J., Kappes, H., Kloppel, G., et al. (2007). Drug-induced expression of the cellular adhesion molecule L1CAM confers anti-apoptotic protection and chemoresistance in pancreatic ductal adenocarcinoma cells. *Oncogene.* 26:2759-68.
- Senner, V., Kismann, E., Puttmann, S., Hoess, N., Baur, I., und Paulus, W. (2002). L1 expressed by glioma cells promotes adhesion but not migration. *Glia.* 38:146-54.
- Shan, D., Ledbetter, J.A., und Press, O.W. (1998). Apoptosis of malignant human B cells by ligation of CD20 with monoclonal antibodies. *Blood.* 91:1644-52.
- Shan, D., Ledbetter, J.A., und Press, O.W. (2000). Signaling events involved in anti-CD20-induced apoptosis of malignant human B cells. *Cancer Immunol Immunother.* 48:673-83.
- Shen, J., und Zhu, Z. (2008). Catumaxomab, a rat/murine hybrid trifunctional bispecific monoclonal antibody for the treatment of cancer. *Curr Opin Mol Ther.* 10:273-84.
- Shields, R.L., Lai, J., Keck, R., O'Connell, L.Y., Hong, K., Meng, Y.G., Weikert, S.H., und 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. *J Biol Chem.* 277:26733-40.
- Shields, R.L., Namenuk, A.K., Hong, K., Meng, Y.G., Rae, J., Briggs, J., Xie, D., Lai, J., Stadlen, A., Li, B., et al. (2001). High resolution mapping of the binding site on human IgG1 for Fc gamma RI, Fc gamma RII, Fc gamma RIII, and FcRn and design of IgG1 variants with improved binding to the Fc gamma R. *J Biol Chem.* 276:6591-604.
- Shinkawa, T., Nakamura, K., Yamane, N., Shoji-Hosaka, E., Kanda, Y., Sakurada, M., Uchida, K., Anazawa, H., Satoh, M., Yamasaki, M., et al. (2003). The absence of fucose but not the presence of galactose or bisecting N-acetylglucosamine of human IgG1 complex-type oligosaccharides shows the critical role of enhancing antibody-dependent cellular cytotoxicity. *J Biol Chem.* 278:3466-73.
- Shtutman, M., Levina, E., Ohouo, P., Baig, M., und Roninson, I.B. (2006). Cell adhesion molecule L1 disrupts E-cadherin-containing adherens junctions and increases scattering and motility of MCF7 breast carcinoma cells. *Cancer Res.* 66:11370-80.
- Silletti, S., Mei, F., Sheppard, D., und Montgomery, A.M. (2000). Plasmin-sensitive dibasic sequences in the third fibronectin-like domain of L1-cell adhesion molecule (CAM) facilitate homomultimerization and concomitant integrin recruitment. *J Cell Biol.* 149:1485-502.
- Silletti, S., Yebra, M., Perez, B., Cirulli, V., McMahon, M., und Montgomery, A.M. (2004). Extracellular signal-regulated kinase (ERK)-dependent gene expression contributes to L1 cell adhesion molecule-dependent motility and invasion. *J Biol Chem.* 279:28880-8.
- Soker, S., Takashima, S., Miao, H.Q., Neufeld, G., und Klagsbrun, M. (1998). Neuropilin-1 is expressed by endothelial and tumor cells as an isoform-specific receptor for vascular endothelial growth factor. *Cell.* 92:735-45.

- Spiridon, C.I., Ghetie, M.A., Uhr, J., Marches, R., Li, J.L., Shen, G.L., und Vitetta, E.S. (2002). Targeting multiple Her-2 epitopes with monoclonal antibodies results in improved antigrowth activity of a human breast cancer cell line in vitro and in vivo. *Clin Cancer Res.* 8:1720-30.
- Stadlmann, J., Pabst, M., Kolarich, D., Kunert, R., und Altmann, F. (2008). Analysis of immunoglobulin glycosylation by LC-ESI-MS of glycopeptides and oligosaccharides. *Proteomics.* 8:2858-71.
- Steplewski, Z., Lubeck, M.D., und Koprowski, H. (1983). Human macrophages armed with murine immunoglobulin G2a antibodies to tumors destroy human cancer cells. *Science.* 221:865-7.
- Stoeck, A., Gast, D., Sanderson, M.P., Issa, Y., Gutwein, P., und Altevogt, P. (2007). L1-CAM in a membrane-bound or soluble form augments protection from apoptosis in ovarian carcinoma cells. *Gynecol Oncol.* 104:461-9.
- Stoeck, A., Keller, S., Riedle, S., Sanderson, M.P., Runz, S., Le Naour, F., Gutwein, P., Ludwig, A., Rubinstein, E., und Altevogt, P. (2006a). A role for exosomes in the constitutive and stimulus-induced ectodomain cleavage of L1 and CD44. *Biochem J.* 393:609-18.
- Stoeck, A., Schlich, S., Issa, Y., Gschwend, V., Wenger, T., Herr, I., Marme, A., Bourbie, S., Altevogt, P., und Gutwein, P. (2006b). L1 on ovarian carcinoma cells is a binding partner for Neuropilin-1 on mesothelial cells. *Cancer Lett.* 239:212-26.
- Strehler, B.L., und Totter, J.R. (1952). Firefly luminescence in the study of energy transfer mechanisms. I. Substrate and enzyme determination. *Arch Biochem Biophys.* 40:28-41.
- Su, X.D., Gastinel, L.N., Vaughn, D.E., Faye, I., Poon, P., und Bjorkman, P.J. (1998). Crystal structure of hemolin: a horseshoe shape with implications for homophilic adhesion. *Science.* 281:991-5.
- Sugawa, M., Ono, K., Yasui, Y., Kishi, T., und Tsumori, T. (1997). Enhancement of neurite outgrowth by the soluble form of human L1 (neural cell adhesion molecule). *Neuroreport.* 8:3157-62.
- Takayama, K., Tsutsumi, S., Suzuki, T., Horie-Inoue, K., Ikeda, K., Kaneshiro, K., Fujimura, T., Kumagai, J., Urano, T., Sakaki, Y., et al. (2009). Amyloid precursor protein is a primary androgen target gene that promotes prostate cancer growth. *Cancer Res.* 69:137-42.
- Takeda, Y., Asou, H., Murakami, Y., Miura, M., Kobayashi, M., und Uyemura, K. (1996). A nonneuronal isoform of cell adhesion molecule L1: tissue-specific expression and functional analysis. *J Neurochem.* 66:2338-49.
- Teeling, J.L., Mackus, W.J., Wiegman, L.J., van den Brakel, J.H., Beers, S.A., French, R.R., van Meerten, T., Ebeling, S., Vink, T., Slootstra, J.W., et al. (2006). The biological activity of human CD20 monoclonal antibodies is linked to unique epitopes on CD20. *J Immunol.* 177:362-71.
- Thelen, K., Kedar, V., Panicker, A.K., Schmid, R.S., Midkiff, B.R., und Maness, P.F. (2002). The neural cell adhesion molecule L1 potentiates integrin-dependent cell migration to extracellular matrix proteins. *J Neurosci.* 22:4918-31.
- Thepen, T., Van Rooijen, N., und Kraal, G. (1989). Alveolar macrophage elimination in vivo is associated with an increase in pulmonary immune response in mice. *J Exp Med.* 170:499-509.
- Thies, A., Schachner, M., Moll, I., Berger, J., Schulze, H.J., Brunner, G., und Schumacher, U. (2002). Overexpression of the cell adhesion molecule L1 is associated with metastasis in cutaneous malignant melanoma. *Eur J Cancer.* 38:1708-16.

- Ueno, T., Toi, M., Saji, H., Muta, M., Bando, H., Kuroi, K., Koike, M., Inadera, H., und Matsushima, K. (2000). Significance of macrophage chemoattractant protein-1 in macrophage recruitment, angiogenesis, and survival in human breast cancer. *Clin Cancer Res.* 6:3282-9.
- Umana, P., Jean-Mairet, J., Moudry, R., Amstutz, H., und Bailey, J.E. (1999). Engineered glycoforms of an antineuroblastoma IgG1 with optimized antibody-dependent cellular cytotoxic activity. *Nat Biotechnol.* 17:176-80.
- Van Camp, G., Vits, L., Coucke, P., Lyonnet, S., Schrandt-Stumpel, C., Darby, J., Holden, J., Munnich, A., und Willems, P.J. (1993). A duplication in the L1CAM gene associated with X-linked hydrocephalus. *Nat Genet.* 4:421-5.
- Van Gelder, R.N., von Zastrow, M.E., Yool, A., Dement, W.C., Barchas, J.D., und Eberwine, J.H. (1990). Amplified RNA synthesized from limited quantities of heterogeneous cDNA. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 87:1663-7.
- Van Rooijen, N. (1989). The liposome-mediated macrophage 'suicide' technique. *J Immunol Methods.* 124:1-6.
- van Rooijen, N. (1992). Liposome-mediated elimination of macrophages. *Res Immunol.* 143:215-9.
- Van Rooijen, N., und Sanders, A. (1996). Kupffer cell depletion by liposome-delivered drugs: comparative activity of intracellular clodronate, propamidine, and ethylenediaminetetraacetic acid. *Hepatology.* 23:1239-43.
- van Rooijen, N., Sanders, A., und van den Berg, T.K. (1996). Apoptosis of macrophages induced by liposome-mediated intracellular delivery of clodronate and propamidine. *J Immunol Methods.* 193:93-9.
- Vits, L., Van Camp, G., Coucke, P., Franssen, E., De Boulle, K., Reyniers, E., Korn, B., Poustka, A., Wilson, G., Schrandt-Stumpel, C., et al. (1994). MASA syndrome is due to mutations in the neural cell adhesion gene L1CAM. *Nat Genet.* 7:408-13.
- Vos, Y.J., de Walle, H.E., Bos, K.K., Stegeman, J.A., Ten Berge, A.M., Bruining, M., van Maarle, M.C., Elting, M.W., den Hollander, N.S., Hamel, B., et al. (2009). Genotype-phenotype correlations in L1 syndrome: a guide for genetic counselling and mutation analysis. *J Med Genet.*
- Wang, S.L., Kutsche, M., DiSciullo, G., Schachner, M., und Bogen, S.A. (2000). Selective malformation of the splenic white pulp border in L1-deficient mice. *J Immunol.* 165:2465-73.
- Weiner, L.M. (2006). Fully human therapeutic monoclonal antibodies. *J Immunother.* 29:1-9.
- Weiss, N., Miller, F., Cazaubon, S., und Couraud, P.O. (2009). The blood-brain barrier in brain homeostasis and neurological diseases. *Biochim Biophys Acta.* 1788:842-57.
- Weller, S., und Gartner, J. (2001). Genetic and clinical aspects of X-linked hydrocephalus (L1 disease): Mutations in the L1CAM gene. *Hum Mutat.* 18:1-12.
- Weng, W.K., und Levy, R. (2001). Expression of complement inhibitors CD46, CD55, and CD59 on tumor cells does not predict clinical outcome after rituximab treatment in follicular non-Hodgkin lymphoma. *Blood.* 98:1352-7.
- White, E.S., Strom, S.R., Wys, N.L., und Arenberg, D.A. (2001). Non-small cell lung cancer cells induce monocytes to increase expression of angiogenic activity. *J Immunol.* 166:7549-55.
- Witzig, T.E., Gordon, L.I., Cabanillas, F., Czuczman, M.S., Emmanouilides, C., Joyce, R., Pohlman, B.L., Bartlett, N.L., Wiseman, G.A., Padre, N., et al. (2002). Randomized

- controlled trial of yttrium-90-labeled ibritumomab tiuxetan radioimmunotherapy versus rituximab immunotherapy for patients with relapsed or refractory low-grade, follicular, or transformed B-cell non-Hodgkin's lymphoma. *J Clin Oncol.* 20:2453-63.
- Wolff, J.M., Frank, R., Mujoo, K., Spiro, R.C., Reisfeld, R.A., und Rathjen, F.G. (1988). A human brain glycoprotein related to the mouse cell adhesion molecule L1. *J Biol Chem.* 263:11943-7.
- Wood, P.M., Schachner, M., und Bunge, R.P. (1990). Inhibition of Schwann cell myelination in vitro by antibody to the L1 adhesion molecule. *J Neurosci.* 10:3635-45.
- Wright, A.G., Demyanenko, G.P., Powell, A., Schachner, M., Enriquez-Barreto, L., Tran, T.S., Polleux, F., und Maness, P.F. (2007). Close homolog of L1 and neuropilin 1 mediate guidance of thalamocortical axons at the ventral telencephalon. *J Neurosci.* 27:13667-79.
- Wu, A.M., und Senter, P.D. (2005). Arming antibodies: prospects and challenges for immunoconjugates. *Nat Biotechnol.* 23:1137-46.
- Yap, T.A., Carden, C.P., und Kaye, S.B. (2009). Beyond chemotherapy: targeted therapies in ovarian cancer. *Nat Rev Cancer.* 9:167-81.
- Yip, P.M., und Siu, C.H. (2001). PC12 cells utilize the homophilic binding site of L1 for cell-cell adhesion but L1-alpha_vbeta₃ interaction for neurite outgrowth. *J Neurochem.* 76:1552-64.
- Yip, P.M., Zhao, X., Montgomery, A.M., und Siu, C.H. (1998). The Arg-Gly-Asp motif in the cell adhesion molecule L1 promotes neurite outgrowth via interaction with the alpha_vbeta₃ integrin. *Mol Biol Cell.* 9:277-90.
- Zecchini, S., Bianchi, M., Colombo, N., Fasani, R., Goisis, G., Casadio, C., Viale, G., Liu, J., Herlyn, M., Godwin, A.K., et al. (2008). The differential role of L1 in ovarian carcinoma and normal ovarian surface epithelium. *Cancer Res.* 68:1110-8.
- Zeimet, A.G., und Marth, C. (2003). Why did p53 gene therapy fail in ovarian cancer? *Lancet Oncol.* 4:415-22.
- Zeisberger, S.M., Odermatt, B., Marty, C., Zehnder-Fjallman, A.H., Ballmer-Hofer, K., und Schwendener, R.A. (2006). Clodronate-liposome-mediated depletion of tumour-associated macrophages: a new and highly effective antiangiogenic therapy approach. *Br J Cancer.* 95:272-81.
- Zhao, X., und Siu, C.H. (1995). Colocalization of the homophilic binding site and the neuritogenic activity of the cell adhesion molecule L1 to its second Ig-like domain. *J Biol Chem.* 270:29413-21.
- Zhao, X., Yip, P.M., und Siu, C.H. (1998). Identification of a homophilic binding site in immunoglobulin-like domain 2 of the cell adhesion molecule L1. *J Neurochem.* 71:960-71.
- Zito, M.A., Koennecke, L.A., McAuliffe, M.J., McNally, B., van Rooijen, N., und Heyes, M.P. (2001). Depletion of systemic macrophages by liposome-encapsulated clodronate attenuates striatal macrophage invasion and neurodegeneration following local endotoxin infusion in gerbils. *Brain Res.* 892:13-26.

7. ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

A	A/I-Ratio	Ratio der Bindungsaffinitäten mAk zu aktivierenden (A) und inhibierenden (I) FcR
	Abb.	Abbildung
	ADAM	Disintegrin und Metalloprotease (a disintegrin and metalloprotease)
	ADCC	antikörper-abhängige-zelluläre-Zytotoxizität (ab-dependent cellular cyto-toxicity)
	Ak (Ab)	Antikörper (antibody)
	Amp	Ampicillin
	ANGPTL4	angiopoietin-related protein 4
	APC	Allophycocyanin
	APOE	Apolipoprotein E
	APOLD1	apolipoprotein L domain containing 1
	APP	amyloid precursor protein
	APS	Ammoniumperoxodisulfat
	AS	Aminosäure
	ASN	Asparagin
	ATP	Adenosintriphosphat
B	BCA	Bicinchoninsäure
	BIA	Biomolekulare Interaktions-Analysen
	bp	Basenpaar
	BSA	bovines Serumalbumin
	bsAk (bsAb)	bispezifischer Antikörper (bispecific antibody)
	bzw.	beziehungsweise
C	ca.	zirka
	CAM	Zelladhäsionsmolekül (cell adhesion molecule)
	CAM Assay	chicken chorioallantoic membrane assay
	CD	Differenzierungscluster (cluster of differentiation)
	CDC	komplementabhängige Zytotoxizität (complement dependant cell cytotoxicity)
	cDNA	komplementäre Desoxyribonukleinsäure
	CDR	komplementaritätsbestimmende Region (complementary-determining regions)
	C _H 1-3	konstante Domänen 1-3 der schweren Immunglobulinkette (Constant Heavy)
	CHL1	close homologue of L1
	C _K	konstante Domäne der leichten Kappa Kette (Constant Kappa)
	C _L	konstante Domäne der leichten Kette (Constant Light)
	Cl ₂ MDP-Lip	Clodronat-Liposomen
	cpm	counts per minute
D	d	Tage (days)
	DC	Dendritische Zellen
	ddH ₂ O	doppelt destilliertes Wasser

Abkürzungsverzeichnis

	DDIT4	DNA-damage-inducible transcript 4
	DEPC	Diethylpyrocarbonate
	DKFZ	Deutsches Krebsforschungszentrum
	DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium (Zellkulturmedium)
	DMSO	Dimethylsulfoxid
	DNA	Desoxyribonukleinsäure
	DNase	Desoxyribonuklease
	dNTP	Desoxyribonukleotidtriphosphat
	dsFv	disulfidbrückenstabilisiertes scFv-Fragment
	DTT	Dithiothreitol
E	E.coli	Escherichia coli
	ECL	enhanced chemiluminescence
	EDTA	Ethylendiamintetraacetat
	EGFR	epidermaler Wachstumsfaktor Rezeptor (Epidermal-Growth-Factor-Receptors)
	ELISA	Enzyme linked immunosorbent assay
	EMA	Europäische Arzneimittelagentur (European Medicines Agency)
	EMT	Übergang vom epithelialen zum mesenchymalen Zustand (epithelial-mesenchymal-transition)
	EpCAM	epitheliales Zelladhäsionsmolekül (epithelial cell adhesion molecule)
	ERK	extracellular signal-regulated kinase
	EST	expressed sequence tag
F	F4/80	Maus Makrophagen Oberflächenantigen
	Fab	antigenbindendes Fragment (Fragment antigen binding)
	FACS™	Fluoreszenz-aktivierte Zellseparation (fluorescence-activated cell sorter)
	Fc	kristallisierbares Fragment (fragment crystalline)
	FcR	Fc-Rezeptoren
	FcRn	neonataler Rezeptor für das Fc-Fragment
	FCS	fötales Kälberserum
	FcγRIII	Rezeptor für das Fc-Fragment bestimmter Antikörperisotypen
	FDA	Amerikanische Zulassungsbehörde (Food and Drug Administration)
	FGF	Fibroblasten Wachstumsfaktor (fibroblast growth factor)
	FIGO	International Federation of Gynecology and Obstetrics
	FITC	Fluoresceinisothiocyanat
	FN-III	Fibronektin III
	FSC	forward scatter
	Fuc	Fukose
	Fv	variables Fragment
G	g	Gramm
	g	Erdbeschleunigung
	G418	Geneticin

	GAHu	Ziege-anti-Mensch Antikörper
	Gal	Galaktose
	GAM	Ziege-anti-Maus Antikörper
	GlcNAc	N-Acetylglucosamin
	Gr1	Maus Granulotyten Oberflächenantigen
H	h	Stunden (hours)
	HAHA	Immunantwort des Menschen gegen Menschantigene (humane anti-Human Ak)
	HAMA	Immunantwort des Menschen gegen Mausantigene (humane anti-Maus Ak)
	HE	Hematoxylin-Eosin
	HEPES	4-(2-Hydroxyethyl)-1-Piperazin Ethansulfonsäure
I	i.p.	intraperitoneal
	IC	Immunkomplexe (immune complex)
	Ig	Immunglobulin
	IgA,D,E,G,M	Immunglobulin Isotypen mit schwerer $\alpha, \delta, \epsilon, \gamma, \mu$ Kette
	IL	Interleukin
	ITAM	immunoreceptor tyrosine-based activating motiv
	ITGB2	Integrin $\beta 2$
	ITIM	immunoreceptor tyrosine-based inhibition motiv
K	k_a	Assoziationskonstante
	kb	Kilobasen
	k_d	Dissoziationskonstante
	K_D	Bindungskonstante
	kDa	Kilodalton
	kg	Kilogramm
	KG	Körpergewicht
L	L	Liter
	L1CAM/L1	L1 Zelladhäsionsmolekül
	L1-ICD	lösliches zytoplasmatisches Fragment
	LB	Luria Bertani Medium
M	M	Mol
	mA	Milliampere
	Mac	Makrophagen
	MAD	mittlere absolute Abweichung (median absolute deviation)
	mAk	monoklonaler Antikörper
	Man	Mannose
	mg	Milligramm
	MG	Molekulargewicht
	MIAME	Minimum information about a microarray experiment
	min	Minuten

Abkürzungsverzeichnis

	ml	Milliliter
	mm	Millimeter
	mM	Millimol
	Mo	Monozyten
	mRNA	Boten-Ribonukleinsäure (messenger ribonucleinacid)
	MW	Mittelwert
N	Neu5Ac	Sialinsäure
	Nfasc	Neurofascin
	ng	Nanogramm
	NK	Natürliche Killerzelle
	nm	Nanometer
	NrCAM	Neuron-glia (Ng) related cell adhesion molecule
	NRP-1	Neuropilin-1
O	OD	Optische Dichte
	ORF	offenes Leseraster (open reading frame)
	OSE	ovariellen Epithelgewebe
P	PBMC	periphere Blut mononukleäre Zellen (Peripheral blood mononuclear cells)
	PBS	Phosphate buffered saline
	PBS-Lip	PBS-Liposomen
	PCNA	proliferating cell nuclear antigen
	PCR	Polymerase-Ketten (chain)-Reaktion
	PE	R-Phycoerythrin
	pH	potentia hydrogenii
	PI	Propidiumiodid
	PSA	prostate specific antigen
	PVDF	Polyvinylidendifluorid
R	RNA	Ribonukleinsäure
	RNase	Ribonuklease
	rpm	Umdrehungen pro Minute (round per minute)
	RPMI	Roswell Park Memorial Institute (Zellkulturmedium)
	RT	Raumtemperatur
	RT-PCR	Reverse-Transkriptase-Kettenreaktion (reverse transcriptase polymerase chain reaction)
	RU	resonance units (Signalstärke)
S	s	Sekunden
	scFv	einzelkettiges variables Fragment (single-chain variable fragment)
	SD	Standardabweichung (Standard deviation)
	SDS	Natriumdodezylsulfat (sodium dodecyl sulfate)
	SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese
	SEM	Standardfehler (Standard error of the mean)

	Sema3A	semaphorin3A
	sL1	lösliches L1
	SPR	Oberflächen-Plasmon Resonanz (Surface Plasmon Resonance)
	SSC	Seitwärtsscatter (side scatter)
T	TBS	Tris-gepufferte Salzlösung (tris buffered saline)
	TE	Tris-EDTA
	TEMED	Tetramethylethylendiamin
	Tet	Tetrazyklin
	TGF- β 1	Transformations-Wachstumsfaktor- β 1 (<i>transforming growth factor β1</i>)
	TNF- α	Tumor Nekrose Faktor α (tumor necrosis factor α)
	TRAIL	TNF-related apoptosis-inducing ligand
	Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
U	U	Einheiten (Unit)
	ü.N.	über Nacht
	UV	Ultraviolett
V	VEGFR	Vascular Endothelial Growth Factor receptor
	V _H	variable Domäne der schweren Kette (Variable Heavy)
	V _L	variable Domäne der leichten Kette (Variable Light)
W	WISP2	WNT1-inducible-signaling pathway protein 2
Z	z.B.	zum Beispiel
	Δ	Delta
	°C	Grad Celsius
	α	Alpha
	β	Beta
	γ	Gamma
	κ	Kappa
	λ	Lambda
	μ g	Mikrogramm
	μ l	Mikroliter

8. ANHANG

8.1 Liste der regulierten Gene nach L1/IgG2a mAk Behandlung
mittels Genexpressionsanalyse

		Expressionswert (Log ₂)				
		L1-9.3/IgG2a		Kontrolle		
Probe ID	Symbol	118	120	121	122	Regulation
5670465	ADM	11,56	11,1	12,91	13,28	0,29
3800047	AIF1	9,71	10,19	8,74	8,25	2,74
5270519	ALPK2	8,14	7,94	7,34	7,07	1,78
4610433	ANGPTL4	7,51	7,07	8,27	8,79	0,42
240682	ANKRD37	7,85	7,97	9,06	9,95	0,33
730414	APOE	13,07	13,33	11,82	11,63	2,78
1770364	APOLD1	6	5,9	6,82	7,15	0,49
4280746	ATP2A1	7,62	6,08	6	6,15	1,71
3450347	BIRC7	8,79	8,07	7,7	8,57	1,23
2640192	BNIP3L	10,19	10,38	10,78	11,3	0,59
2900747	C10orf10	7,29	6,74	8,25	8,49	0,39
160242	C13orf15	7,04	6,92	7,85	7,83	0,55
2230156	C15orf52	9,76	9,72	8,89	8,6	1,99
6480397	C19orf18	7,98	8,93	7,86	7,93	1,47
2510068	C1orf51	7,01	7,41	8,12	8,13	0,53
150474	CA12	10,9	12,38	12,1	12,34	0,67
3830075	CA12	9,21	10,41	10,06	10,51	0,72
6040626	CA9	10,36	10,13	10,93	11,56	0,50
450750	CAPN13	10,01	11,38	10,76	10,74	0,96
940010	CHCHD10	8,71	7,7	7,74	7,72	1,39
3830315	CKMT2	7,22	6,08	5,89	5,97	1,65
6420475	CLDN2	9,95	11	9,99	9,81	1,49
5050220	CLPS	5,74	5,79	5,68	7,12	0,64
5080601	COBLL1	10,34	10,97	11,24	11,51	0,61
5910431	COL4A1	11,74	10,94	10,68	10,43	1,72
2490593	COL7A1	9,4	8,82	7,73	8,1	2,29
6110079	CRYAB	11,32	9,46	8,97	9,15	2,51
3400292	CXCL1	8,52	7,46	7	7,2	1,85
7320288	CXCR4	6,15	5,98	7,17	7,52	0,41
50368	DCN	7,93	7,5	6,81	6,51	2,08
3190148	DDIT4	11,57	11,72	12,55	13,07	0,45
7040670	DHRS3	8,83	10,47	10,23	10,67	0,57
4290431	DPYSL3	10,41	9,62	9,34	9,37	1,58
4570253	DTNA	7,14	6,04	6,13	6,22	1,33
6860377	DUSP1	11,22	10,54	11,53	11,83	0,57

Expressionswert (Log ₂)						
Probe ID	Symbol	L1-9.3/IgG2a		Kontrolle		Regulation
		118	120	121	122	
6250468	DUSP6	7,13	8,02	7,96	8,56	0,62
4640402	DUXAP3	9,76	10,09	9,1	9,03	1,82
6400598	EDN2	6,43	6,25	7,19	7,21	0,55
4040048	EIF4H	7,82	7,61	8,62	8,72	0,52
840678	ENPP2	9,27	10,49	10,26	10,23	0,78
3370768	FAM129A	9,19	8,12	8,36	8	1,39
4280017	FOS	7,97	7,83	8,57	9,03	0,54
6960332	FOSL1	8,81	8,19	9,6	9,3	0,52
4640086	FOXQ1	7,87	7,75	8,91	8,55	0,53
270358	FRAS1	10,78	10,67	10,16	9,65	1,77
1260468	GAL3ST1	8,55	7,98	9,43	9,64	0,41
5090671	GDF15	10,96	11,09	11,74	12,37	0,49
5690270	GPRC5A	8,4	7,72	8,74	8,77	0,62
5340017	H19	7,9	6,94	7,04	8,27	0,85
7150661	HK2	7,22	6,8	7,9	8,16	0,49
4900731	HLA-DMB	12	13,14	12,65	13,15	0,80
6660601	HMOX1	8,33	7,35	7,58	8,47	0,88
5960095	HNRNPA2B1	8,38	8,82	7,74	7,77	1,80
160092	HSPA6	7,12	6,42	7,4	7,79	0,56
7570324	ID3	10,11	11,63	10,87	10,73	1,05
2120524	IGFBP5	7,11	7,33	7,06	8,2	0,75
2190674	IGFBP5	7,55	7,87	7,32	8,69	0,82
1740451	IL1R2	7,77	8,85	8,59	8,81	0,76
3440754	IL32	9,89	9,22	8,8	8,84	1,66
4040576	IL6	8,03	6,72	6,84	6,59	1,58
1340743	IL8	11,55	10,55	10,4	10,8	1,37
3890373	ITGB2	9,3	8,95	10,11	10,46	0,45
7200156	ITGB2	8,89	8,68	9,72	10,09	0,46
7000064	KCNH6	11,52	11,87	10,79	10,75	1,90
3370544	KCNJ16	8,97	9,61	8,4	8,63	1,71
5900008	KLK11	8,4	8,78	9,61	9,39	0,53
3800161	KRT7	10,17	9,05	8,7	8,66	1,91
4830520	KRT80	12,21	11,15	11,11	10,82	1,64
2340193	KRT80	8,47	7,74	7,34	7,41	1,66
730040	LAMB3	10,93	10	10,01	9,71	1,52
2230594	LAMC2	9,27	8,32	8,27	7,96	1,60
4390100	LAMC2	10,52	9,57	9,23	9,1	1,84
5360301	LMO3	8,42	9,58	9,85	9,7	0,58
5310328	LRRC31	6,66	7,99	7,08	7,59	0,99
5220678	LRRC33	8,65	8,45	7,85	7,47	1,85
4810398	LRRN4	9,73	9,2	8,91	8,44	1,73

Expressionswert (Log ₂)						
Probe ID	Symbol	L1-9.3/IgG2a		Kontrolle		Regulation
		118	120	121	122	
2350537	MMP7	12,65	12,51	11,56	11,22	2,28
3800088	MMP7	13,33	13,29	12,21	11,9	2,39
1990189	MT1B	6,64	6,22	7,31	7,52	0,51
1740209	MXRA8	8,2	7,81	7,32	6,85	1,89
6100360	MYEOV	8,45	7,69	8,9	8,75	0,59
4730435	MYL1	10,68	6,17	6	6,13	5,13
5390600	NA	8,11	7,37	8,65	8,95	0,48
6020112	NA	9,86	10,62	11	10,88	0,62
150441	NA	10,84	11,04	11,21	12,02	0,63
7210035	NA	8,45	9,31	9,22	9,89	0,63
2940039	NA	6,15	7,52	7,2	7,25	0,76
5560195	NA	8,63	7,63	7,56	7,23	1,66
6980376	NA	7,49	6,71	6,33	6,35	1,69
4570075	NA	8,23	8,82	7,72	7,81	1,69
650554	NA	9,65	8,92	8,57	8,47	1,70
3840047	NA	7,45	8,23	7,11	7,03	1,71
5090333	NA	7,64	6,6	6,27	6,35	1,75
3990224	NA	8,71	8,88	7,93	7,98	1,79
3360692	NA	8,58	8,02	7,44	7,23	1,95
2060184	NA	7,52	7,53	6,68	6,42	1,97
3400762	NA	11,1	10,69	9,84	9,93	2,01
3370201	NA	11,27	11,14	10,1	9,82	2,37
4390215	NA	8,64	5,96	5,83	5,83	2,77
5490360	NA	11,56	6,2	6,11	5,98	7,14
1230070	NDRG1	10,25	9,84	10,77	11,19	0,52
7550603	NKAIN4	7,62	6,75	6,56	6,61	1,52
6840301	NT5DC2	8,47	7,99	7,77	7,25	1,65
4730309	PCCA	11,13	11,62	11,88	12,3	0,61
3310504	PDK4	8,75	8,66	9,75	9,84	0,47
770463	PDLIM3	8,45	7,59	7,29	7,41	1,59
7400653	PFKFB4	9,19	8,98	9,72	10,41	0,51
1570039	PILRB	8,84	9,43	8,32	8,45	1,68
3830041	PMEP A1	9,24	8,33	8,23	8,16	1,51
240400	PMEP A1	10,02	9,2	8,85	8,84	1,70
5720639	PPP1R1B	9,14	9,79	10,24	10,54	0,53
6580593	PPP1R3C	7,36	7,83	8,25	8,72	0,54
3370129	RASL11B	8,48	7,97	7,6	7,28	1,72
5810678	RENBP	8,41	8,47	7,66	7,42	1,87
2600397	RPESP	6,78	7,84	6,9	6,93	1,31
1690563	SAA1	8,03	7	7,04	6,81	1,51
7040487	SCNN1A	9,14	10	10,54	10,15	0,58

Expressionswert (Log ₂)						
Probe ID	Symbol	L1-9.3/IgG2a		Kontrolle		Regulation
		118	120	121	122	
7550292	SELENBP1	8,22	9,53	9,01	9,01	0,91
6280168	SERPINA3	10,77	9,8	9,76	9,7	1,47
3710040	SFN	10,2	9,21	9,29	9,14	1,40
5670286	SHISA3	6,79	7,35	7,7	7,95	0,59
5560400	SLC14A1	7,21	8,55	7,83	8,56	0,80
20634	SLC14A2	8,84	8,69	9,52	9,76	0,55
730164	SLC40A1	8,16	8,77	8,82	9,37	0,65
6860047	SNAR-A2	12,21	13,42	13,21	13,8	0,62
1690678	SNF1LK	8,77	7,85	8,91	9,07	0,62
3890095	SOD3	7,83	10,25	8,99	9,23	0,95
1030021	SPARCL1	10,89	9,52	9,75	9,55	1,47
3310692	SPRY1	7,98	8,89	9,06	8,91	0,68
6760669	SPRY1	8,56	9,52	9,6	9,51	0,70
1500113	SST	8,72	10,52	9,04	9,99	1,08
2650730	STC1	10,2	10,71	11,18	11,34	0,57
5910500	SYT11	8,22	7,94	7,25	7,04	1,91
650678	TAGLN	9,82	9,34	8,72	8,23	2,15
4050491	TCEA3	8,4	6,86	6,62	6,45	2,14
4280674	TFPI	9,26	9,8	10,36	11,05	0,44
1340039	TFPI	12	12,83	13,11	13,58	0,52
4850731	TFPI	12,42	13,31	13,53	13,97	0,54
7650358	TGFBI	9,73	8,88	8,09	7,97	2,42
1580435	TGM2	9,88	8,89	8,97	8,77	1,43
5810685	THBS1	7,85	7,11	6,91	6,72	1,59
2640301	TNF	8,17	7,82	7,02	7,31	1,78
870202	TNFSF10	8,74	10,1	8,83	8,73	1,56
7050543	TUBB2B	9,49	9,13	8,53	8,48	1,75
7560661	UBE2L3	7,14	6,93	7,5	8,15	0,58
4120553	WISP2	8,18	7,61	8,62	9,21	0,49
1980403	ZNF395	10,4	10,11	11,07	11,12	0,56

8.2 Publikationen und Patente

Wolterink S, Moldenhauer G, Fogel M, Kiefel H, Pfeifer M, Gouveia G, Pumphrey N, Moebius U und Altevogt P. (2010). Therapeutic antibodies to human L1-CAM: functional characterisation and application. *Cancer Research*; in press

Keller, S., König, A.K., Marme, F., Runz, S., Wolterink, S., Koensgen, D., Mustea, A., Sehouli, J., und Altevogt, P. (2009). Systemic presence and tumor-growth promoting effect of ovarian carcinoma released exosomes. *Cancer Lett.* 278:73-81.

Riedle, S., Kiefel, H., Gast, D., Bondong, S., Wolterink, S., Gutwein, P., und Altevogt, P. (2009). Nuclear translocation and signalling of L1-CAM in human carcinoma cells requires ADAM10 and presenilin/gamma-secretase activity. *Biochem J.* 420:391-402.

Gast D, Altevogt P, Moldenhauer G, Breitling F, Krüger A; Wolterink S, Lüttgau S, Möbius U, Li Y. Patent: Treatment of tumors using specific anti-L1 antibody. WO/2008/151819.

Ruigrok, Y.M., Wolterink, S., Seitz, U., Rinkel, G.J., Wijmenga, C., und Urban, Z. (2004). Association of polymorphisms and haplotypes in the elastin gene in Dutch patients with sporadic aneurysmal subarachnoid hemorrhage. *Stroke.* 35:2064-8.