

Institut für Allgemeine Pathologie und Pathologische Anatomie
der Technischen Universität München

**Rekombinante disulfidstabilisierte Immuntoxine gegen mutiertes E-Cadherin
zur spezifischen Krebstherapie**

Jörg Mages

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Chemie
der Technischen Universität München zur Erlangung des akademischen Grades eines
Doktors der Naturwissenschaften
genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Univ.-Prof. Dr. H. Kessler

Prüfer der Dissertation: 1. Priv.-Doz. Dr. K.-F. Becker
2. Univ.-Prof. Dr. J. Buchner

Die Dissertation wurde am 13.12.2004 bei der Technischen Universität München
eingereicht und durch die Fakultät für Chemie am 04.04.2005 angenommen.

1	Zusammenfassung	1
2	Einleitung	3
2.1	Magenkarzinom	3
2.2	Ein Zielmolekül therapeutischer Intervention beim Magenkarzinom: E-Cadherin	4
2.2.1	Zelladhäsionsmoleküle: ein Überblick	4
2.2.2	E-Cadherin: Struktur und Funktion	6
2.2.3	Mutationen im E-Cadherin Molekül	9
2.2.4	Internalisierung des E-Cadherins.....	11
2.3	Antikörperbasierte Tumorthapieansätze	13
2.3.1	Überblick.....	13
2.3.2	Immuntoxine	15
2.3.3	Pseudomonas Exotoxin A	16
2.3.4	Rekombinante Immuntoxine mit PE als Fusionspartner.....	19
2.4	Zielsetzung	21
3	Material und Methoden	22
3.1	Material.....	22
3.1.1	Chemikalien, Lösungsmittel und Medien.....	22
3.1.2	Puffer.....	22
3.1.3	Kommerzielle Komplettsysteme.....	26
3.1.4	Antibiotika.....	27
3.1.5	Enzyme	27
3.1.6	Bakterienstämme.....	27
3.1.7	Zelllinien.....	27
3.1.8	Oligonukleotide (Primer)	28
3.1.9	Peptide	28

3.1.10	Antikörper	29
3.1.11	Medien und Reagenzien für die Zellkultur	29
3.1.12	Verbrauchsmaterial.....	29
3.1.13	Geräte.....	30
3.2	Methoden.....	31
3.2.1	Zellkultur.....	31
3.2.2	DNA-Sequenzierung	31
3.2.3	DNA-Isolierung.....	31
3.2.4	RNA-Isolierung.....	32
3.2.5	Reverse Transkription (RT).....	32
3.2.6	Polymerasekettenreaktion (PCR).....	33
3.2.7	Aufreinigung von PCR-Fragmenten.....	33
3.2.8	Transformation kompetenter Bakterien.....	34
3.2.9	Primer-vermittelte Mutagenese (Einführung von Cystein Mutationen)	34
3.2.10	F(ab) Herstellung	36
3.2.11	Immunfluoreszenz	36
3.2.12	Native E-Cadherin FACS (Durchflußzytometrie)	37
3.2.13	Quantitative indirekte Immunfluoreszenz (QIIF)	38
3.2.14	Chemische Kopplung der mutationsspezifischen Antikörper mit <i>Pseudomonas</i> Exotoxin A	38
3.2.15	Proteinexpression und Aufreinigungen.....	39
3.2.16	Proteinlysate aus eukaryontischen Zellen	43
3.2.17	Quantifizierung von Proteinen	44
3.2.18	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE).....	44
3.2.19	Proteintransfer auf PVDF-Membran (Western-Blot)	44
3.2.20	Immundetektion von Proteinen.....	45

3.2.21	Biacore Analysen (Surface Plasmon Resonance, SPR)	45
3.2.22	Klonierung der dsFv Fragmente	48
3.2.23	Proteinsequenzierung 6H8 und 6D8 leichte Ketten	53
3.2.24	Screening von humanen kombinierten Antikörper-Bibliotheken (HuCAL).....	53
3.2.25	Zytotoxizitäts-Assays	54
4	Ergebnisse	57
4.1	Charakterisierung der mutationsspezifischen Antikörper.....	57
4.1.1	Herstellung verschiedener E-Cadherin EC2-EC3-Varianten	57
4.1.2	Bindungseigenschaften der Antikörper	60
4.2	MPE600 und HSC45-M2: Zelllinien, die endogen Exon 9 deletiertes E-Cadherin exprimieren..	65
4.2.1	Quantitative indirekte Immunfluoreszenz.....	69
4.3	Charakterisierung chemisch konjugierter Immuntoxine gegen mutiertes E-Cadherin.....	70
4.3.1	Pseudomonas Exotoxin A gekoppelt an Anti- Δ 9 E-Cadherin Antikörper 6H8 (6H8PE38QQR)	70
4.4	HuCAL Screening: Generierung humaner mutationsspezifischer Antikörper	74
4.5	Charakterisierung rekombinant hergestellter dsFv Konstrukte.....	76
4.5.1	Klonierung, Expression und Aufreinigung	76
4.5.2	Spezifität der dsFv Konstrukte.....	83
4.5.3	Bindungskinetiken der dsFv Konstrukte	87
4.5.4	Zytotoxizität der dsFv Konstrukte	88
4.5.5	Zytotoxischer Effekt des 7E6dsFvkdcl Immuntoxins im zeitlichem Verlauf	93
5	Diskussion	97
6	Abkürzungen	116
7	Literatur.....	118

1 Zusammenfassung

Die Entdeckung zweier somatischer Mutationen, die im extrazellulären Bereich des Zelladhäsionsmoleküls E-Cadherin zum Verlust von Exon 8 oder Exon 9 auf Proteinebene führen, bildeten die Grundlage dieser Arbeit. Die endogene Expression dieser zwei E-Cadherin Mutanten konnte im diffus wachsenden Magenkarzinom bei etwa 40 Prozent der untersuchten Patienten nachgewiesen werden (Becker et al. 1994). Diese Mutationen sind tumorbiologisch von großer Bedeutung, da sie die Zellmorphologie verändern, die Adhäsion verringern und zu einer Erhöhung der Motilität von Zellen führen können (Handschuh et al. 1999). So zeigen diese Mutationen einen ähnlichen Phänotyp wie die verringerte Expression des E-Cadherins, was ein Charakteristikum vieler epithelialer Tumore ist. Der Verlust oder die Verminderung der E-Cadherin Expression korreliert mit Faktoren wie Tumorprogression, Dedifferenzierung, Invasion, Erhöhung des metastatischen Potentials und schlechter Prognose.

Durch den Verlust des Exons 8 bzw. des Exons 9 entstehen neue Übergangsepitope (zwischen Exon 7 und Exon 9 bzw. Exon 8 und Exon 10). Unter Ausnutzung der neuen Epitope konnten monoklonale, tumorspezifische Antikörper generiert werden, die als Vorlage für eine immunbasierte Tumorintervention dienten. Ziel der Arbeit war die Herstellung funktionaler rekombinanter Immuntoxine gegen die Deletionsmutationen im E-Cadherin, ausgehend von den Hybridomzell-RNAs der mutationsspezifischen Antikörper.

Mit verschiedenen Ansätzen wurde der Weg für eine mögliche spezifische Intervention für Mutationsträger mit Hilfe dieser Antikörper bereitet:

- 1.) Der Antikörper 6H8 - spezifisch gegen Exon 9 deletiertes E-Cadherin ($\Delta 9$ E-Cadherin) - wurde mittels konventioneller Proteinchemie mit einer modifizierten Form des Pseudomonas Exotoxins A gekoppelt und auf Spezifität der Bindung und Zytotoxizität getestet.

2.) Aus den Hybridomzellen zweier $\Delta 8$ E-Cadherin (Exon 8 deletiertes E-Cadherin) und zweier $\Delta 9$ E-Cadherin spezifischer Antikörper wurden die variablen Regionen der Antikörper mittels RT-PCR amplifiziert, kloniert und charakterisiert. Die Sequenzen dienten als Basis zur Expression von fünf verschiedenen disulfidstabilisierten Immuntoxinen (dsFv) in *Escherichia coli* (*E. coli*) mit einer Deletionsmutante des Pseudomonas Exotoxins A als Toxinpartner. Diese wurden ebenfalls auf Spezifität der Bindung und Zytotoxizität getestet. Mittels Biacore Analysen konnten die Bindungsstärken der dsFvs gegen rekombinante $\Delta 8$ E-Cadherin und $\Delta 9$ E-Cadherin Proteine, hergestellt in *E. coli*, charakterisiert werden.

Für das $\Delta 9$ E-Cadherin konnte ein funktionales und mutationsspezifisches Immuntoxin realisiert werden. Das dsFv Konstrukt, kloniert auf Grundlage des Antikörpers 7E6 (7E6dsFv), zeigt ausgezeichnete Spezifität. Kreuzreaktivität zu nicht mutiertem E-Cadherin konnte nicht festgestellt werden. Die Bindungseigenschaften des Konstruktes sind in ihrer Stärke mit dem Ausgangsantikörper vergleichbar. In einem humanen Zellkultursystem zeigt das Immuntoxin spezifische Zytotoxizität.

Schlussfolgerung:

Es konnte gezeigt werden, dass die zwei E-Cadherin Deletionsmutanten $\Delta 8$ und $\Delta 9$ E-Cadherin ausgezeichnete, tumorspezifische Zielmoleküle für eine mögliche Tumorthherapie beim diffusen Magenkarzinom darstellen.

2 Einleitung

Jährlich sterben in Deutschland mehr als zweihunderttausend Menschen an den Folgen einer bösartigen Tumorerkrankung. Dies ist, nach Erkrankungen des Herzkreislaufsystems die zweithäufigste Todesursache (Statistisches Bundesamt 1997-2000). Mit etwa 90 Prozent stellen Karzinome, Tumore epithelialen Ursprungs, die häufigste Tumorart dar. Seltener treten Sarkome, Tumore mesenchymalen Ursprungs, und Leukämien, Tumore des blutbildenden Systems, auf.

2.1 Magenkarzinom

Adenokarzinome, Tumore des Drüsengewebes und somit epithelialen Ursprungs, stellen mit 95 Prozent die häufigste maligne Neoplasie des Magens dar. Selten sind dagegen Lymphome, Sarkome und neuroendokrine Tumore (Karzinoide) (Coit und Brennan 1990). Histopathologisch können nach Laurén zwei Muster des Tumorwachstums unterschieden werden: Das diffuse Magenkarzinom und der intestinale Typ (Laurén 1965). Im diffusen Magenkarzinom infiltrieren die Zellen einzeln das Gewebe und bilden nicht kohäsive Zellansammlungen. Zeigen die Tumorzellen mehr als 50 Prozent intrazelluläre Mucineinlagerungen, liegt ein sogenanntes Siegelringzellkarzinom (engl.: signet ring cell carcinoma) vor. Tumorgewebe und Normalgewebe kann beim diffusen Magenkarzinom oft schlecht abgegrenzt werden. Einzelne Tumorzellen können noch in einer Entfernung von 10 Zentimetern vom makroskopisch sichtbaren Tumor nachgewiesen werden (Werner et al. 2002). Im Gegensatz hierzu bilden intestinale Karzinome zusammenhängende, drüsenähnliche, tubuläre Strukturen aus. Der intestinale Typ zeigt im Vergleich zum diffus wachsenden Typ eine bessere Prognose. Die 5-Jahresüberlebensrate (5-JÜ) ist assoziiert mit der Klassifikation des Tumors (Nodalstatus, Infiltration). Nodal negative Tumore zeigen eine 5-JÜ von 90 Prozent, sind Lymphknoten befallen, sinkt die Überlebensrate auf 70 Prozent. In späteren Stadien, in denen Tumorzellen die Serosa durchbrochen haben oder in benachbarte Organe eingewandert sind, sinkt die 5-JÜ im ersten Fall auf 70 Prozent bzw. bei Befall der Lymphknoten unter 10 Prozent (Fuchs und Mayer 1995).

In **Abbildung 1** sind die Inzidenzraten verschiedener Länder für das Magenkarzinom abgebildet. Die Inzidenz für ein Magenkarzinom zeigt geographisch große Unterschiede, ist jedoch weltweit tendenziell rückläufig. Höher entwickelte Länder zeigen für des Magenkar-

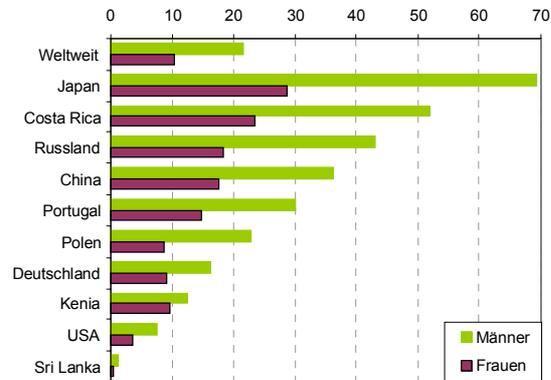


Abbildung 1 : Geschätzte Magenkarzinomraten für verschiedene Staaten basierend auf Daten der Jahre 1993 bis 1997 (Globoscan 2000, 2001). Gezeigt sind Fälle pro 100.000 Einwohner pro Jahr. Die Daten sind altersangepasst an eine Welt-Standard Altersverteilung.

zinom eine höhere Inzidenz (36 Fälle pro 100.000 Menschen pro Jahr) als weniger entwickelte, mit etwa 14 Fällen pro 100.000 Menschen pro Jahr. Generell ist die Inzidenzrate für Männer deutlich höher als für Frauen. Weltweit erkranken circa 700.000 Menschen jährlich an einem Magenkarzinom.

2.2 Ein Zielmolekül therapeutischer Intervention beim Magenkarzinom: E-Cadherin

2.2.1 Zelladhäsionsmoleküle: ein Überblick

Mechanismen zur Erhaltung von Zell-zu-Zell Kontakten und Kontakten an extrazelluläre Matrices (EZM) sind für die Entstehung und die Erhaltung von mehrzelligen Lebewesen essenziell. Zelladhäsion spielt für viele biologische Prozesse eine bedeutende Rolle. Wachstum, Differenzierung und Bewegung der Zelle sind über Mechanismen der Adhäsion gesteuert. Hierdurch ergibt sich eine mögliche Beteiligung einer fehlgesteuerten Adhäsion bei der Entstehung von Tumoren. Damit Tumorzellen invasiv wachsen können, müssen drei Grundvoraussetzungen vorhanden sein. Diese sind Veränderungen der Mikroumgebung,

hauptsächlich Proteolyse, sowie Veränderungen der Adhäsionseigenschaften und Migration. Veränderungen der adhäsiven Eigenschaften ereignen sich zwischen den Tumorzellen selbst, zwischen Tumor- und Stromazellen, Endothelzellen und dem interstitiellen Stroma, sowie der Basalmembran. Gleichartige Zellen eines Gewebes gehen homotypische Interaktionen ein; von heterotypischen Interaktionen spricht man z. B. bei der Adhäsion von Tumorzellen an die Endothelzellen der Blutgefäße. Aufgrund struktureller Unterschiede werden vier Familien von Zelladhäsionsmolekülen unterschieden: Integrine, die Immunglobulin (Ig)- Superfamilie, Selektine und Cadherine. Fast alle Vertreter sind glykosylierte Transmembranproteine.

Integrine sind Heterodimere bestehend aus jeweils einer α - und einer β -Untereinheit. Bis heute sind 16 verschiedene α - und acht β -Ketten beschrieben, die sich zu 22 nicht kovalent verbundenen Heterodimeren zusammensetzen. Die heterophile Bindung der Integrine wird über die β -Kette vermittelt, während die α -Kette eine Kalziumbindungsstelle aufweist. Verschiedene Integrine vermitteln die Bindung an die extrazelluläre Matrix, sind aber auch für Zell-zu-Zell-Interaktionen verantwortlich. Als Beispiel hierfür können $\alpha 6 \beta 1$ -Integrine gelten, die Mediatoren für die Adhäsion metastatischer Tumorzellen an das vaskuläre Epithel der Lunge sind (Ruiz et al. 1993). In vielen Adenokarzinomen gilt die erhöhte Expression des Lamininrezeptors 67LR als ein molekularer Marker für das metastatische Potential (Übersichtsartikel: Montuori und Sobel 1996).

Gemeinsames Merkmal der Vertreter der **Ig-Superfamilie** sind eine oder mehrere immunglobulinähnliche Domänen. Als erstes Zelladhäsionsmolekül dieser Familie wurde N-CAM (neural cell adhesion molecule) beschrieben (Cunningham et al. 1987). Es weist extrazellulär mehrere Wiederholungen immunglobulinähnlicher Domänen und in Membrannähe zusätzlich Fibronectin Typ III- Domänen auf. Seine Bindungsfunktion ist im Gegensatz zu den Cadherinen (s.u.) kalziumunabhängig. Neben den in der Regel homophilen Bindungen wurden auch heterophile Interaktionen mit Heparansulfat gefunden (Cole und Glaser 1986, Reyes et al. 1990). Weitere Vertreter dieser Molekülfamilie wie ICAM-1 (intercellular adhesion molecule) und VCAM-1 (vascular cell adhesion molecule) zeigen hingegen

ausschließlich heterophile Bindungseigenschaften. Das Adhäsionsmolekül CD44 wurde ursprünglich als so genannter lymphocyte homing-Rezeptor beschrieben, der die Adhäsion von Lymphozyten an spezialisierte Endothelzellen in den HEV (high endothelial venules) vermittelt (Jalkanen et al. 1986). *In vivo* Expressionsstudien haben gezeigt, dass die Expression einer Spleiß-Variante eines CD44 Homologs metastatisches Verhalten auslösen kann (Gunthert et al. 1991).

Selektine werden von Leukozyten, Blutplättchen und Endothelzellen exprimiert. Ihre Bindung wird durch die C-Typ Lektin Domäne an spezifische Kohlenhydratgruppen vermittelt und ist kalziumabhängig. Die Bindung der Selektine ist eher transient und vermittelt das sogenannte „rolling“ von Leukozyten auf Endothelzellen.

Zu der **Cadherin** Superfamilie zählen die klassischen Cadherine, desmosomale Cadherine, die Protocadherin Familie, die FAT Tumorsuppressoren, die Tyrosinkinase ret und die „Seven-pass“ Transmembran-Cadherine. Insgesamt sind in einer einzigen Spezies mindestens 80 Vertreter dieser Familie bekannt (Yagi und Takeichi 2000). Allen Cadherinen gemeinsam ist das Vorhandensein von sich wiederholenden Cadherin-Domänen (EC). Die Anzahl der Domänen ist für die unterschiedlichen Unterklassen der Cadherine charakteristisch und liegt zwischen zwei bis zu 34 Domänen. Die Cadherin-Domänen weisen eine Länge von etwa 110 Aminosäuren auf (Tepass et al. 2000b). Klassische Cadherine sind Transmembranglykoproteine mit einer relativen Molekülmasse von 120-140 kD, die kalziumabhängig homophile Interaktionen vermitteln. Prominente Vertreter dieser Molekülklasse sind das N-Cadherin (neuronale Cadherin, CDH2), das VE-Cadherin (vasculär endothelial, CDH5) und das E-Cadherin (epithelial, CDH1). Diese klassischen Cadherine weisen extrazellulär fünf sich wiederholende Cadherindomänen auf. Die N-terminale Domäne ist für die Wechselwirkung der Cadherine miteinander verantwortlich.

2.2.2 E-Cadherin: Struktur und Funktion

Anfang der achtziger Jahre wurde durch verschiedene Arbeitsgruppen das E-Cadherin in unterschiedlichen Organismen das erste Mal beschrieben. Das E-Cadherin der Maus (Yoshida und Takeichi 1982) und Uvomorulin (Hyafil et al. 1981, Vestweber und Kemler

1984), die beide in murinen embryonalen Karzinomzelllinien identifiziert wurden, stellten sich später als dasselbe Molekül heraus (Vestweber et al. 1985). Das humane Ortholog wurde zunächst als Cell-CAM 120/80 bezeichnet (Damsky et al. 1983). CDNA Klone des murinen sowie des humanen E-Cadherins konnten 1987 sequenziert werden (Mansouri et al. 1988) und zeigten mehr als 80 Prozent Übereinstimmung in der Nukleotid- sowie Aminosäurezusammensetzung. Das primäre Transkript des humanen E-Cadherins (RefSeq Nummer: NM_004360) umfasst 4828 Nukleotide, das E-Cadherin Vorläuferprotein wird von Nukleotid 194 bis 2770 codiert, das reife Protein von 587 bis 2770. Die Abspaltung eines 131 Aminosäuren umfassenden N-terminalen Fragments ist für die E-Cadherin Funktion essenziell (Ozawa und Kemler 1990). Das gesamte Gen wurde 1995 von Berx et al. kloniert und umfasst etwa 100 kb. Das Gen enthält 16 Exons und wurde auf Chromosom 16q22.1 lokalisiert (Berx et al. 1995).

1995 zeigten Overduin et al. die 3-dimensionale Struktur einer extrazellulären E-Cadherin Domäne der Maus mittels multidimensionaler magnetischer Resonanz Spektroskopie. Es

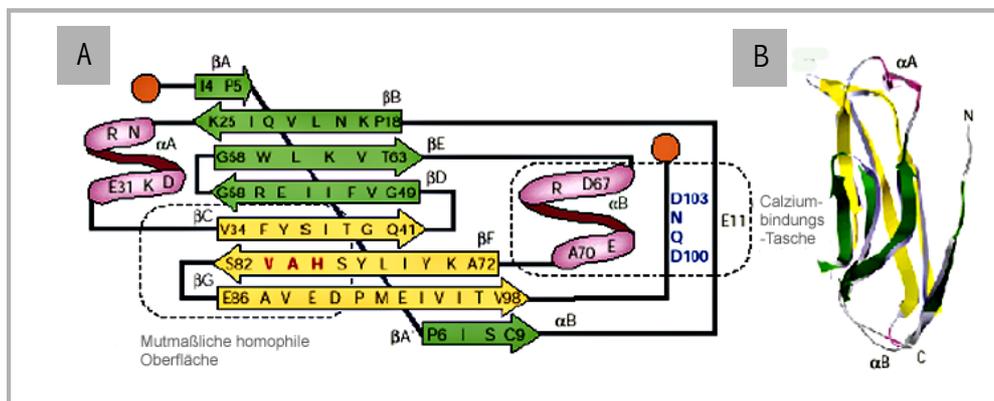


Abbildung 2: Die Struktur der ersten murinen E-Cadherin-Domäne (EC1) basierend auf NMR-Spektroskopie Daten (Overduin et al 1995).

A: Schematische Darstellung der EC1 der Maus bestehend aus 7 beta-Faltblätter (grün und gelb) und 2 alpha Helices (magenta), der wahrscheinlichen homophilen Bindungsstelle mit der HAV-Sequenz (rot) und der Kalziumbindungs-Tasche mit den Ca²⁺ interagierenden Aminosäuren DNQD (blau).

B: Bänderstrukturdarstellung der EC1. Das Farbschema ist das selbe wie in (A).

zeigt sich eine strukturelle Gemeinsamkeit mit Immunglobulin Domänen (Overduin et al. 1995). Dies deutete auf eine phylogenetische Verwandtschaft zwischen den kalziumabhängigen Cadherinen und den kalziumunabhängigen Immunglobulinen hin (s.o.). Boggon et al. (2002) zeigten als erste die Kristallstruktur einer vollständigen, funktionalen extra-

zellulären Domäne eines Cadherins (C-Cadherin aus *Xenopus*) (Boggon et al. 2002). In **Abbildung 2** wird die Struktur der ersten E-Cadherin Domäne der Maus dargestellt. Die Struktur weist eine ausgeprägte β -Faltblatt Anordnung auf, die durch zwei α -Helices verbunden ist. Die Aminosäuren (in diesem Fall das DXXD-Motiv), die an der Wechselwirkung mit Kalziumionen beteiligt sind, liegen in der Verbindungsregion zwischen den E-Cadherin-Domänen und sind mit der zweiten α -Helix räumlich assoziiert. Weitere Kalziumbindungs-motive sind zum Beispiel DXD und DRE (Takeichi et al. 1990). Mutationen in diesen Motiven beim menschlichem E-Cadherin, verändern die Zellmorphologie, verringern die Adhäsion und erhöhen die Motilität in einem Transfektionssystem (Handschuh et al. 1999, Handschuh et al. 2001).

Der molekulare Mechanismus, mit dem E-Cadherin den Kontakt zwischen benachbarten Zellen ausbildet, ist auch mehr als 20 Jahre nach der funktionellen Beschreibung des E-Cadherins noch nicht eindeutig geklärt. Während man zunächst davon ausging, dass bei der Homoassoziation des E-Cadherins jeweils ein Molekül der Zellenachbarn ein Dimer bilden (Birchmeier und Behrens 1994), geht man heute davon aus, dass zunächst zwei E-Cadherine ein sogenanntes cis-Dimer bilden. Zwei cis-Dimere benachbarter Zellen bilden ein trans-Dimer, bestehend aus vier E-Cadherin Molekülen (Tepass et al. 2000a).

Der zytoplasmatische Teil des E-Cadherins vermittelt die Anbindung an das Aktin-Zytoskelett der Zelle. Ein Proteinkomplex bestehend aus β -Catenin, das an eine spezifische konservierte Bindungsstelle im C-terminalen Bereich des E-Cadherins bindet, p120 und α -Catenin verbindet das E-Cadherin mit dem α -Aktinin des Aktinfilaments (Nollet et al. 1999). β -Catenin vermittelt die signalweiterleitende Wirkung des E-Cadherins und verbindet die Zelladhäsion mit dem Wnt/*Wingless* Signal-Transduktionsweg (Nelson und Nusse 2004).

Die Transkription des E-Cadherins steht unter der negativen Kontrolle des Transkriptionsfaktors Snail. Durch *In Situ* Hybridisierung von frühen Mausembryonen, die einen Epithelial-Mesenchymal-Übergang durchlaufen, konnte eine inverse Korrelation der Expressionsstärke von E-Cadherin und Snail gezeigt werden (Batlle et al. 2000, Cano et al. 2000).

Cano et al. fanden deutliche Hinweise, dass eine abnormale Expression von Snail, einem Zinkfinger Transkriptionsfaktor, mit der Tumorentstehung in Epithelien und dem Verlust der E-Cadherin Expression einhergeht. Außer Snail wurde noch SIP1 als Repressor der endogenen E-Cadherin Expression identifiziert (Comijn et al. 2001). Rosivatz et al. analysierten 28 diffuse und 20 intestinale Magenkarzinome mittels quantitativer real-time RT-PCR aus formalinfixierten und in Paraffin eingebetteten Proben u. a. auf Snail, SIP1 und E-Cadherin Expression. In elf der diffusen Magenkarzinome (39 Prozent) konnte eine verringerte E-Cadherin Expression festgestellt werden. Sechs dieser Proben (55 Prozent) zeigten eine erhöhte Snail Expression, die Expression von SIP1 zeigte jedoch keine Korrelation. SIP1 scheint jedoch eine Rolle in intestinalen Tumoren zu spielen. In den 12 Fällen mit erniedrigter E-Cadherin Expression (60 Prozent) zeigten zehn dieser Proben eine verstärkte SIP1 Expression (83 Prozent) (Rosivatz et al. 2002).

2.2.3 Mutationen im E-Cadherin Molekül

Verringerte Expression des Adhäsionsmoleküls E-Cadherin ist ein Charakteristikum vieler invasiver epithelialer Tumore und korreliert mit Tumorprogression, Dedifferenzierung, Invasion, Erhöhung des metastatischen Potentials und schlechter Prognose für den Patienten.

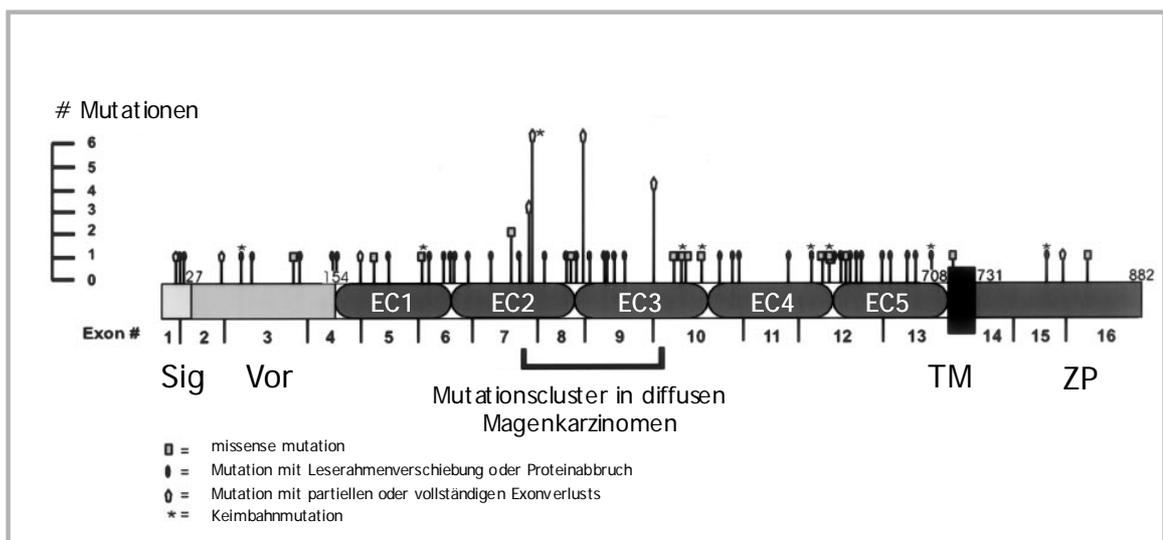


Abbildung 3: Mutationen im humanen E-Cadherin Gen (modifiziert nach Berx et al. 1998). Sig: Signalpeptid, Vor: Vorläuferpeptid, EC1 bis 5: E-Cadherin-Domänen 1-5, TM: Transmembranbereich, ZP: Zytoplasmatischer Teil

ten (Girolodi et al. 1994, Kinsella et al. 1994, Lipponen et al. 1994, Otto et al. 1994, Umbas et al. 1994, Vet et al. 1994). Becker et al. analysierten die E-Cadherin Sequenz von 26 diffusen Magenkarzinomen und konnten in 13 Patienten somatische Mutationen nachweisen, die in nicht kanzerösem Gewebe desselben Patienten nicht vorhanden waren. Im Gegensatz zu dieser mit 50 Prozent sehr hohen Mutationsrate konnten in Proben von intestinalen Tumoren (n = 20) keine Mutation beschrieben werden. Jedoch zeigte eine Probe von sieben Mischtypen (diffuse und intestinale Anteile) eine Mutation (Becker et al. 1994, Becker et al. 1993, Berx et al. 1998 und **Abbildung 3**). Im Bereich zwischen Exon 7 und Exon 10 konnte ein Mutations-Hotspot definiert werden. Insgesamt zeigten elf Patienten einen Verlust von Exon 9 oder Exon 8 aufgrund von Mutationen in Splice-Site Donor- oder Akzeptorstellen. Ein Patient zeigte eine partiellen Deletion von 69 bp in Exon 10. Geht man von weltweit etwa 700.000 jährlichen Neuerkrankungen für das Magenkarzinom aus und berücksichtigt, dass etwa 50 Prozent der Patienten ein diffuses Magenkarzinom aufweisen, kann man von mehr als 100.000 Patienten ausgehen, die eine der zwei Exon-deletionsmutanten exprimieren. Durch die Deletionen entstehen neue Epitope im E-Cadherin. In der Proteinsequenz des E-Cadherins mit Verlust des Exons 8 ($\Delta 8$) bildet der Übergang zwischen Exon 7 und Exon 9 ein neues spezifisches Epitop. Fehlt das Exon 9 im E-Cadherin ($\Delta 9$), ergibt sich für den Übergang von Exon 8 zu Exon 10 ein neues, karzinomspezifisches Epitop.

In **Abbildung 4** sind die E-Cadherin Varianten $\Delta 8$ und $\Delta 9$ mit den Bindungsstellen verschiedener E-Cadherin spezifischer Antikörper und den oben erwähnten Epitopen (del 8 und del 9) gezeigt. Gegen sie wurden spezifische, monoklonale Antikörper aus der Ratte generiert. Als Antigen wurden verschiedene Peptide der Übergangsregionen eingesetzt. Die Spezifität zweier Klone (Klon 7E6 gegen $\Delta 9$ E-Cadherin und 6D8 gegen $\Delta 8$ E-Cadherin) wurde mittels FACS, Western-Blot und Immunhistochemie gezeigt (Becker et al. 1999, Becker et al. 2002). Es konnte keine Kreuzreaktivität zu Wild-Typ E-Cadherin, sowie gegen Proteinlysate verschiedener Organe (Leber, Pankreas, Kolon, Duodenum, Magen, Esophagus, Lunge und Niere) festgestellt werden. Diese Antikörper sind somit ideale Kan-

didaten für immuntherapeutische Ansätze für eine Untergruppe an Patienten mit diffusem Magenkarzinom und bilden die Grundlage der hier vorgestellten Arbeit.

Zusätzlich zu den vorgestellten somatischen Mutationen sind auch Keimbahnmutationen

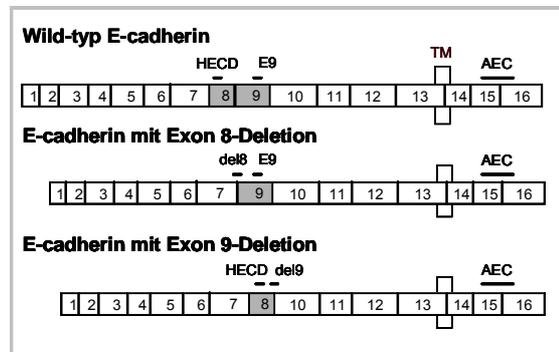


Abbildung 4: Schematische Darstellung des wild-typ E-Cadherins sowie der beiden Deletionsmutanten. Gezeigt ist die Exonstruktur, die Bindungsstellen zweier kommerzieller Antikörper (AEC und HECD), die Bindungsregionen der generierten mutationspezifischen Antikörper (del 8: Klone 7H1 und 6D8, del 9: Klone 7E6 und 6H8). TM: Transmembranbereich

beschrieben worden. So wurden in sechs von sechs Familien, die eine autosomal dominante Prädisposition für das diffuse Magenkarzinom aufweisen, Mutationen im E-Cadherin Gen gefunden, die inaktivierend wirken (Gayther et al. 1998, Guilford et al. 1998, Guilford et al. 1999, Keller et al. 1999, Richards et al. 1999)).

2.2.4 Internalisierung des E-Cadherins

E-Cadherin konnte als Rezeptor für das Protein Internalin auf der Oberfläche des Pathogens *Listeria monocytogenes* identifiziert werden (Mengaud et al. 1996). Humanes E-Cadherin vermittelt im Komplex mit den Bakterien die Internalisierung in die Zellen über einen endozytotischen Prozess (Lecuit et al. 1999). Auch ist bekannt, dass die Expression des E-Cadherin Moleküls auf der Oberfläche der Zellen kein statisches Geschehen ist, sondern vielmehr ein dynamischer Prozess, bei dem das E-Cadherin ständig von der Oberfläche der Zellen aufgenommen und wieder recycelt wird. Selbst in Monolayern aus epithelialen Zellen mit ausgebildeten Zellkontakten wird ein Prozentsatz des E-Cadherins internalisiert und über den post-Golgi endosomalen Weg an die Zellmembran zurückgeführt (Le et al. 1999). Die Frage, ob der Mechanismus der Endozytose des E-Cadherins Clathrin ab-

oder unabhängig ist, ist noch nicht mit Sicherheit geklärt (Palacios et al. 2002),(Le et al. 1999) und (Paterson et al. 2003). Vermutlich existieren beide Mechanismen für die Aufnahme des E-Cadherins in die Zellen.

Um das Potential des E-Cadherins als potentielles Zielmolekül eines immuntherapeutischen Ansatzes zu untermauern, wurden umfangreiche Vorarbeiten zur Internalisierung durchgeführt (freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Frau Dr. Handschuh und Herrn Dr. Karl-Friedrich Becker). In **Abbildung 5** sind elektronenmikroskopische Aufnahmen des mutationsspezifischen Antikörpers 6H8 gegen $\Delta 9$ E-Cadherin zu sehen. Im Falle von mit $\Delta 9$ E-Cadherin transfizierten Fibroblasten (A) kann die Internalisierung des Antikörpers mittels goldmarkierten Sekundärantikörpern gezeigt werden. Der Antikörper kann schon nach 60 Minuten in Vesikeln und im Zytoplasma der Zellen nachgewiesen werden.

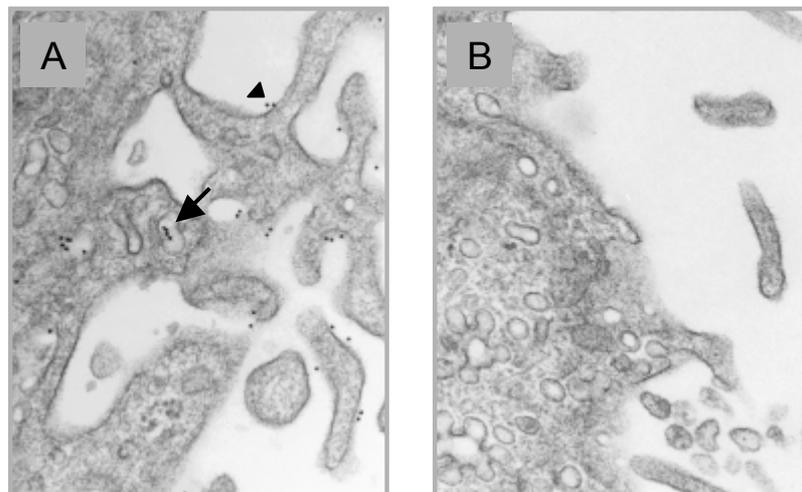


Abbildung 5: EM Aufnahmen der Internalisierung des mutationsspezifischen Antikörpers 6H8. Mit $\Delta 9$ E-Cadherin (A) oder Wild-typ (B) transfizierte vitale murine L929 Zellen wurden für 60 Minuten mit dem Antikörper 6H8 inkubiert und danach fixiert. Als Sekundärmarkierung wurde ein goldmarkierter anti Ratte Antikörper eingesetzt. Pfeil: In Vesikel aufgenommener Antikörper, Pfeilspitze: An membranständigem E-Cadherin gebundener Antikörper. Der mutationsspezifische Antikörper bindet nicht an Zellen mit Wild-typ E-Cadherin. (Becker, unveröffentlicht).

2.3 Antikörperbasierte Tumorthera­pieansätze

2.3.1 Überblick

Fast hundert Jahre nachdem Paul Ehrlich (1845-1915) sogenannte „magische Kugeln“ postulierte, Substanzen die Mikroorganismen angreifen können, den menschlichen Körper aber nicht schädigen, und über ein Viertel Jahrhundert nachdem Köhler und Milstein die Hybridomtechnologie zur Herstellung monoklonaler Antikörper entwickelten (Köhler und Milstein 1975), scheint nun die Ära der Antikörper und deren Derivate für unterschiedlichste therapeutische Anwendungen angebrochen zu sein. Die Anzahl der Veröffentlichungen, klinischen Phasen zur Erforschung der Wirksamkeit und letztendlich auch die Freigabe von Immunpräparaten steigt ständig. So ist zum Beispiel der Antikörper Rituxan[®] (anti CD20), gerichtet gegen Zellen des Non-Hodgkin´s Lymphom (NHL), Simulect[®] (α CD25) zur Verhinderung einer Transplantationsabstoßung oder auch Herceptin[®], dessen Zielmolekül HER-2/*neu* bei 25 Prozent der Mammakarzinompatientinnen überexprimiert ist, in Deutschland oder den Vereinigten Staaten für die Therapie zugelassen (Übersicht: Holliger und Hoogenboom 1998, von Mehren et al. 2003, Weiner 1999). Bei den genannten Beispielen handelt es sich um unveränderte monoklonale Antikörper der Maus oder humanisierte Antikörper. Im zweiten Fall, Rituxan[®], wurden alle nicht variablen Bereiche der murinen Antikörper mit analogen humanen Sequenzen ausgetauscht (Nagahira et al. 1999, Riechmann et al. 1988b).

Die Mechanismen, mit denen diese nicht konjugierten Antikörper einen antitumoralen Effekt erreichen, sind unterschiedlich. Ein direkter Effekt ist eine nach der Antikörperbindung induzierte Apoptose der Zelle (Cardarelli et al. 2002). Ist das Zielmolekül ein Wachstumsfaktor, kann die Bindung des Antikörpers die Wirkung des natürlichen Liganden inhibieren (Borgstrom et al. 1998). Weitere Effekte nicht konjugierter Antikörper sind die Induktion einer anti-idiotypischen Antwort durch die Erkennung von Fremdsequenzen in den Antikörpern (Fagerberg et al. 1995, Liu et al. 2003), die Aktivierung des Komplementsystems oder die Induktion der Antikörper-abhängigen Zytotoxizität (ADCC) (Bier et al. 1998, Lin et

al. 2001, Mellstedt 2003). Die Aktivierung des Komplementsystems startet mit der Bindung des Komplementfaktors C1 an den Fc-Teil des Antikörpers und bewirkt über die klassische Kaskade über C4 und C2 die Rekrutierung phagozytierender Zellen. Die ADCC wird durch die Ausschüttung zytoplasmatischer Granula von Natürlichen Killerzellen, Neutrophilen, mononukleären Zellen, zytotoxischen T-Zellen und Eosinophilen, die über Fc Rezeptoren an die zellgebundenen Antikörper binden, erreicht. Diese Granula enthalten Perforin und andere zytotoxische Proteine, wie z. B. $\text{TNF}\alpha$, welche die Zielzellen lysieren.

Um die zytotoxische Wirkung von Antikörpern zu verstärken wurden verschiedene Ansätze entwickelt, diese zu modifizieren. So kann die ADCC von Antikörpern oder deren Fragmenten verstärkt werden, wenn bispezifische Antikörper verwendet werden. Diese bispezifischen Antikörper können zum Beispiel aus einer antigenbindenden Domäne und einer Domäne, die gegen CD 16 (Fc gamma Rezeptor III) gerichtet ist, bestehen (Garcia de Palazzo et al. 1992). Häufig werden auch Radionukleotide über chemische Linker mit den Antikörpern konjugiert, um deren zytotoxische Wirkung zu unterstützen (Übersicht: (Goldenberg 2003)). Hierbei werden vor allem β - Strahler, wie ^{131}I od und ^{90}Y ttrium oder α -Strahler, wie ^{213}B ismut und ^{211}A stat eingesetzt. In einer klinischen Studie der Phase III konnte gezeigt werden, dass ein ^{90}Y ttrium markierter Antikörper gegen CD20 effektiver gegen Tumorzellen wirkt als sein nicht radioaktives Äquivalent Rituxan[®] (Wiseman et al. 2001). Ein ähnlicher Ansatz ist die Kopplung niedermolekularer Toxine, wie z.B Anthrazykline oder Calicheamicine über chemische Linker (Übersicht: Garnett 2001). Um eine ausreichende zytotoxische Wirkung durch das Toxin zu erreichen, müssen jedoch viele Antikörper in die Zielzellen aufgenommen werden, was diese Methode auf wenige Anwendungsmöglichkeiten limitiert (vgl. Allen 2002). Effektiver ist es, wenn das gekoppelte Toxin enzymatische Aktivität aufweist. Theoretisch könnte mit diesem Prinzip ein einzelner internalisierter Antikörper ausreichen, um den Tod der Zielzelle zu bewirken. Diese sogenannten Immuntoxine bilden die Grundlage dieser Arbeit.

2.3.2 Immuntoxine

Immuntoxine sind chimäre Proteine, die aus einem Bindungsprotein und einem Effektorprotein (Toxin) zusammengesetzt sind. Als Bindungsproteine kommen ganze Antikörper, Fab-Fragmente, Fv-Fragmente oder Liganden (z.B. Interleukin 2) gegen Oberflächenmoleküle, die spezifisch für die Zielzellen sind oder überexprimiert werden, in Betracht. Als Effektorproteine werden bakterielle und pflanzliche Toxine eingesetzt. Das erklärte Ziel ist das spezifische Töten von Krebszellen. In den ersten Immuntoxinen wurden die Toxine über chemische Linker an ganze Antikörper gekoppelt (Kondo et al. 1988). In rekombinanten Immuntoxinen werden mittels rekombinanter DNA-Technologie die Bindungs- und Effektorfunktion in einem Hybrid-Molekül exprimiert (Chaudhary et al. 1989 und **Abbildung 6**).

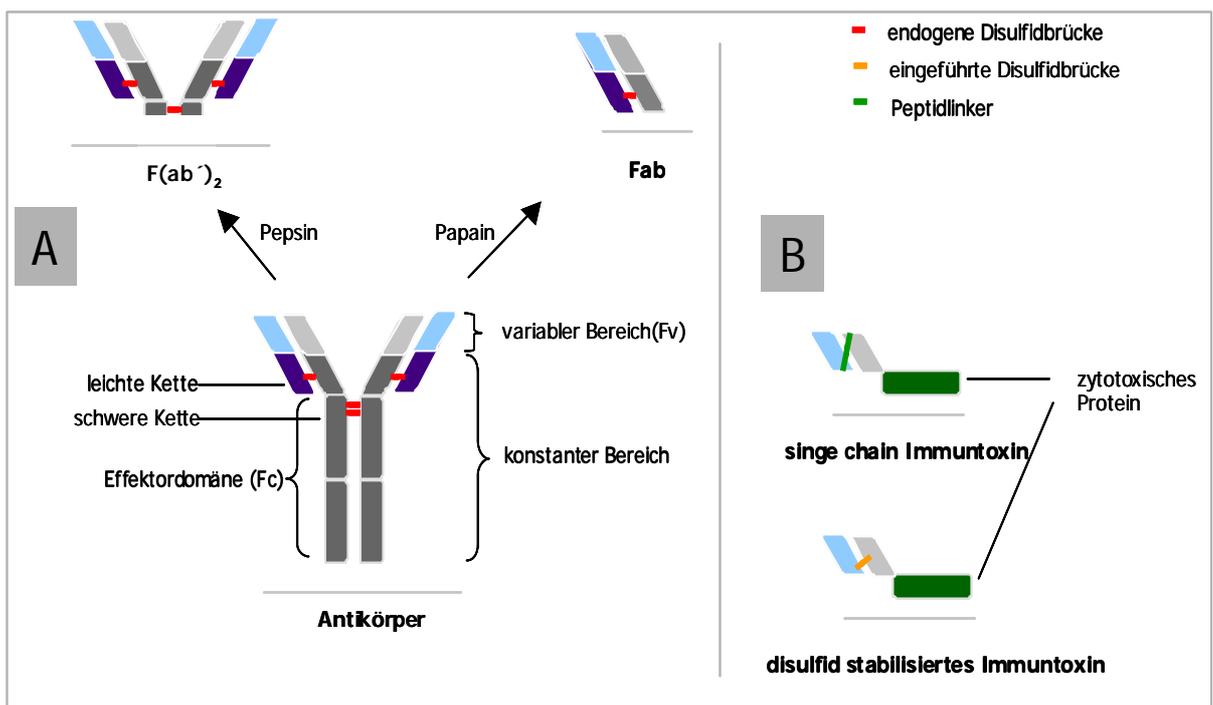


Abbildung 6: Struktureller Aufbau eines Antikörpers und verschiedener Immuntoxine. **(A)** Ein Antikörper kann durch den Verdau mit Pepsin in ein antigenbindendes $F(ab')_2$ Fragment und die Effektor-domäne (Fc für engl.: Fragment crystallizable) gespalten werden. Wird ein Antikörper mit der Protease Papain gespalten entstehen zwei monovalente Fab Fragmente, da die Schnittstelle der Protease nicht wie beim Pepsin zwischen den zwei Disulfidbrücken des konstanten Bereichs, sondern über den Verbindungen liegt. **(B)** Zwei verschiedene Arten von rekombinanten Immuntoxinen. Während im single chain Immuntoxin (scIT) die variablen Regionen der leichten und der schweren Kette über einen Peptidlinker miteinander verbunden sind, wurden im Falle des disulfid stabilisierten Immuntoxin (dsFv) Cystein-Mutationen in die Framework-Regionen der variablen Bereiche der leichten und der schweren Kette eingefügt. Die Ausbildung der Cysteinbrücke erfolgt *in vitro*.

Die prominentesten Toxine, die für die Herstellung von Immuntoxinen verwendet werden, sind Inhibitoren der eukaryontischen Proteinbiosynthese. Das pflanzliche Toxin Ricin ist der

Prototyp einer Familie von Ribosom-inaktivierenden Enzymen. Ricin ist ein 60 kDa großes Protein, das im Zytoplasma der Zellen die 28s rRNA irreversibel modifiziert und damit inaktiviert (Wawrzynczak et al. 1990). Ricin ist ein Heterodimer aus einem Bindungsteil (Ricin B) und einem katalytischen Protein (Ricin A), die über eine Disulfidbrücke miteinander verbunden sind. Für die Verwendung in Immuntoxinen wird das durch Reduktion gewonnene Ricin A benutzt. Jedoch konnte gezeigt werden, dass Ricin A durch Makrophagen und Leberzellen, durch Bindung an Mannoserezeptoren aufgenommen wird (Bourrie et al. 1986, Fulton et al. 1988a, Fulton et al. 1988b). Deswegen werden die an der Aufnahme beteiligten Glykosylierungen des Proteins chemisch abgespalten oder modifiziert (Blakey et al. 1987). Das bakterielle Diphtherie Toxin (DT) aus *Corynebacterium diphtheriae* wird in einem Proteinstrang exprimiert. Die Effektor-domäne (Domäne A) liegt N-terminal und inaktiviert den Translationselongationsfaktor EF-2 durch ADP-Ribosylierung. Die Funktionsweise ist homolog zu Pseudomonas Exotoxin A (s.u.). Ein chemisches Konjugat mit DT als Toxinanteil war das erste beschriebene Immuntoxin überhaupt (Moolten und Cooperband 1970).

Da es sich bei den genannten Toxinen um pflanzliche oder bakterielle Proteine handelt, wird bei wiederholter Anwendung in Patienten die Produktion von neutralisierenden Antikörpern beobachtet (Kreitman 2001). Es gibt jedoch Versuche die Immunreaktion zu minimieren, indem das Toxin mit mehreren Polyethylenglycol (PEG) Ketten gekoppelt wird. Das so behandelte Immuntoxin LMB-2 zeigte bei verstärkter anti-Tumor Wirkung eine deutlich reduzierte Immunantwort in einem Mausmodell (Tsutsumi et al. 2000). Es gibt zudem Ansätze humane Enzyme als Toxinpartner zu nutzen. So zeigte ein Immuntoxin mit der humanen RNase aus dem Pankreas zytotoxische Aktivität in einem Zellkultursystem (Zewe et al. 1997).

2.3.3 Pseudomonas Exotoxin A

Pseudomonas aeruginosa sekretiert als eines seiner Virulenzfaktoren ein 66 kDa großes Protein, das Pseudomonas Exotoxin A (PE) (Iglewski und Kabat 1975). Es bindet an das ubiquitäre α 2-Makroglobulin (oder auch low density lipoprotein receptor-related Protein,

LRP genannt) eukaryontischer Zellen und wird über den Mechanismus der Rezeptor-vermittelten Endozytose in die Zellen internalisiert (Kounnas et al. 1992). Die Toxinwirkung beruht auf der ADP-Ribosylierung eines modifizierten Histidin (Diphthamid) des Elongationsfaktors-2 (EF-2) der eukaryontischen Proteinbiosynthese. Diese kovalente Modifikation mit NAD⁺ als Cofaktor inhibiert irreversibel EF-2 und bringt die *de novo* Proteinsynthese zum Erliegen (Iglewski und Kabat 1975). Hierbei sind nur wenige Moleküle notwendig, um den Zelltod zu vermitteln.

Das Protein ist in drei Haupt-Domänen unterteilt (Allured et al. 1986) (siehe **Abbildung 7**). Die Domäne I (AS 1 bis 252 und AS 365 bis 399) vermittelt die Bindung des Toxins an eukaryontische Zellen (Hwang et al. 1987). Für den Einsatz des Pseudomonas Exotoxins A gekoppelt an Antikörper (Immuntoxine), rekombinant als sogenannte single chain (scFv-IT) oder als disulfidstabilisierte Immuntoxine (dsFv) ist die Domäne Ia vollständig deletiert (Batra et al. 1989, Kondo et al. 1988). Diese Deletionsmutante wird nach ihrem Molekulargewicht als PE40 bezeichnet. Die Deletion der Domäne Ia des PE mündete in eine 100-fach reduzierte Toxizität in der Maus im Vergleich zu PE mit der Bindungsdomäne (Hwang et al. 1987). Eine weitere Deletionsmutante ist das PE38. Bei dieser Mutante ist zusätzlich der N-terminale Teil (AS 365 bis 379) der Domäne Ib herausgeschnitten. Diese Deletion zeigte keinen Verlust der Zytotoxizität im Vergleich zu PE40 (Batra et al. 1989). Die Funktion der Domäne Ib ist unklar, vermutet wird eine Stabilisierung der Domäne II durch β -Faltblattassoziationen der Domäne Ib mit Domäne Ia (Siegall et al. 1989). Domäne III (AS

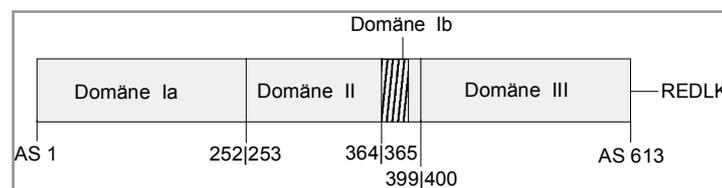


Abbildung 7: Schematische Darstellung der Domänen des Exotoxin A aus *Pseudomonas aeruginosa*.

Domäne Ia (AS 1 bis 252) vermittelt die Bindung an den zellulären Rezeptor. Domäne Ib ist zu Ia räumlich assoziiert. Domäne II (AS 253 bis 364) ist verantwortlich für die Translokation durch intrazelluläre Membranen. Die Funktion der Domäne Ib (AS 365 bis 399) ist unklar. Die Domäne III (AS 400 bis 613) vermittelt die primäre Enzymaktivität, die Ribosylierung des Translationsfaktors. REDLK: ER-Retentionssequenz.

400 bis 613) katalysiert die ADP-Ribosylierung des Elongationsfaktors 2 (eEF-2) des eukaryontischen Translationsmechanismus (Hwang et al. 1987). Die C-terminale Aminosäuresequenz REDLK fungiert als ER-Retentionssequenz und ist für die zytotoxische Wirkung notwendig (Chaudhary et al. 1990). Die Mutation der REDLK-Sequenz zu der charakteristischen ER-Retentionssequenz KDEL zeigte eine Erhöhung der zytotoxischen Aktivität des Pseudomonas Exotoxins A (Seetharam et al. 1991).

Nach der Rezeptor-vermittelten Endozytose über „coated pits“ wird das PE im endosomalen Kompartiment der Zelle bei niedrigem pH durch eine zelleigene Protease in Domäne II zwischen AS 279 (Arg) und AS 280 (Gly) gespalten. Die proteolytische Spaltung erfolgt durch die Protease Furin. Zellen, die Furin nicht exprimieren, zeigen eine Resistenz gegen Pseudomonas Exotoxin A, die durch Transfektion mit Furin cDNA aufgehoben werden kann (Moehring et al. 1993). Die beiden Fragmente sind über eine Disulfidbrücke verbunden, die reduziert werden muß (Chiron et al. 1997, Ogata et al. 1990, Ogata et al. 1992).

Das C-terminale 37 kDa Fragment, das die Translokationsdomäne und die Ribosylierungsdomäne enthält, wird in das Zytosol transloziert. Die ER-Retentionsequenz REDLK (oder auch KDEL) ist notwendig, um die zytotoxische Aktivität des PE zu erhalten (Chaudhary et al. 1990). Die exogene Expression einer Lysozym Mutante mit C-terminaler KDEL Sequenz, die in den Zellen mit einer Umverteilung des KDEL-Rezeptors aus dem Golgi-Apparat in das ER einhergeht, erniedrigt die Zytotoxizität des PE. Die exogene Expression des KDEL-Rezeptors in eukaryontischen Zellen sensitiviert dagegen die Zellen für die Wirkung des Toxins (Jackson et al. 1999). Dies legt nahe, dass die Translokation in das Zytosol der Zelle aus dem Endoplasmatischen Retikulum (ER) erfolgt. Elektronenmikroskopische Verfahren waren jedoch nicht sensitiv genug, PE in diesem Kompartiment nachzuweisen (Morris und Saelinger 1990).

Mutationen in der Translokationsdomäne zeigten, dass die Effizienz der Translokation mit der zytotoxischen Aktivität des Enzyms korreliert. Dies legt nahe, daß die Translokation der limitierende Schritt für die Wirkung des Enzyms ist. Die Deletion der sechsten Helix der Translokationsdomäne mündete bei diesen Untersuchungen in eine 60 Prozent höhere

Translokationseffizienz, die mit einer drei bis sechsfachen Erhöhung der Zytotoxizität des Enzyms einherging (Taupiac et al. 1999).

2.3.4 Rekombinante Immuntoxine mit PE als Fusionspartner

Immuntoxine bestehend aus vollständigen Antikörpern und chemisch gekoppelten Toxinen haben drei wesentliche Nachteile:

1. Antikörper sind mit 200-220 kDa Proteingewicht sehr große Moleküle und zeigen dementsprechend eine schlechte Tumorpenetration. Auch bei der Verwendung von Fab Fragmenten (90 kDa) ist diese nur befriedigend (Brinkmann 1996), (Fujimori et al. 1989).
2. Die für die Bindung nicht benötigten Proteindomänen in den Fab Fragmenten und dem Fc-Teil nicht humanisierter Antikörper erhöht die Wahrscheinlichkeit für die Bildung von humanen anti-Maus Antikörpern (HAMA).
3. Die chemische Kopplung führt zu heterogenen, schlecht charakterisierten Proteinprodukten (Pastan 2003) und kann nicht mit jedem Antikörper durchgeführt werden.

Das erste rekombinante Immuntoxin wurde aus dem Antikörper Anti-Tac, gerichtet gegen das Antigen CD25, als sogenanntes single chain Immunotoxin (scIT) generiert (Chaudhary et al. 1989). Für die Herstellung von scITs wurden die variablen Regionen der leichten Kette und der schweren Kette aus den Hybridomzellen der Antikörper kloniert. Zwischen die beiden Fragmente wurde ein Peptidlinker kloniert und mit der kodierenden Sequenz des PE fusioniert. Das Protein konnte in *E. coli* exprimiert werden. Das so gewonnene rekombinante single chain Immuntoxin wies ein Molekulargewicht von 63 kDa auf und ist somit mehr als dreimal kleiner als konventionelle Immuntoxine. Obwohl z. B. das scIT LMB-7 sehr gute Bindungseigenschaften aufwies und in Tiermodellen sehr gute Ergebnisse lieferte, zeigte es in einer klinischen Studie der Phase I nur eine geringe Aktivität (Reiter und Pastan 1996). Untersuchungen zeigten, dass viele scIT sehr instabil bei 37°C sind und zur Aggregation neigen (siehe **Abbildung 8 (A)**). Um dieses Aggregationsverhalten zu verhindern, wurde ein neuer Immuntoxintyp entwickelt, bei dem die variable Region der

leichten und der schweren Kette über eine Disulfidbrücke miteinander verbunden sind (Brinkmann et al. 1993). In der Tat erreichen diese so genannten disulfidstabilisierten Immuntoxine eine stark erhöhte Stabilität gegenüber den scIT Varianten. So hat z. B. das B3 scIT in PBS bei 37°C eine biologische Halbwertszeit von einer Stunde, während bei seinem dsFv Äquivalent nach über sieben Tagen noch die Hälfte seiner Ausgangsaktivität

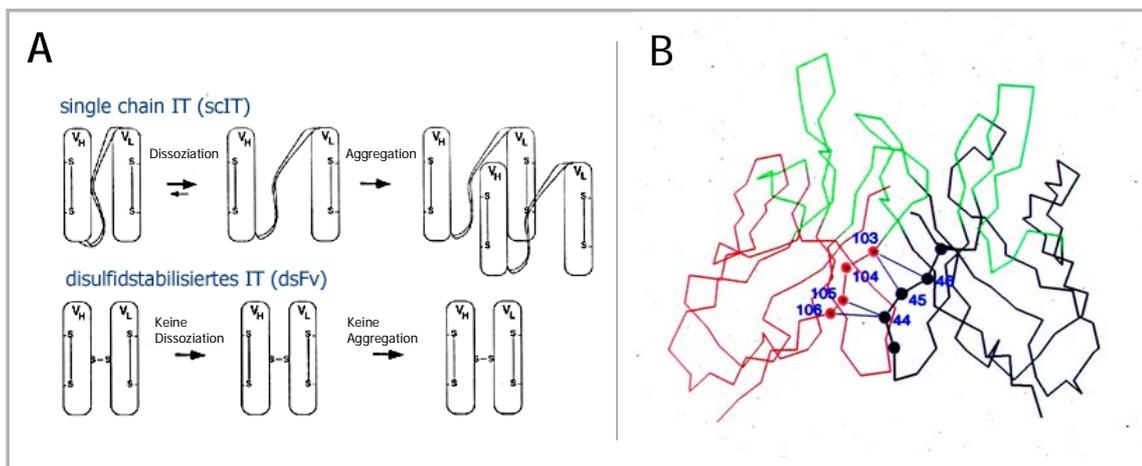


Abbildung 8:

(A) Aggregationsverhalten rekombinanter Immuntoxine. Mod. nach Reiter et al. 1996 .

(B) Strukturmodell des Fv-Fragmentes des Antikörper B3 (mod. nach Reiter et al. 1995). Es handelt sich um eine Struktur, die durch Angleichung an die experimentell bestimmte Struktur des Fab-Fragmentes des Antikörpers McPC603 (Satow et al. 1986) durch Sequenzmutation/Deletion und Energieminimierung nach Jung et al. modelliert wurde (Jung et al. 1994). Framework Regionen sind schwarz (V_H) und rot (V_L), Complement Determining Regions (CDR) sind grün dargestellt (V_H und V_L). Mögliche Aminosäurepositionen (nach Kabat (Kabat, 1991) für die Cysteinmutationen sind blau nummeriert. Die für dieses Fv-Fragment per Mutationen eingefügten Disulfidbindungen sind blau eingezeichnet.

vorhanden ist (Reiter et al. 1996). Dabei zeigt das dsFv gegenüber dem scIT eine erhöhte zytotoxische Aktivität (Reiter et al. 1994b). In **Abbildung 8 (B)** ist ein errechnetes Strukturmodell des Fv-Fragmentes des B3 dsFv zu sehen. Für dieses Fv-Fragment ergaben sich vier mögliche Kombinationen für die Ausbildung einer stabilisierenden Disulfidbrücke zwischen der leichten und der schweren Kette. Die möglichen Aminosäurepositionen der leichten Kette liegen in Framework 4, die der schweren Kette in Framework 2. Durch Sequenzvergleiche von Fv-Regionen verschiedener Antikörper mit den AS-Sequenzen erfolgreich generierter dsFvs konnte einer Reihe von dsFv Immuntoxinen entwickelt werden, die vielversprechende Aktivitäten zeigten (Benhar und Pastan 1995, Bera und Pastan 1998, Bera et al. 1999, Kreitman et al. 2000a, Kuan und Pastan 1996b, Reiter et al. 1994a, Shinohara et al. 2002, Webber et al. 1995).

In **Tabelle 1** sind ausgewählte single chain und disulfidstabilisierte Immuntoxine aufgezählt.

Tabelle 1: Verschiedene Immuntoxine und ihre Einsatzmöglichkeit. PE: Pseudomonas Exotoxin A, DT: Diphtheria Toxin, RI: Ricin

Konstrukt oder Antikörper	Bezeichnung	Zielmolekül	Krebsart	Toxin	Literatur
LMB- 1/9	B3-Lys PE38 B3(dsFv)-PE38	Lewis Y Antigen	Kolonkarzinom Mamakarzinom	PE	(Pai et al. 1996)
LMB-2	Anti-Tac(Fv)-PE38	CD25	T und B-Zell Lymphome	PE	(Kreitman et al. 2000b)
Interleukin-13 PE38QQR		Interleukin 13 Rezeptor	maligne Gliome	PE	(Puri et al. 1996)
Il-4(38-37)-PE38KDEL	Interleukin-4 PE38KDEL	Il-4 Rezeptor	Kopf-Hals-Karzinom	PE	(Puri et al. 1994)
BI22	RFB4(dsFv)-PE38	CD22	B-Zell Lymphom	PE	(Kreitman et al. 2001)
425.3-PE	TGFalpha-PE38	Epidermaler Wachstumsfaktor Rezeptor (EGFR)	Gliome	PE	(Engebraaten et al. 2002)
Anti-Mesothelin Immunotoxin	SS1(dsFv)-PE38	Mesothelin	Mesotheliom (Ovar, Pankreas)	PE	(Hassan et al. 2002, Hassan et al. 2000)
Denilelukin diftiox (Ontak®)	IL2-Diphtheria Toxin Fusionsprotein	IL-2 Rezeptor	Cutanes T-Zell Lymphom	DT	(Duvic 2000, Kuzel 2000)
Anti-B4-blocked Ricin	Maus Anti-CD19-Diphtheria Toxin	CD19	Non-Hodgkin's-Lymphom	RI	(Multani et al. 1998)

2.4 Zielsetzung

Ziel der Arbeit war die Generierung funktionaler Immuntoxine gegen die Exon 8 bzw. Exon 9 Deletionsmutationen im E-Cadherin. Hierfür war es zunächst notwendig, die Spezifität und Bindungsaffinität der E-Cadherin mutationspezifischen Antikörper zu charakterisieren. Ein chemischen Konjugat eines Antikörpers wurde als erstes Testsystem gewählt, um die prinzipielle Funktion des Systems zu demonstrieren. Da ein Einsatz der Immuntoxine für eine mögliche therapeutische Intervention im diffusen Magenkarzinom angestrebt wird, ist die Herstellung kleiner, rekombinanter Immuntoxine essentiell. Deswegen sollten, ausgehend von den Hybridomzelllinien der mutationspezifischen monoklonalen Antikörper, die variablen Regionen der leichten und der schweren Ketten kloniert werden. Diese dienen als Grundlage für die Fusion mit einem Effektorprotein (Pseudomonas Exotoxin A). Um stabile Immuntoxine zu erhalten, wurde das disulfidstabilisierte Format favorisiert.

3 Material und Methoden

3.1 Material

3.1.1 Chemikalien, Lösungsmittel und Medien

1,4-Dithioerythrit (DTE)	Roche, Mannheim
1,4-Dithiothreit (DTT)	Roche, Mannheim
5-Bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galactopyranosid (X-Gal)	Sigma, Deisenhofen
Agarose FMC Seakem LE	Biozym, Hessisch Oldendorf
Arginin ($\geq 99\%$)	Karl Roth GmbH, Karlsruhe
Bovines Serum Albumin (BSA)	Roche, Mannheim
Chloroform	Sigma, Deisenhofen
EDTA	Sigma, Deisenhofen
Glutathion (oxidiert, GSSG) M = 612,6 g/mol	Karl Roth GmbH, Karlsruhe
Glycerin	Merck, Darmstadt
Guanidin HCl (Proteingrade)	Karl Roth GmbH, Karlsruhe
HEPES	Sigma, Deisenhofen
Imidazol	Sigma, Deisenhofen
Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid (IPTG)	Roche, Mannheim
Lipophilic Tracer Dil	Molecular Probes, Leiden, Niederlande
NiCl ₂	Merck, Darmstadt
Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF)	Sigma, Deisenhofen
SOC Medium	Invitrogen, Karlsruhe
β -Mercaptoethanol	Sigma, Deisenhofen
Super-Broth	Q-Biogene, Heidelberg
Surfactant P20	Biacore, Uppsala, Schweden
Tris	USB, Cleveland, Ohio, USA
Tris-HCl	USB, Cleveland, Ohio, USA
Triton X-100	Merck, Darmstadt
Trizol	Gibco, BRL, Eggenstein
Harnstoff	Karl Roth GmbH, Karlsruhe
IPTG	Sigma, Deisenhofen

3.1.2 Puffer

5x TBE

54 g Tris; 27,5 g Borsäure
20 ml 0,5 M EDTA
ad 1l

5x Transkriptionspuffer

250 mM Tris-HCl, pH 8,5
40 mM MgCl₂
150 mM KCl
5 mM DTT

10x PCR-Puffer

100 mM Tris-HCl, pH 8,3
500 mM KCl
15 mM MgCl₂

Expression und Aufreinigung von disulfidstabilisierten Fv Konstrukten

TES-Puffer

50 mM Tris-HCl, pH 8.0
20 mM EDTA
100 mM NaCl

GTE-Puffer

6 M Guanidin HCl
100 mM Tris-HCl, pH 8.0
2 mM EDTA

Renaturierungs Puffer

100 mM Tris, pH 9,5
1 mM EDTA
0,5 M Arginin
Puffer auf 10°C kühlen, 551 mg/ml Glutathion (oxidiert) kurz vor Gebrauch zugeben

Dialyse Puffer

20 mM Tris-HCl, pH 7,4
100 mM Harnstoff (erst kurz vor Gebrauch zufügen)

Puffer A

20 mM Tris-HCl, pH 7,4
1 mM EDTA

Puffer B

1M NaCl in Puffer A

Phosphate Buffered Saline (PBS)

20 mM di-Kaliumhydrogenphosphat (KH₂PO₄)
50 mM di-Natriumhydrogenphosphat (Na₂HPO₄)
0,15 M NaCl

His TAG- Aufreinigung

Lysis Puffer

20 mM Tris, pH 7,5
10% Glycerin
500 mM NaCl
3 mM MgCl₂
1 mM PMSF
10 mM β-Mercaptoethanol

Denaturierungspuffer

50 mM Tris, pH 7,5
6 M Guanidin HCl

Waschpuffer

25 mM Tris, pH 7,5
20 mM Imidazol
6M Guanidin HCl

Elutionspuffer

25 mM Tris pH 7.5
250 mM Imidazol
6 M Guanidin HCl

Puffer EA

20 mM Tris, pH 7,5
10% Glycerol
300 mM NaCl

Puffer EB

20 mM Tris, pH 7,5
10 % Glycerol
200 mM NaCl
1 mM PMSF
250 mM Imidazol

Renaturierungspuffer

50 mM Tris pH 7.5
mit 4 M GuHCl
2 M GuHCl
1 M GuHCl
0 M GuHCl

Puffer für Biacore

Alle Puffer für die Biacore wurden vor Zugabe des Surfactant P20 sterilfiltriert (0,22 µm) und entgast.

Laufpuffer

0,01 M HEPES
0,15 M NaCl
50 µM EDTA
0,005 % Surfactant P20
pH 7,4

Regenerierungspuffer

0,01 M HEPES
0,15 M NaCl
0,35 M EDTA
0,005 % Surfactant P20
pH 8,3

Nickelpuffer

500 µM NiCl₂ in Laufpuffer

Puffer für Western-Blot

Tris Borat Puffer

50 mM Tris
5 mM Borsäure
10 % Methanol
pH 8,5

L-CAM-Puffer

140 mM NaCl
4,7 mM KCl
0,7 mM MgSO₄
1,2 mM CaCl₂
10 mM HEPES, pH 7,4
10 mM Triton X 100
1 mM Phenylmethsulfonylfluorid

Laufpuffer für SDS Gele

25 mM Tris
192 mM Glycin
0,2 % SDS, pH 8,3

TBST Puffer

150 mM NaCl
50 mM Tris HCl, pH 8,0
0,1 % Tween 20

FACS-Puffer

PBS-Azid

0,1 % Natriumazid (w/v)
0,1 % BSA (w/v)
in PBS

RACE-PCR Puffer

Tricine-EDTA Puffer

10 mM Tricine-KOH, pH 8,5
1 mM EDTA

5x First-Strand Puffer

250 mM Tris HCl, pH 8,3
375 mM KCl
30 mM MgCl₂

Immunglobulin G Aufreinigung, Fab Herstellung

IgG Binding Buffer, pH 8,0

IgG Elution Buffer, pH 2,3

Nicht näher charakterisierte Bestandteile des ImmunoPure Binding/Elution Buffer System

PBS mit Calcium

CaCl₂ x 2 H₂O 0,132 g auf 1 l PBS

3.1.3 Kommerzielle Komplettsysteme

SMART RACE cDNA Amplification Kit	Clontech, Heidelberg
Quiaquick Gel Extraktion Kit	Qiagen, Hilden
Dneasy-Kit	Qiagen, Hilden
QIAprep Plasmid-Kit (miniprep)	Qiagen, Hilden
QIAprep Plasmid-Kit (midiprep)	Qiagen, Hilden
Rneasy-Kit	Qiagen, Hilden
BigDye Sequenzierungs-kit	Perkin Elmer, Rodgau-Rügesheim
TA-Cloning Kit	Invitrogen, Karlsruhe
Topo-TA-Cloning Kit	Invitrogen, Karlsruhe
QuikChange Kit	Stratagene, Heidelberg
Dye Ex Kit	Qiagen, Hilden
PCR Purification Kit	Qiagen, Hilden
ImmunoPure Binding/Elution Buffer System	Pierce, Rockford, Illinois, USA
Coomassie® Plus Protein Assay Reagent	Pierce, Rockford, Illinois, USA
Diff-Quick Fixier- und Färbelösungen	Dade Behring, Liederbach
Antifade (Eindecklösung)	Molecular Probes, Leiden, Niederlande
P7708S, Prestained Protein Marker, Broad Range	New England Biolab, Frankfurt am Main
Advantage® 2 PCR Kit	Clontech, Heidelberg
Expand High Fidelity PCR System	Roche, Mannheim

3.1.4 Antibiotika

Ampicillin
Kanamycin

Sigma, Deisenhofen
Seromed Biochrom AG, Berlin

3.1.5 Enzyme

Lysozym
Taq-Polymerase
Superscript II Reverse Transkriptase, RNase H-
T4 DNA Ligase
Restriktionsenzyme

Roche, Mannheim
Roche, Mannheim
Invitrogen, Karlsruhe
Invitrogen, Karlsruhe
New England Biolab, Frankfurt am
Main
Sigma, Deisenhofen

Papain

3.1.6 Bakterienstämme

OneShot INV α F'

F' *endA1 recA1 hsdR17*(r_k⁻, m_k⁺) *supE44 thi-1 gyrA96*
reA1 ϕ 80/*lacZ* Δ M15 Δ (*lacZYA-argF*)U169 λ -

Invitrogen, Karlsruhe

DH5 α

F- ϕ 80d/*lacZ* Δ M15 Δ (*lacZYA-argF*)U169 *deoR radA1*
endA1 hsdR17(r_k⁻, m_k⁺) *phoA supE44* λ - *thi-1 gyrA96 reA1*

Gibco BRL, Karlsruhe

BL21-CodonPlus(DE3)-RIL strain

E.coli B F- *ompT hsdS*(r_B⁻, m_B⁻) *dcm*⁺ Tet^r
gal/ λ (DE3)*endA* Hte [*argU ileY leuW Cam*^r]

Stratagene, Heidelberg

XL-1 Blue

recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 reA1
lac [F' *proAB lacI*^q Δ M15 Tn10 (Tet^r)]

Stratagene, Heidelberg

3.1.7 Zelllinien

L929 (Fibroblasten, Maus)

ATCC, Rockeville, USA; (Handschuh et al. 1999)

MDA-MB-435S (Mamakarzinomzellen, human)

ATCC, Rockeville, USA; (Ellison et al. 2002, Frixen et al. 1991)

HSC45-M2 (Magenkarzinomzellen, human)

(Yanagihara et al. 1993)

MPE600 (Mamakarzinomzellen, human)

(Hiraguri et al. 1998)

MCF7 (Mamakarzinomzellen, human)

ATCC, Rockeville, USA; (Frixen et al. 1991)

HTB135 (Magenkarzinomzellen, human)

ATCC, Rockeville, USA; (Morisaki et al. 1994)

LS174T (Kolonkarzinomzellen, human)

ATCC, Rockeville, USA; (Efsthathiou et al. 1999)

3.1.8 Oligonukleotide (Primer)

Die alphabetische Liste gibt die verwendeten Primer wieder. Als Abkürzungen werden verwendet : fw für forward (codierender Strang), r/c für reverse complement (nicht codierender Strang), mut (Mutagenese Primer).

(S= C/G; M= A/C; R= A/G; W= A/T)

Bezeichnung (Literaturangabe)	Sequenz (5´- 3´)
Bi7 (k5´)(Dubel et al. 1994)	GGT GAT ATC GTG ATR ACM CAR GAT GAA CTC TC
Bi5 (k3´)(Dubel et al. 1994)	GGG AAG ATG GAT CCA GTT GGT GCA GCA TCA GC
hc 5 (VH1BACK) (Orlandi et al. 1989)	AGG TSM ARC TGC AGS AGT CWG G
hc 3 (Ward et al. 1989)	TGA GGA GAC GGT GAC CGT GGT CCC TTG GCC CC
kc 3 (VK1FOR) (Orlandi et al. 1989)	GTT AGA TCT CCA GCT TGG TCC C
kc 5 (4)(Huse et al. 1989)	CCA GAT GTG AGC TCG TCA TGA CCC AGT CTC CA
6H8 heavy fw	CAT ATG GAG GTG AAG CTG CAG GAG TCA GGT
6H8 heavy rev	AGA AGC TTT TGA GGA GAC GGT GAC CGT GGT
6H8 light fw	CAT ATG GAT ATC ATG ATG ACC CAA TCT CCA CTC
6H8 light rev	TCG AAT TCA TTA TTT CAA TTC CAG CTT GGT GCC ACA ACC GAA
6D8 heavy fw	CAT ATG GAG GAG CAG CTG GTG GAG TCA GGA GGA GGC TTG GTG CAG
6D8 heavy rev	AGA AGC TTT TGA GGA GAC TGC GAC CAT GAC CCC TTG GCC CCA GTG GGG ATA AC
6D8 light fw	CAT ATG GAT GTT GTG ATG ACG CAA ACT CCG GTC TCC ATG TCT GTC AGC CTT GGA G
6D8 light rev	TCG AAT TCA TTA TTT GAT CTC CAG CTT GGT CCC ACA TCC AAA CG
7E6 heavy fw	GTG CTC CTT CCA TAT GGA GGT GCA GCT GGT GGA GTC
7E6 heavy rev	AAG CAC ATG TAT AAG CTT TTG AGG AGA CTG TGA CCA TG
7E6 light fw	TTC TTA TTA CCA TAT GGA TAT TGT GTT GAC TCA AGC TCC ACT CTC
7E6 light rev	TTA GCC GAT TCG AAT TCA TTA TGC AGC ATC AGC CCG TTT CAA TTC CAC CTT GGT GCC ACA GCC G
7H1 heavy fw	CCG TTG TGG ACA TAT GGA GGT GCA GCT GGT GGA GTC TG
7H1 heavy rev	TAC TAA ATC GAA GCT TTG GAG GAG ACT GCG ACC ATG AC
7H1 light fw	ATT AAT CCA TCA TAT GAA TAG TGT GAT GAC TCA GTC TCC CAC ATC
7H1 light rev	GGT TCG AGT CTG AAT TCA TTA TGC AGC ATC AGC CCG TTT CAA TTC CAG CTT GGT GTC ACA ACC GAA CG
6H8 heavy mut	AAG CAG ACG ACT GGA CAG TGC CTT GAG TGG ATT GGA TAT
6H8 heavy mut r/c	ATA TCC AAT CCA CTC AAG GCA CTG TCC AGT CGT CTG CTT
7E6 heavy mut	GTC AGT CTC CAA AGA AGT GTC TGG AGT GGG TCG CAA CC
7E6 heavy mut r/c	GGT TGC GAC CCA CTC CAG ACA CTT CTT TGG AGA CTG AC
7H1 heavy mut	CTG GTT CCA GGG AAG TGT CTG GAG TGG GTT GCA TC
7H1 heavy mut r/c	GAT GCA ACC CAC TCC AGA CAC TTC CCT GGA ACC AG
6D8 heavy mut	CGC CAG GCT CCA GGG AAG TGT CTG GAG TGG GTT GCA TC
6D8 heavy mut r/c	GAT GCA ACC CAC TCC AGA CAC TTC CCT GGA GCC TGG CG
T7	TAA TAC GAC TCA CTA TAG GG
M13 fw	GTA AAA CGA CGG CCA GT
M13 rev	CAC ACA GGA AAC AGC TAT GAC CAT
Smart II Oligo	AAG CAG TGG TAA CAA CGC AGA GTA CC GGG
3´ CDS	AAG CAG TGG TAAA CAAA CGC AGA GTA C(T) ₃₀ N ₁ N
5´ CDS	(T ₂₅)N ₁ N
UP long	N= A,C,G oder T; N-1= A, G oder C CTA ATA CGA CTC ACT ATA GGG CAA GCA GTG GTA ACA ACG CAG AGT
UP short	CTA ATA CGA CTC ACT ATA GGG C
UPM	Mischung aus UP long (0,2 µM) und UP short (1 µM)
heavy const	GTG GAT AGA CAG ATG GGG CTG TTG T
kappa const	GAT GGT GGG AAG ATG GAT ACA GTT G
Ex 7/1	CAC CAT CCT CAG CCA AGA TCC
rEx 10/2a	CAC GCC AAA GTC CTC GGA CAC
Intron 8	CTC AGC TCT GCT AGC AGT CTT G
rIntron 9	GTA TGA ACA GCT GTG AGG ATG C

3.1.9 Peptide

Δ8a	Exon 7 Exon 9
Δ8b	C-VTTGLDRE YKQVPE
Δ8c	C-LTSGLDRE YQGVPE
Δ8e	VTTGLDRE YKQVPE-C GLDRE YKQV-C
Δ9a	Exon8 Exon 10
Δ9b	C-PIFNPTT GLDFEA
Δ9c	C-PIFNPTT GLDFEAKQ PIFNPTT GLDFEA-C

3.1.10 Antikörper

HECD-1 (anti E-Cadherin)
AEC (anti E-Cadherin)

SHE (anti E-Cadherin, Klon SHE78-7)
Polykonalen Anti-Pseudomonas Exotoxin A Serum
Ziege-Anti-Maus (FITC-gekoppelt)
Ziege-Anti-Maus (Meerrettichperoxidase-gekoppelt)
Ziege-Anti-Ratte IgG H+L (FITC-gekoppelt)
Ziege-Anti-Ratte (Meerrettichperoxidase-gekoppelt)
Ziege Anti-human (Fab spezifisch, FITC-gekoppelt)
Ziege Anti-human (Fab spezifisch,
Meerrettichperoxidase-gekoppelt)
Anti-Kaninchen (FITC-gekoppelt)
Anti-Kaninchen (Meerrettichperoxidase-gekoppelt)
Anti-PentaHis

Takara, Genevilleiers, Frankreich
Transduction Laboratories, Lexington,
Kentucky, USA
Takara, Genevilleiers, Frankreich
Sigma, Deisenhofen
Dianova, Hamburg
Dianova, Hamburg
Dianova, Hamburg
Dianova, Hamburg
Sigma, Deisenhofen
Sigma, Deisenhofen

Promega, Mannheim
Promega, Mannheim
Qiagen, Hilden

3.1.11 Medien und Reagenzien für die Zellkultur

Fötale Kälberserum (FCS)
Geneticin (G-418 Sulfat)
Penicillin-Streptomycin
Versene-EDTA
Trypsin/EDTA
Dulbecco's MEM (DMEM, Hochglukose mit Glutamax)
Phosphate Buffered Saline (mit Ca²⁺ und Mg²⁺)
Phosphate Buffered Saline (PBS, ohne Ca²⁺ und Mg²⁺)
Medium 199 (Hochglukose)
Insulin

PAN Systems, Nürnberg
Gibco BRL, Eggenstein
Gibco BRL, Eggenstein
Gibco BRL, Eggenstein
PAA, Cölbe
Gibco BRL, Eggenstein
PAA, Cölbe
PAA, Cölbe
Gibco BRL, Eggenstein
Roche, Mannheim

3.1.12 Verbrauchsmaterial

Mono Q HR 5/5 Säule

Superdex 75 HR 10/30 Säule

Säule C 10

Plastiksäulen
Sensor Chip NTA
SDS-PAGE Gradientengele (Tris-HCl, 4-20%)
Einmalpipetten (5, 10 und 25 ml)
Filterpapier

Küvetten (1ml)

Pharmacia Biotech, Uppsala, Schweden

Pharmacia Biotech, Uppsala, Schweden

Pharmacia Biotech, Uppsala Schweden

Qiagen, Hilden
Biacore, Uppsala, Schweden
Biorad, München
Greiner, Frickenhausen
Whatman, Maidstone, Kent, Großbritannien
B. Braun, Melsungen

Reaktionsgefäße (1,5 ml; 2 ml)
Reaktionsgefäße (15 ml)
Röntgenfilme
Sterilfilter (0,22 µm, 0,45 µm)
Spritzen
Zellkulturflaschen
PVDF Membran
Fraktionsgefäße, 13 x 100 mm, Polypropylen

Eppendorf Hamburg
Sarstedt, Nümbrecht
Amersham, Braunschweig
Schleicher und Schuell, Dassel
B. Braun, Melsungen
Nunc, Wiesbaden-Biebrich
Biorad, München
Biorad, München

3.1.13 Geräte

ULTRA-TURRAX T8/T25 basic/T50 basic Dispergiergerät
FPLC

Biacore 1000
Ultraschall, Branson
Sorvall Zentrifuge
Sorvall Rotor SS-34
Sorvall Rotor GSA
Kühl-/Tischzentrifuge
Schlauchpumpe
Blotapparat
Vertikale Gelkammer Mini Protean II
DNA-Sequenzierer ABI Prism 373
Gelkammern, horizontal
Zellinkubator Cytoperm 8080
Geldokumentationsgerät Eagle Eye
Laser Scanning-Mikroskop, LSM510
Lichtmikroskop Axiophot
Speedvac
Spektrophotometer DU 530
Schüttelinkubator
Thermocycler
Sterilwerkbank Hera Safe
Waagen
Zellzählgerät Casy 1
Schlauchpumpe Modell EP1-Econo Pump
Fraktionssammler Modell 2110
Coulter Epics XL FACS
Brutschrank Cytoperm 8080

IKA-Labortechnik, Staufen
Pharmacia Biotech, Uppsala, Schweden
Biacore, Freiburg
IKA-Labortechnik, Staufen
Sorvall, Bad Homburg
Sorvall, Bad Homburg
Sorvall, Bad Homburg
Eppendorf, Hamburg
Bio-Rad, München
Bio-Rad, München
Bio-Rad, München
Perkin Elmer, Überlingen
Bio-Rad, München
Heraeus, Hanau
Stratagene, Heidelberg
Zeiss, Oberkochen
Zeiss, Oberkochen
Eppendorf, Hamburg
Beckmann, München
Heidolph, Kelheim
Perkin-Elmer, Überlingen
Heraeus, Hanau
Sartorius, Göttingen
Schärfe System
Biorad, München
Biorad, München
Beckman Coulter, Krefeld
Heraeus, Hanau

3.2 Methoden

Alle nicht genauer aufgeführten Standardmethoden der molekularen Biologie wurden aus der Methodensammlung *Molecular Cloning: a laboratory manual* (Sambrook und Russell 2001) übernommen.

3.2.1 Zellkultur

Alle eukaryontischen Zelllinien wurden standardmäßig bei 37°C, 5 % CO₂ und 100 % Luftfeuchtigkeit in einem Brutschrank in geeignetem Medium kultiviert. Mit Ausnahme der Zellen MPE600 wurde hierfür Dulbeccos Modified Eagle Medium (DMEM, Hochglukose, Glutamax) mit 10 % fötalem Kälberserum (FCS), 50 µg/ml Penicillin und 50 µg/ml Streptomycin verwendet. Für die Zellen MPE600 wurde Medium 199 (Hochglukose) mit 2,2 mg/ml NaHCO₃, 10 µg/ml Insulin, 10 % FCS, 50 µg/ml Penicillin und 50 µg/ml Streptomycin verwendet. Den stabil transfizierten L929 Zelllinien wurde zusätzlich 1250 µg/ml Geneticin, den stabil transfizierten MDA-MB-435 Zelllinien wurde 1200 µg/ml Geneticin zugegeben. Die adhärenenten Zellen wurden zur Passagierung einmal mit PBS gewaschen und mit Trypsin/EDTA abgelöst und in neuen Medium 1:5 bis 1:10 verdünnt und wieder ausgesät.

3.2.2 DNA-Sequenzierung

Sequenzierungen wurden nach der Kettenabbruchmethode nach Sanger (Sanger et al. 1977) mit fluoreszenzmarkierten ddNTPs (BigDye Kit, Perkin Elmer) nach Angaben des Herstellers durchgeführt und auf einem ABI Prism 373 DNA-Sequenzierer analysiert. Zur Sequenzierung der Klonierungsprodukte in den pCRII Vektoren wurde für die Cycle-Reaktion der Primer M13, für alle Expressionsplasmide der T7 Primer verwendet. Die Chromatogramme wurden auf dem DNA Analyseprogramm Vector NTI (Version 6.0, © InforMax Inc., Oxford, UK) ausgewertet. Vor Sequenzierungen von PCR-Produkten wurden diese durch Gelextraktion aufgereinigt (siehe 3.2.7)

3.2.3 DNA-Isolierung

Genomische DNA aus eukaryontischen Zellen wurde mit dem Dneasy-Kit (Qiagen, Hilden)

nach Angaben des Herstellers gewonnen. Plasmidpräparationen aus transformierten *E. coli* Zellen wurden mit dem QIAprep Plasmid-Kit (miniprep und midiprep; Qiagen, Hilden) durchgeführt.

3.2.4 RNA-Isolierung

Für die RNA-Isolierung aus den Hybridomzellen der mutationsspezifischen Antikörper wurde die Trizol Methode gewählt. Ausgangsmaterial waren jeweils etwa 10^8 Hybridomzellen, die in 15 ml Trizol (monophasische Mischung aus Phenol und Isothiocyanat (Chomczynski und Sacchi 1987)) durch auf- und abpipettieren lysiert wurden. 1 ml der Lösung wurden 5 Minuten bei 20°C inkubiert. Nach Zugabe von 270 µl Chloroform wurde die Lösung 15 Sekunden geschüttelt und weitere 15 Minuten bei 20°C inkubiert. Die Phasentrennung wurde durch Zentrifugation bei 11500 g für 15 Minuten bei 2°C erreicht. Die obere Phase wurde vorsichtig abgenommen und die RNA durch Zugabe von 670 µl Isopropanol gefällt. Nach 10 min Inkubation bei 20°C wurde die RNA bei 11500 g pelletiert und einmal mit 75 %igem Ethanol gewaschen. Das Pellet wurde in 500 µl H₂O aufgenommen und vermessen. Zur Gewinnung von Gesamt-RNA aus den Zellen MPE600 und HSC45 sowie den L929 Transfektanten wurde der Rneasy-Kit (Qiagen, Hilden) nach Angaben des Herstellers verwendet.

3.2.5 Reverse Transkription (RT)

Zur Umschreibung der mRNA aus allen Zelllinien mit Ausnahme der Hybridomzelllinien der Klone 7E6 und 7H1 in cDNA (reverse Transkription) wurde ein oligo dT-Primer basiertes Protokoll gewählt. 1 µg Gesamt-RNA wurde mit H₂O auf 26 µl aufgefüllt und für 5 Minuten bei 65°C und für 3 Minuten auf Eis inkubiert. Es wurden 10 µl Transkriptionspuffer, 10 µl dNTP's (je 1,25 mM), 2 µl Oligo dT-Primer, 1 µl DTT und 1 µl Reverse Transkriptase zugesetzt und 1,5 Stunden bei 37°C inkubiert. Für die reverse Transkription der mRNA der Klone 7E6 und 7H1 wurde ein spezielles RACE-Protokoll verwendet (siehe Abschnitt 3.2.22.3).

3.2.6 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Für die Amplifikation von E-Cadherin cDNA aus den verschiedenen Zelllinien und für die Klonierung der variablen Regionen aus den Hybridomzell-cDNAs der mutationspezifischen Antikörper wurde die Polymerasekettenreaktion (PCR) angewandt.

PCR-Reaktion:

- 32 µl H₂O
- 8 µl dNTP's (Stammlösung je 1,25 mM)
- 5 µl 10x PCR-Puffer
- 1 µl 5' Primer (Stammlösung 20 pmol/µl)
- 1 µl 3' Primer (Stammlösung 20 pmol/µl)
- 1 µl Taq-Polymerase (1 U/µl)
- 2 µl cDNA aus dem reversen Transkriptions-Reaktionsansatz

Auf einen Perkin Elmer PE 9700 PCR-Cycler wurde standardmäßig folgendes Programm durchgeführt:

- 5 min bei 94°C
- dann 29 Zyklen mit je
 - 1 min 94°C
 - 1 min Annealing Temperatur (siehe unten)
 - 1 min 72°C

Nach den 29 Zyklen wurde noch 10 min bei 72°C inkubiert, um etwaige nicht vollständig amplifizierte PCR-Produkte aufzufüllen. Außerdem musste für die TA-Klonierung gesichert sein, dass durch die Taq-Polymerase ausreichend 3' Desoxyadenosin-Überhänge inkorporiert wurden. Es wurde immer eine Wasserkontrolle mitgeführt, um potentielle Kontaminationen ausschließen zu können.

Für die Amplifikation der leichten und schweren Ketten bei der Umklonierung aus den TA-Vektoren in die Expressionsvektoren wurde das Expand™ High Fidelity PCR System (Roche, Mannheim) nach Angaben des Herstellers verwendet.

3.2.7 Aufreinigung von PCR-Fragmenten

PCR-Produkte wurden auf einem 2%igen low-melting Gel (1,5 % low-melting Agarose und 0,5 % Agarose in TBE-Puffer) aufgetrennt. Die gewünschten Banden wurden ausgeschnitten und mit dem Qiaquick Gel Extraktion Kit (Qiagen, Hilden) nach Angaben des Herstellers

aus dem Gel eluiert. Die eluierten Fragmente wurden mit einem 1%igem Agarose Gel überprüft und semiquantifiziert. Die so gewonnenen Fragmente konnten direkt in den pCRII Vektor des TA-Cloning Kits bzw. Topo-TA-Cloning Kits (Invitrogen) ligiert (siehe Abschnitt 3.2.22.4), oder sequenziert werden.

3.2.8 Transformation kompetenter Bakterien

1 µl der aufgereinigten PCR-Fragmente aus 3.2.7 wurde zu 50 µl kompetenten Bakterienzellen (OneShot INVαF', Bestandteil des TA-Cloning Kits oder DH5α) pipettiert, 30 Minuten auf Eis, 45 Sekunden Hitzeschock bei 42°C im Wasserbad und anschließend nochmals 2 Minuten auf Eis inkubiert. Die Transformationsansätze wurden mit 450 µl SOC-Medium versetzt und 1 Stunde bei 37°C im Schüttler (225 UpM) inkubiert. Danach konnten 20 und 200 µl des Transformationsansatzes auf Agarplatten mit 50 µg/ml Ampicillin ausplattiert, und über Nacht bei 37°C inkubiert werden. Wurden Bakterien mit TA oder Topo-TA Ligationsansätzen transformiert, wurde auf die Agarplatten zusätzlich 25 µl X-Gal (Stammlösung 40 mg/ml in Dimethylformamid) gegeben. Die Plasmide erlaubten ein blau-weiß Screening auf Klone, die ein PCR-Produkt enthielten.

3.2.9 Primer-vermittelte Mutagenese (Einführung von Cystein Mutationen)

Zur Ausbildung von disulfidstabilisierten Fv-Konstrukten während des Renaturierungsprozesses, mussten an geeigneten Stellen jeweils in der variablen Region der leichten und der schweren Ketten Cysteinmutationen eingeführt werden. Computer-Vorhersagen und experimentelle Ergebnisse zeigten, dass hierfür die AS-Position 44 in der schweren Kette und AS-Position 100 in der leichten Kette geeignet waren, stabile und aktive dsFv-Konstrukte zu erzeugen (Reiter et al. 1995). Die Aminosäure-Sequenzen der Klone 6H8 und 6D8 wurden mit vorhandenen Sequenzdaten erfolgreicher dsFvs mit Cysteinmutationen an diesen Positionen verglichen. Da sich keine Auffälligkeiten im Aminosäuresequenz-Vergleich zeigten, wurden diese Positionen für die Mutationen ausgewählt. Die Mutagenese der AS-Positionen 100 in den leichten Ketten wurde während der Einführung der geeigneten Restriktionsschnittstellen (5' Nde I, 3' Eco RI) zur Umklonierung in die Expressi-

onsvektoren erreicht. Hierfür wurden in den 3' Primern die Codons an Position 100 jeweils zu einem Cysteincodon verändert. Für die Mutation der AS-Positionen 44 der schweren Ketten wurde als Methode die Primer-vermittelte Mutagenese („site directed mutagenesis“) gewählt. Hierbei wird das gesamte Plasmid mit Hilfe der Pfu-Turbo DNA-Polymerase ausgehend von einem Primerpaar, das komplementär zur DNA ist, jedoch auch die einzufügende Mutation enthält (sense und antisense) linear amplifiziert. Die so erzeugten DNA-Stränge enthalten die Mutation und können, da sie nicht methyliert wurden, nicht durch das Restriktionsenzym Dpn I abgebaut werden (siehe **Abbildung 9**).

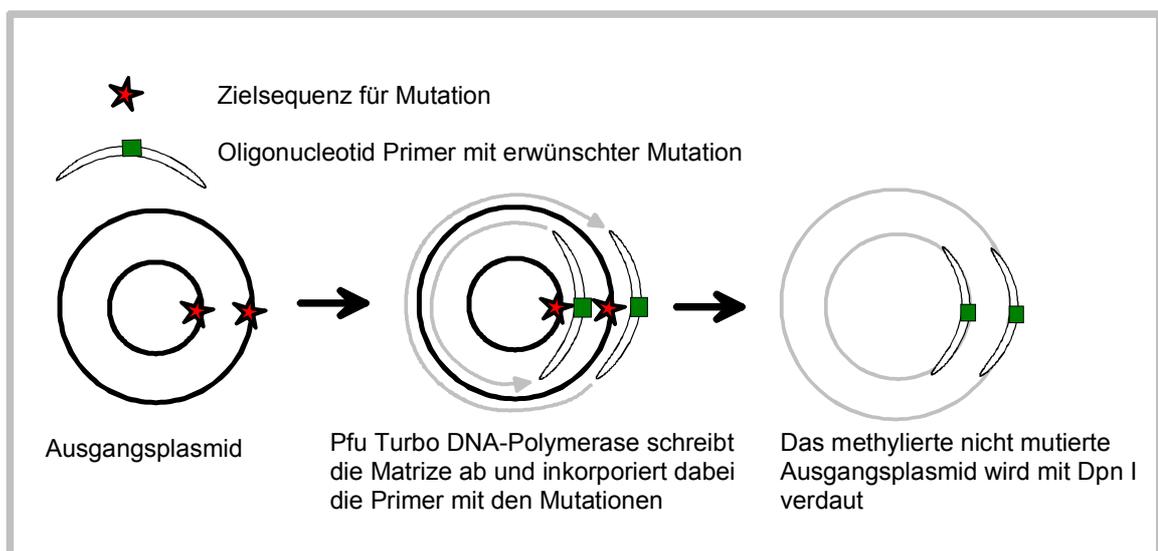


Abbildung 9: Schematische Darstellung der Primer-vermittelten Mutagenese („site-directed mutagenesis“).

Für die Mutagenese wurde eingesetzt (QuikChange Kit):

- 5 µl 10x Reaktionspuffer
- x µl Ausgangsplasmid (eingesetzt wurden 30 ng)
- x µl Mutationsprimer 1 (eingesetzt wurden 125 ng)
- x µl Mutationsprimer 2 (revers und komplementär zu Primer 1, 125 ng)
- 1 µl Nukleotidmix
- ad H₂O zu einem Endvolumen von 50 µl
- 1 µl Pfu-Turbo Polymerase (2,5 U)

Auf einen Thermocycler wurde folgendes Programm verwendet:

5 sec	95 °C	
16 Zyklen		
	30 sec	95 °C
	60 sec	55 °C
	10 min	68 °C

Nach der Reaktion wurden in jeden Ansatz direkt 1 µl des Restriktionsenzym Dpn I (10 U/µl) pipettiert und für 1h bei 37 °C inkubiert. Das Amplifikationsprodukt wurde auf einen 1 %igem Agarose-Gel überprüft. Die Transformation der XL-1 Blue Bakterien mit 1 µl des Mutationsansatzes wurde nach den Angaben des Herstellers (QuikChange Kit, Stratagene) durchgeführt. Mindestens 5 Klone wurden durch Sequenzierung analysiert.

3.2.10 F(ab) Herstellung

Fab Fragmente werden durch die Spaltung mit Papain, einer Cystein Protease, von IgG Antikörpern erhalten. Für die Spaltung wurden die Antikörper zu einer Konzentration von 1 mg/ml in PBS eingestellt, und 2 mM EDTA und 1 mM DTT (milde Reduktionsbedingungen) zugegeben. Zu 100 mg Ausgangsantikörper wurde 1 mg Papain (Ausgangslösung: 1 mg/ml) zugegeben und für 60 Minuten unter leichtem Schütteln bei 37°C inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von Iodacetamid (Endkonzentration 30 mM) gestoppt. Der Reaktionsansatz wurde für weitere 60 Minuten im Dunklen auf Eis inkubiert und danach bei 4°C gegen PBS dialysiert. Eine Effizienzkontrolle der Spaltung wurde durch Auftrennung eines Aliquots der Reaktion auf einem 12 %igen SDS-PAGE Gel durchgeführt. Die Trennung von Fab und Fc Fragmenten konnte mittels Protein G Affinitätschromatographie erreicht werden.

3.2.11 Immunfluoreszenz

Um Zelllinien auf ihre spezifische E-Cadherin Expression zu überprüfen wurde neben FACS-Analysen auch die Immunfluoreszenz angewendet. Hierfür wurden etwa $5-10 \cdot 10^3$ Zellen auf Deckgläschen (20 * 20 mm), die in 6-Well-Platten gelegt wurden, ausgesät und für 3 bis 5 Tage in Kultur gehalten. Die Zellen wurden dreimal mit PBS gewaschen und für 3 Minuten mit -20 °C-kaltem Methanol fixiert. Es folgten drei Waschschrte mit PBS und eine Blockierung von unspezifischen Bindungsstellen mit DMEM, 10 % FCS für 30 Minuten bei 20°C. Das Blockierungsmedium wurde abgenommen. Es wurden 200 µl einer Verdünnung des primären Antikörper (HECD-1, Verdünnung 1:200; 7E6, unverdünnter Hybridomüberstand) auf die Zellen aufgetragen und für 2 Stunden bei 20°C inkubiert. Die Ansätze

wurden dreimal mit PBS gewaschen. Als Sekundärantikörper diente ein FITC-gekoppelter Ziege Anti Maus-Antikörper (Verdünnung 1:100) für die HECD-1 Ansätze, und ein FITC-gekoppelter Ziege-Anti-Ratte-Antikörper (Verdünnung 1:50) für die 7E6 Proben. Die Zellen auf den Deckgläschen wurden wiederum dreimal mit PBS gewaschen und mit Antifade-Reagenz auf Objektträger fixiert.

3.2.12 Native E-Cadherin FACS (Durchflußzytometrie)

Für die FACS-Analyse wurden die Zellen mit Versene-EDTA abgeerntet. Pro Ansatz wurden $5 \cdot 10^5$ Zellen aliquotiert und einmal mit 500 µl DMEM Medium gewaschen. Alle Zentrifugationschritte wurden mit 300 g für 4 Minuten bei 4°C durchgeführt. Die Zellen wurden auf Eis mit 50 µl Antikörperverdünnung in PBS-Azid (E-Cadherin Ak SHE: Verdünnung 1:50, Hybridomüberstände der mutationsspezifischen Rattenantikörper 6H8, 6D8, 7E6 und 7H1: unverdünnt oder der dsFv-Konstrukte: Konzentration 2,3 µg/ml) für 30 Minuten inkubiert. Die Zellen wurden zwei mal mit 500 µl PBS-Azid gewaschen. Als Sekundärantikörper wurde ein FITC-gekoppelter Ziege-Anti-Maus (für SHE) oder Ziege-Anti-Ratte Antikörper (für die mutationsspezifische Antikörper) in einer Verdünnung von 1:50 in PBS-Azid verwendet. Für den Nachweis der spezifischen Bindung der dsFv Konstrukte wurde der Sekundärantikörper (Anti-Pseudomonas Exotoxin A, Verdünnung 1:5000) und der Tertiärantikörper (FITC-gekoppelter Ziege-Anti-Kaninchen, Verdünnung 1:50) in PBS-Azid für 10 min bei RT vorinkubiert und 1 h auf Eis mit den Zellen inkubiert. Nach erneutem zweimaligen Waschen konnten die Zellen auf einem Coulter Epics XL Durchfluß-Zytometer (Beckman Coulter) analysiert werden.

HuCAL Fab Fragmente (siehe unten) wurden zur Bestimmung der Bindungsspezifität in einer Konzentration von 30 µg/ml in Waschpuffer auf den Zellen für 30 Minuten inkubiert. Als Sekundärantikörper wurde ein FITC-markierter Ziege Anti Human IgG Fab (Verdünnung 100 µg/ml in Waschpuffer) für 45 Minuten auf Eis inkubiert.

Zur Auswertung bzw. Zusammenstellung der Ergebnisse wurde das Programm WINMDI 2.8 (© 1993 bis 2000, Joseph Trotter) verwendet.

3.2.13 Quantitative indirekte Immunfluoreszenz (QIIF)

Eine Quantifizierung der Oberflächen E-Cadherine wurde durch gleichzeitige Analyse von Eichpartikeln (QIFKIT, Dako) und mit Antikörper SHE markierten Zellen (siehe 3.2.12) im Durchfluss-Zytometer erreicht. Die Eichbeads wurden einmal mit 500 µl PBS-Azid gewaschen. Die SHE-markierten Zellen und die Partikel wurden für 45 Minuten auf Eis in 50 µl FITC-gekoppelten Ziege-Anti-Maus (Verdünnung 1:50 in PBS-Azid, Bestandteil des Kits), inkubiert. Die Zellen und Partikel wurden zweimal mit 500 µl PBS-Azid gewaschen. Mit dem Durchfluss-Zytometer konnte ihre mittlere Fluoreszenz-Intensität (MFI) bestimmt werden. Um die Eichgerade zu erstellen wurde die MFI der sechs verschiedenen Partikelpopulationen doppelt-logarithmisch gegen deren entsprechenden Antikörper Bindungs-Kapazität aufgetragen.

3.2.14 Chemische Kopplung der mutationsspezifischen Antikörper mit *Pseudomonas Exotoxin A*

Der $\Delta 9$ E-Cadherin spezifische Antikörperklon 6H8 wurde von Dr. Q. C. Wang, National Institutes of Health, Bethesda, USA, über eine kovalenten Thioetherbindung, durch 2-Iminoethiolane-HCl (Traut's Reagenz, Pierce, Rockford, IL, USA) vermittelt, mit einer modifizierten Form des *Pseudomonas Exotoxin A* (PE38QQR) gekoppelt. In diesem, speziell für die chemische Kopplung konstruierten, rekombinanten Toxin, sind die zwei Lysine an Aminosäureposition 590 und 606 zu Glutamin und ein Lysin an Position 613 mit Arginin ausgetauscht. Zusätzlich wurde die Peptidsequenz ANLAEEAFK ("Lys" Peptid) N-terminal angehängt. Die Kopplung des PE38QQR konnte somit nur über das N-terminale Methionin oder dem Lysin im Lys-Peptid erfolgen (Debinski und Pastan 1994). Die Konjugation der Antikörper mit dem PE38QQR erfolgte nach der Beschreibung von Lorimer et al. (Lorimer et al. 1995) und wird im folgenden nur kurz beschrieben. Die Antikörper wurden in PBS und 1 mM EDTA für eine Stunde bei 37 °C mit einem 7 bis 10 fachen molarem Überschuss an 2-Iminoethiolane inkubiert und anschließend über eine PD10 Säule (Pharmacia Biotech) entsalzt. PE38QQR wurde für 30 min mit 20 nM DTT inkubiert, auf einer PD10 Säule entsalzt und 1:1 mit dem Antikörper vermischt 16 h bei 10°C inkubiert. Die Antikörper-Toxin

nie angeimpft und für 6 h bei 37°C in einem Schüttelinkubator inkubiert. Von dieser Vor-
kultur wurde 1 ml auf 50 ml LB Medium überführt für 16 h weiter inkubiert. Mit dieser Bak-
teriensuspension wurde ein 400 ml LB-Ansatz so angesetzt, dass die OD₆₀₀ bei etwa 0,1
lag. Die Induktion der Expression wurde bei einer OD₆₀₀ von 0,6 durch Zugabe von 1 mM
IPTG (Endkonzentration) gestartet und nach etwa 3 Stunden durch Abernten der Bakterien
(siehe unten) gestoppt.

Das Bakterienpellet wurde in 20 ml Lysispuffer resuspendiert und 3 mal 3 Minuten mit
Ultraschall behandelt (70 % Ausgangsleistung, 0,1 Sekunden Schall, 0,9 Sekunden Pau-
se). Dazwischen wurden die Ansätze für mindestens 5 Minuten auf Eis gestellt. Nach
Zentrifugation der Ansätze (15000 UpM, Sorvall SS-34, 20 min, 4°C) wurde das Pellet in
20 ml Lysispuffer resuspendiert, die Ultraschallbehandlung wiederholt, erneut zentrifugiert
und das „Inclusion Body“-Pellet in 12 ml Denaturierungspuffer aufgenommen und zur
vollständigen Lösung kurz mit Ultraschall behandelt (10 Zyklen).

Zur Aufreinigung der Konstrukte wurden 5 ml Plastiksäulen (Qiagen) mit 4,4 ml Nickel-
Agarose befüllt, mit 2 mal 10 ml Waschpuffer gewaschen und mit 10 ml Denaturierungs-
puffer equilibriert. Alle Säulenschritte sind im Durchflussverfahren durchgeführt worden.
Bis zu 10 ml der Proteinlösung in Denaturierungspuffer wurden aufgetragen. Die Säule
wurde bei 20°C drei mal mit 10 ml Waschpuffer gewaschen. Zur Renaturierung der E-
Cadherin Konstrukte auf der Säule wurde eine abfallende Guanidin-HCl-Pufferreihe einge-
setzt (jeweils zwei mal 10 ml 6 M, 4 M, 2 M 1 M Guanidin-HCl in 50 mM Tris, pH 7.5) . Die
2 M und 1 M Guanidin-HCl Renaturierungsschritte und alle weiteren Schritte wurden bei
4°C durchgeführt. Die Säule wurde zwei mal mit 10 ml Puffer EA gewaschen. Die Elution
des Proteins erfolgte mit Puffer EB. Es wurden 4 mal 5 ml Fraktionen gesammelt und ver-
messen. Geeignete Fraktionen wurden zusammengeführt, gegen PBS dialysiert und erneut
vermessen.

3.2.15.2 Disulfid-stabilisierte Fv-Konstrukte (dsFv-Konstrukte)

Expression der dsFv Konstrukte

Die Expression der leichten und schweren Ketten Konstrukte wurde jedes Mal ausgehend von einer Transformation von 100 µl kompetenten BL-21 *E. coli* Zellen mit 1 µl DNA-Lösung des Expressionsplasmides (aus Abschnitt 3.2.22.5) wie in Abschnitt 3.2.8 durchgeführt. Für jedes Konstrukt wurden insgesamt 10 Agar-Platten aus dem Transformationsansatz ausplattiert. Diese wurden für 16 h bei 37 °C inkubiert. Die entstandenen Kolonien wurden mit je 5 ml modifiziertem Super-Broth Medium (plus 0,4 % Glucose, 1,7 mM MgSO₄, Endkonzentration) pro Platte abgeerntet, zusammengeführt und homogenisiert. Zwei 2-Liter Kolben mit Schikanen wurden mit je 0,5 Liter mod. Super-Broth (vorgewärmt auf 37°C) mit je 50 mg Ampicillin befüllt und mit der Bakteriensuspension zu einer OD₆₀₀ von etwa 0,2 eingestellt. Die Kolben wurden bei 37°C und 250 UpM im Schüttler bis zu einer OD₆₀₀ von 2,0 bis 3,0 inkubiert. Die Induktion der Expression wurde dann durch Zugabe von 1 mM IPTG (Endkonzentration) gestartet. Die Bakterien wurden zwischen 90 und 210 Minuten inkubiert und in einen Sorvall GSA-Rotor bei 4°C und 7000 UpM für 30 Minuten abzentrifugiert. Das Bakterienpellet konnte zu diesem Zeitpunkt bei –70°C bis zur weiteren Bearbeitung eingefroren werden.

„Inclusion Body“ Präparation

Die zwei Bakterienpellets wurden in insgesamt 160 ml TES-Puffer mit Hilfe eines Dispergiergerätes aufgenommen, homogenisiert und in ein 250 ml Sorvall Zentrifugen Gefäß überführt. Es wurden 32,5 mg Lysozym zugegeben, kurz mit dem Dispergiergerät vermischt und bei 20°C, unter häufigem Schütteln, 30 Minuten inkubiert. Zur weiteren Lyse wurden dem Ansatz 20 ml einer 25%igen Triton X-100 Lösung gegeben, mit dem Dispergiergerät gemischt, und unter mehrmaligem Schütteln weitere 30 Minuten bei 20°C inkubiert. Um die nicht-löslichen „Inclusion Body“ (IB)-Aggregate zu pelletieren wurde die lysierte Bakteriensuspension für 50 Minuten bei 9000 UpM in einem Sorvall GS-3 Rotor zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet wurde in 54 ml TES-Puffer und 6 ml 25 %igem Triton X-100 mit Hilfe des Dispergier-Gerätes aufgenommen, 5 Minuten bei 20°C inkubiert und auf zwei 50 ml Sorvall Zentrifugations-Gefäße aufgeteilt. Es

wurde für 20 Minuten bei 13000 UpM in einem Sorvall SS-34 Rotor zentrifugiert und die IB-Pellets wiederum in TES-Puffer und Triton X-100 (27 ml und 3 ml je Gefäß) aufgenommen. Dieser Waschritt wurde noch einmal wiederholt. Danach erfolgten nochmals 3 Waschriffe unter den selben Zentrifugationsbedingungen jedoch mit jeweils 35 ml TES-Puffer ohne Triton X-100. Das IB-Pellet konnte bei -70°C gelagert werden.

Das Pellet wurde – je nach Größe – in 5 bis 10 ml GTE Puffer gelöst. Der Proteingehalt der Lösung wurde mit einem Coomassie Plus Reagenz (Pierce) bestimmt, und mit GTE Puffer auf 10 mg/ml eingestellt. Nach Zugabe von DTE zu einer Konzentration von 10 mg/ml wurde der Ansatz vorsichtig gemischt und für 16 h bei 20°C zur vollständigen Denaturierung inkubiert. Nicht lösliche Aggregate wurden durch Zentrifugation bei 10000 UpM in einem Sorvall SS-34 Rotor abzentrifugiert, der Überstand wurde erneut vermessen und wenn nötig mit GTE Puffer und DTE auf 10 mg/ml (Protein- und DTE Konzentration) korrigiert.

Renaturierung der Ketten und Ausbildung der Disulfidbrücken

Ein Liter Renaturierungs-Puffer wurde auf 10°C vorgekühlt und kurz vor der Zugabe des Proteins mit oxidiertem Glutathion zu einer Konzentration von 551 mg/l eingestellt. Während des Renaturierungs-Prozesses wurden gleichzeitig die Disulfidbrücken zwischen der leichten Kette und der schweren Kette mit dem Toxinanteil des dsFv ausgebildet. Deswegen wurde darauf geachtet, dass gleiche molare Verhältnisse der zwei Reaktionspartner vorlagen. Es wurden 6,67 ml der denaturierten schweren Kette mit dem Toxinanteil und 3,33 ml der denaturierten Leichte-Ketten-Lösung vermischt und mit eingetauchter Pipette über einen Zeitraum von etwa 15 Sekunden in den stark rührenden Renaturierungs-Puffer überführt. Die Proteinlösung wurde für 3 Minuten weiter gerührt und dann für 48 Stunden zur Faltung des Proteins und Ausbildung der Disulfidbrücken bei 10°C inkubiert. Der Renaturierungs-Ansatz wurde in einen Dialyseschlauch überführt und bei 4°C in 40 Liter Dialysepuffer für 36 h dialysiert. Ausgefallene Aggregate wurden durch Filtration ($0,45\ \mu\text{m}$) entfernt.

Aufreinigung der dsFv Konstrukte

Die Aufreinigung der dsFv-Konstrukte wurde in drei Schritten erreicht. Eine erste Grobaufreinigung bei hoher Flussrate mittels Q-Sepharose Fast Flow (Pharmacia) musste durchgeführt werden, da für jeden Ansatz über ein Liter Proteinlösung zu verarbeiten war. Hierfür wurde eine C10 Säule (Pharmacia) mit 5 ml Q-Sepharose befüllt und mit 25 ml Puffer A, 25 ml Puffer B und mit 25 ml Puffer A equilibriert. Die Renaturierungs-Lösung wurde mit einer Flussrate von 10 ml pro Minute mittels einer Schlauchpumpe auf die Säule aufgebracht. Die Säule wurde mit 25 ml Puffer A gewaschen. Schwach bindende Proteine wurden dann mit 10 ml 10 % Puffer B (0,1 M NaCl in Puffer A) ausgewaschen. Die Elution der dsFv Konstrukte erfolgte durch 30 % Puffer B (0,3 M NaCl in Puffer A) bis in den 5 ml Fraktionen kein Protein mehr zu messen war. Die Hauptfraktionen wurden zusammengeführt und mit dem 5fachen Volumen Puffer A verdünnt. Der zweite Aufreinigungsschritt wurde auf einer FPLC (Pharmacia) mit einer Mono Q HR 5/5 Säule (Pharmacia) durchgeführt. Die Mono Q Säule wurde mit 10 ml Puffer A, 10 ml Puffer B und 10 ml Puffer A equilibriert. Die Proteinlösung wurde über die Pumpe A der FPLC bei 5 ml/min aufgebracht. Es wurde solange mit Puffer A gewaschen, bis im Durchfluss am UV-Meter (OD_{280}) kein Protein mehr zu messen war. Das Protein wurde mit einem 20 ml linearen Gradienten mit 0 – 50 % Puffer B (0 bis 0,5 M NaCl in Puffer A) in 2 ml Fraktionen eluiert. Die Hauptfraktionen wurden durch ein 4-20 %iges SDS-PAGE Gel unter reduzierenden und nicht reduzierenden Bedingungen aufgetrennt. Geeignete Fraktionen wurden zur weiteren Abtrennung von Aggregaten und zum Pufferwechsel auf PBS auf eine Superdex 75 HR 10/30 Gelfiltrationssäule aufgetragen. Die Säule wurde mit 30 ml PBS equilibriert. Die Beladung wurde über eine 1 ml Injektionsschleife durchgeführt, die Flussrate betrug 0,5 ml pro Minute. Es wurden 1 ml Fraktionen gesammelt.

Geeignete Fraktionen wurden zusammengeführt und sterilfiltriert. Danach wurde die Proteinkonzentration bestimmt, die Lösung aliquotiert und bei -70°C eingefroren.

3.2.16 Proteinlysate aus eukaryontischen Zellen

Proteinlysate aus eukaryontischen Zellen wurden durch Lyse mit L-CAM-Puffer hergestellt

(Cunningham et al. 1984). Auf eine mit PBS gewaschene, konfluent bewachsene Zellkulturschale (100 mm Durchmesser) wurden 500 µl L-CAM-Puffer aufgebracht. Der Zellrasen wurde mit Hilfe eines Zellschabers abgekratzt und in ein Eppendorfgefäß überführt. Während der 30 minütigen Inkubation auf Eis wurde der Reaktionsansatz mehrere Male geschwenkt. Der Ansatz wurde zentrifugiert (13000 UpM, 4°C, 10 min) und der Überstand in 50 µl 1 M Tris-HCl, pH 8 gegeben. Die Extrakte konnten bei –20°C gelagert werden.

3.2.17 Quantifizierung von Proteinen

Der Proteingehalt der Proben wurde nach der Bradford-Methode ermittelt (Bradford 1976). 50 µl der Probe wurden mit 1500 µl Bradford-Reagenz (Coomassie Plus Reagenz, Pierce) vermischt und die Extinktion bei 595 nm gegen eine Leerprobe ermittelt. Parallel wurde eine BSA Standard Konzentrationsreihe zwischen 2000 µg/ml und 2,5 µg/ml gemessen und eine Eichkurve erstellt.

3.2.18 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Proteine wurden durch eindimensionale, diskontinuierliche SDS-PAGE aufgetrennt. Je nach der Größe des interessierenden Proteins wurde eine Polyacrylamid-Konzentration von 7,5 %, 10 %, 12 % oder 15 % für das Trenngel und 4 % für das Sammelgel verwendet. Das Verhältnis des Quervernetzlers Bisacrylamid zu Polyacrylamid betrug in 7,5 %-, 10 %- und 12 %-Gelen 1:19, in 15 %-Gelen 1:29. Die Elektrophorese wurde mit 150-250 V in einer vertikalen Gelapparatur (Protean II, Biorad, München) durchgeführt. Polyacrylamid-Gele mit einem linearen Gradienten von 4 bis 20 % wurden käuflich erworben (Biorad, München).

3.2.19 Proteintransfer auf PVDF-Membran (Western-Blot)

Proteine wurden zum Zwecke der Immundetektion (siehe unten) mit Transferpuffer (25 mM Tris, 192 mM Glycin, 20 % Methanol) auf PVDF-Membranen der Porengröße 0,45 µm in einer Nassblot-Apparatur (Protean II, Biorad, München) transferiert. Der Transfer erfolgte für 1 Stunde bei einer festen Spannung von 100 V bei 4°C.

3.2.20 Immundetektion von Proteinen

Die Immundetektion wurde mit dem *Enhanced Chemiluminescence* (ECL)-System nach Angaben des Herstellers (Amersham) durchgeführt. Die Membranen wurden eine Stunde in Blockierungspuffer (TBST mit 2,5 % Milchpulver und 0,5 % BSA) bei 20°C blockiert und für 16 h bei 4°C mit den angegebenen Endkonzentrationen der primären Antikörper bzw. Antikörperkonstrukten in Blockierungspuffer inkubiert (siehe unten). Die Membranen wurden drei mal 10 min mit TBST gewaschen und 40 min mit dem sekundären Antikörper (Meerrettich-Peroxidase (HRP)-gekoppelte Ziege-Anti-Maus, Verdünnung 1 : 10000 in Blockierungslösung oder HRP-gekoppelte Ziege-Anti-Ratte Antikörper, Verdünnung 1:5000 in Blockierungspuffer) inkubiert. Für den Nachweis der spezifischen Bindung der dsFv Konstrukte wurde der Sekundärantikörper (Anti-*Pseudomonas* Exotoxin A, Verdünnung 1:5000) und der Tertiärantikörper (HRP-gekoppelte Ziege-Anti-Kaninchen, Verdünnung 1:2500) in Blockierungspuffer für 10 min bei 20°C vorinkubiert und 2 h bei 20°C auf der Membran inkubiert.

Die Membranen wurden drei mal mit TBST für 10 min gewaschen und 1 min mit ECL inkubiert. Die Visualisierung der Signale erfolgte durch Exposition eines Röntgenfilms.

3.2.21 Biacore Analysen (Surface Plasmon Resonance, SPR)

Für die Spezifitätskontrolle sowie die Bestimmungen der Assoziations- bzw. der Dissoziationskonstanten (k_a bzw. k_d) der mutationsspezifischen Antikörper und dsFv Konstrukte wurden Biacore-Analysen durchgeführt. Das Prinzip der Methode ist in **Abbildung 11** gezeigt. Ein Biacore Sensor NTA-Chip wurde eingesetzt, um die Bindung von E-Cadherin Konstrukten, die eine N-terminale 12-Histidin-Erkennungssequenz aufweisen (siehe Abschnitt 3.2.15.1) über ein Nickel-Chelat zu erreichen. Die Oberfläche des NTA-Chips besteht aus einer carboxymethylierten Dextranmatrix mit immobilisiertem NTA-Liganden (Nitrilotriacetic acid). Die Chip-Oberfläche wurde für jedes Experiment mit einem 5 µl Puls NiCl_2 in Laufpuffer regeneriert und mit dem jeweiligen E-Cadherin Konstrukt beladen. Für Kinetik-Experimente wurden zwischen 100 und 200 RU („arbitrary Response Units“) des jeweiligen E-Cadherin Konstruktes auf den Chip gekoppelt, gefolgt von der Injektion der

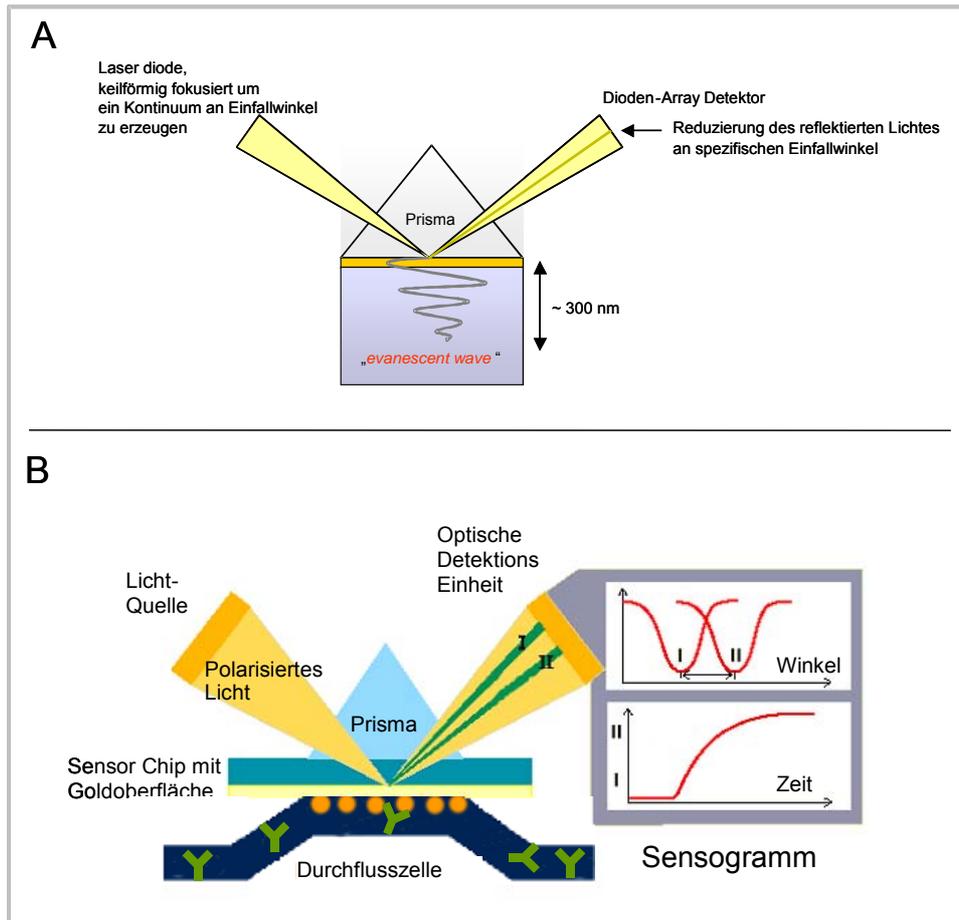


Abbildung 11: Prinzip der Surface Plasmon Resonance, ein optisches Phänomen, das verwendet werden kann, um Protein-Protein Interaktion durch Konzentrationsänderung an einer biospezifischen Oberfläche zu messen.

A: Einstrahlendes, polarisiertes Licht eines Lasers mit einem Kontinuum an Einfallswinkeln wird auf der Goldbeschichtung des Prismas vollständig reflektiert und über einen Dioden-Array-Detektor aufgenommen. Der Lichtstrahl interagiert mit dem Metal und verursacht eine elektromagnetische Feld-Komponente, die auch *evanescent wave* (schwindende Welle) genannt wird, die etwa eine Wellenlänge (~ 300 nm) in das Medium mit kleinerem Brechungsindex eindringt. Die Intensität des reflektierenden Lichtes ist an einem spezifischen Winkel stark reduziert. Mit Hilfe des Dioden-Arrays kann dieser „Schatten“ gemessen werden. Der Winkel, an dem dieser Schatten auftritt, wird SPR-Winkel genannt.

B: Der SPR-Winkel hängt von mehreren Faktoren ab, einer davon ist der Brechungsindex des Mediums in der Durchflusszelle, in das die *evanescent wave* eindringt. Alle anderen Faktoren werden konstant gehalten. Der Brechungsindex des Mediums ist wiederum abhängig von der Konzentration an im Medium gelösten Molekülen an der Kontaktfläche. Somit ist es möglich durch Messung des SPR-Winkels in Echtzeit die Konzentration an Molekülen an der Kontaktfläche zu messen. Bindet in der Abbildung der Antikörper (grün dargestellt) an die Antigene (orange Kugeln), die an die Dextranmatrix der Sensoroberfläche gekoppelt wurden, ändert sich der SPR-Winkel von I zu II. Die Veränderung des SPR-Winkels wird in ein sogenanntes Sensogramm umgerechnet, in dem eine aufsteigende Kurve eine Erhöhung der Antigenkonzentration an der Kontaktfläche darstellt. Die Einheit wird als „arbitrary Response Unit „(RU) bezeichnet.

Abbildungen verändert nach: Technology Note I, Surface plasmon resonance, BR-9001-15, September 2001, Biacore Inc.

Probe bei 5 µl Durchflussrate über 7 Minuten. Die Dissoziation der injizierten Proben wurde bei einer Flussrate von 5 µl pro Minute über 15 Minuten mit Laufpuffer gemessen. Zur Berechnung des k_a und k_d wurden mindestens 5 Verdünnungen der Probe (z. B. 100 nM, 50 nM, 25 nM, 12,5 nM und 6,25 nM) gemessen. Die Kurven wurden mit der Biacore Eva-

luation Software 2.0 überlagert und mit dem bivalenten Algorithmus (bei Antikörpern) oder einer Annahme einer 1:1 Interaktion (Langmuir Bindungs Modell) bei Fab-Fragmenten und dsFv Konstrukten angeglichen. Alle Verdünnungen wurden mit Laufpuffer hergestellt. Nach jedem Lauf wurde die Chipoberfläche mit einem Puls 6 M Guanidin-HCl und 350 mM EDTA für jeweils 1 Minute regeneriert. Alle eingesetzten Puffer wurden entgast.

Alle Biacore-Analysen wurden mit einem Biacore 1000 Gerät im Institut für Experimentelle Onkologie des Klinikum rechts der Isar durchgeführt.

3.2.22 Klonierung der dsFv Fragmente

3.2.22.1 Klonierungsstrategie

Die Klonierung der variablen Regionen der insgesamt 4 verschiedenen monoklonalen Antikörper wurde mit zwei unterschiedlichen Strategien verfolgt (**Abbildung 12**). Für die Klone 6H8 (anti $\Delta 9$ E-Cadherin) und 6D8 (anti $\Delta 8$ E-Cadherin) wurden PCR Primer verwendet, die durch Sequenzvergleiche bekannter variablen Regionen der Spezies Maus und Ratte in

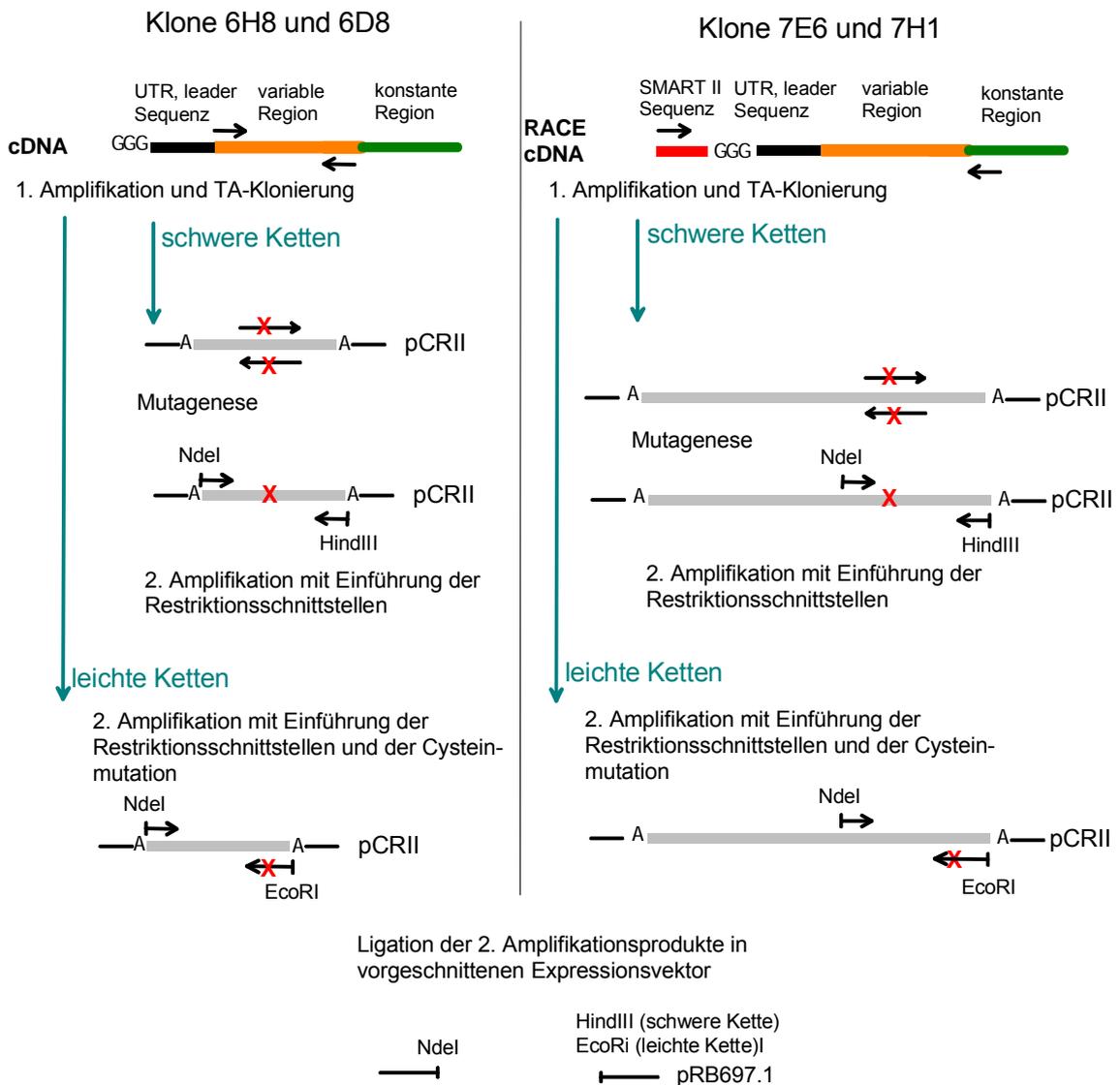


Abbildung 12: Schematische Darstellung der verschiedenen Klonierungsstrategien. Die Klone 6H8 und 6D8 (links) wurden aus cDNA mit Primer amplifiziert, die an den beiden Enden der variablen Regionen liegen. Die Klone 7E6 und 7H1 wurden ausgehend von RACE-cDNA mit einem Primer gegen die inkorporierte SMART II Sequenz und spezifischen Primer gegen Sequenzen am Anfang der konstanten Regionen der leichten und schweren Ketten amplifiziert. X: Cysteinmutation, → : Primer, |→: Primer mit Restriktionsschnittstelle

„Framework“ 1 der variablen Region und „Framework“ 4 der variablen Region (6D8) bzw. am Anfang der konstanten Region (6H8) konstruiert wurden (Dubel et al. 1994, Huse et al. 1989, Orlandi et al. 1989). Die Klonierung der Klone 7E6 und 7H1 wurde mit Hilfe der Rapid Amplification of cDNA ends PCR (RACE-PCR) erreicht. Dieses Verfahren wurde gewählt, da sich zeigte, dass durch die zuerst angewandte Amplifikation mit degenerierten Primern artifizielle Mutationen in „Framework“ 1 und „Framework“ 4 der variablen Regionen eingeführt wurden.

3.2.22.2 Klonierung der Klone 6H8 und 6D8

Die Klonierungs-PCR für die beiden leichten und schweren Ketten wurde mit den in der **Tabelle 2** angegebenen Primern und „Annealing“ Temperaturen durchgeführt.

Tabelle 2: Amplifikationsprimer und Temperaturen für die Klonierung der variablen Regionen der Klone 6H8 und 6D8.

Antikörper Klon	Kette	5' Primer	3' Primer	„Annealing“ Temperatur
6H8	leichte Kette	Bi7	Bi5	58°C
6D8	leichte Kette	kc5	kc3	62°C
6H8 / 6D8	schwere Ketten	hc5	hc3	62°C

Die PCR wurde nach dem Protokoll in Abschnitt 3.2.4 durchgeführt. Die PCR-Fragmente wurden danach aufgereinigt, in einen TA-Vektor einkloniert (siehe unten) und durch Sequenzierung analysiert.

3.2.22.3 Klonierung der Klone 7E6 und 7H1 mittels Rapid Amplification of cDNA Ends (RACE) PCR

Für die Klonierung der variablen Regionen der Klone 7E6 und 7H1 wurde RNA nach der Methode im Abschnitt 3.2.4 aus den entsprechenden Hybridomzellen isoliert. Die Umschreibung in cDNA wurde für die nachfolgende RACE-PCR abgewandelt. Es wurden 1 µg Gesamt-RNA eingesetzt. Das Prinzip beruht auf der Anlagerung eines Oligonukleotides (SMART II Oligo) am 3' Ende der cDNA an eine poly-Cytosin-Sequenz, die nach der Umschreibung an die cDNA durch die Reverse Transkriptase unspezifisch angefügt wurden. Als 3' Primer wurde ein modifizierter Oligo(dT) Primer (5' CDR) verwendet. In den nach-

folgenden PCR-Runden konnte mit Hilfe einer Mischung aus dem SMART II Oligo komplementären Primergemisch (UPM) die PCR ohne einen spezifischen 5' Primer durchgeführt werden. Der 3' Primer für die nachfolgende PCR wurde komplementär zu Sequenzen aus Framework 1 der konstanten Regionen der leichten, bzw. schweren Ketten konstruiert (GSP1). Für den gesamten RACE Ansatz wurde der SMART RACE cDNA Amplifikations Kit (Clontech, Heidelberg) verwendet.

Umschreibung in 5' RACE cDNA

Es wurden 1 µg Gesamt-RNA, 1 µl 5' CDS Primer und 1 µl SMART II Oligo in ein 0,5 ml Eppendorf Gefäß pipettiert und mit H₂O auf 5 µl Gesamtvolumen aufgefüllt. Der Ansatz wurde für 2 Minuten auf 70°C und für 2 Minuten auf Eis inkubiert und kurz abzentrifugiert. Es wurden 2 µl 5x First-Strand Puffer, 1 µl DTT (20 mM), 1 µl dNTP Mix (10 mM) und 1 µl Superscript II Reverse Transkriptase (200 U/µl) zugegeben, durch pipettieren gemischt, und kurz abzentrifugiert. Der Ansatz wurde bei 42°C für 1,5 Stunden in einen Luft-Inkubator inkubiert. Der Reaktionsansatz wurde mit 100 µl Tricine-EDTA-Puffer verdünnt, für 7 Minuten auf 72°C erhitzt und bei -20 °C aufbewahrt.

5' RACE PCR

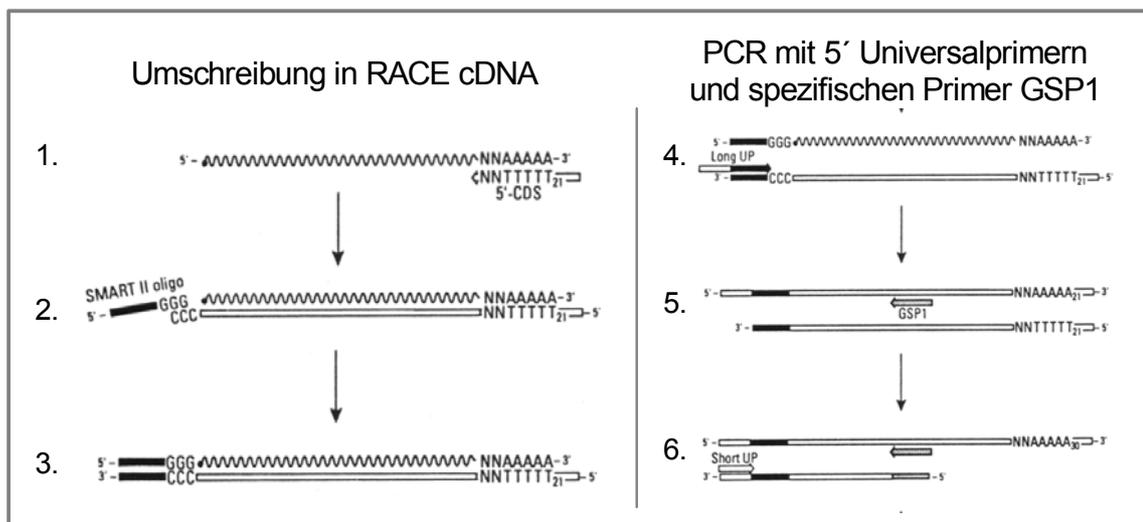


Abbildung 13: Schematische Darstellung der RACE Klonierungsstrategie. RACE cDNA wird durch Inkorporation des SMART II Oligonucleotides am 5' Ende der cDNA erhalten (1. bis 3.). Mittels eines Primergemisches aus Long UP der komplementär zu der SMART II Sequenz ist und Short UP, der wiederum komplementär zu der 5' Sequenz des Long Up Primers ist und einen spezifischen Primer (GSP1) kann mit nur einen spezifischen Primer das vollständige 5' Ende der cDNA amplifiziert werden.

Der PCR-Ansatz wurde nach den Angaben des Herstellers (Clontech, Heidelberg) ange-

setzt. Als spezifische Primer (GSP 1) wurde für die leichten Ketten der Klone 7E6 und 7H1 der Primer „kappa const“ und für die schweren Ketten der Primer „heavy const“ verwendet. Der Primer „heavy const“ ist revers komplementär zu den Codons 116 bis 124 der konstanten Region der schweren Kette von IgG1, IgG2a und IgG2b der Spezies Ratte (Kabat et al. 1991). Der Primer „kappa const“ ist revers komplementär zu den Codons 113 bis 121 der konstanten Region der leichten Kette des Subtyps kappa der Spezies Ratte (Kabat et al. 1991).

Es wurde folgendes *Touchdown* PCR-Programm verwendet:

5 Zyklen	94°C für 5 sec, 72°C für 3 min
5 Zyklen	94°C für 5 sec, 70°C für 10 sec, 72°C für 3 min
25 Zyklen	94°C für 5 sec, 68°C für 10 sec, 72°C für 3 min

Im Anschluss wurde der Ansatz für 7 Minuten bei 72°C inkubiert und für die TA-Klonierung wie in Abschnitt 3.2.7 vorbereitet.

3.2.22.4 TA-Ligation, Topo TA-Ligation

Die Gel-aufgereinigten amplifizierten variablen Regionen aus Abschnitt 3.2.22.2 und 3.2.22.3 wurden in einen TA-Vektor oder Topo-TA-Vektor (beide Invitrogen), die beide linearisiert sind und über Thymidin Überhänge an den 3' - Enden verfügen, ligiert. Bei dem Topo-TA-Vektor ist an beiden Enden das Enzym Topoisomerase I gebunden, das die Effizienz der Ligation erhöht (Shuman 1994).

Für die TA-Ligationen wurde der Ligationsansatz in 10 µl Volumen mit 1 µl 10 x Ligationspuffer, 2 µl pCRII Vektor, 3 molaren Überschuss an PCR-Fragment (1-5 µl) und 1 µl T4 DNA-Ligase für 16 h bei 15°C inkubiert. Bei Verwendung des Topo-TA-Vektors wurden 0,5 µl Vektor (Topo-pCRII) verwendet und für 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert.

3.2.22.5 Umklonierung der variablen Regionen in den Expressionsvektor

Zur Expression wurden die leichten und schweren Ketten der 4 Antikörper in das T7- Promotor basierte Expressionplasmid pRB697.1 (freundlicherweise zur Verfügung gestellt von

Dr. Tapan Bera, Bethesda, MA, USA), welches für eine modifizierte Form des *Pseudomonas* Exotoxin A (PE38) codiert, einkloniert. Für die Ligationen der schweren Ketten wurde der Vektor mit den Restriktionsenzymen NdeI und HindIII linearisiert, für die Ligation der leichten Ketten wurde der Vektor durch die Restriktionsenzyme NdeI und EcoRI vorberei-

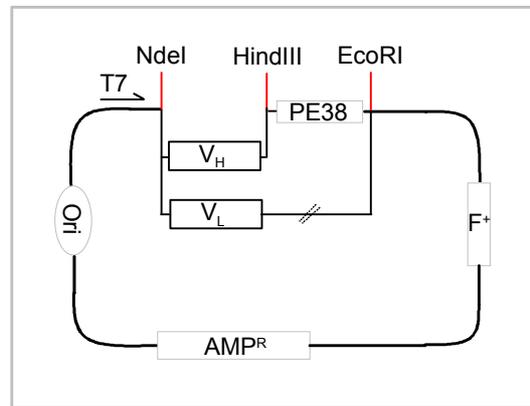


Abbildung 14: Schematische Darstellung des *Pseudomonas* Exotoxin A Expressionsvektor (pRB697.1).

tet, wobei das PE38 mit ausgeschnitten wurde (**Abbildung 14**).

Die variablen Regionen der leichten Ketten aus Abschnitt 3.2.22.2 (Klone 6H8 und 6D8) und 3.2.22.3 (Klone 7H1 und 7E6) wurden durch PCR aus den entsprechenden TA-Vektoren amplifiziert. Dabei wurde über den 5' Primer eine NdeI Schnittstelle, und mit dem 3' Primer ein Cysteinocodon an Aminosäureposition 100, 2 Stoppcodons und die EcoRI Schnittstelle eingebaut. Die schweren Ketten wurden durch eine PCR aus den mutagenisierten TA-Vektoren amplifiziert. Analog zu den leichten Ketten wurden über den 5' Primer eine NdeI Schnittstelle eingebaut. Mit dem 3' Primer wurde eine HindIII Schnittstelle eingebaut, die eine Fusion der variablen Region im selben Leseraster wie das *Pseudomonas* Exotoxin A zuließ. **Tabelle 3** zeigt die Matrizenplasmide, Primer und PCR Bedingungen für alle Klone.

Die PCR Produkte der leichten Ketten wurden mit den Restriktionsenzymen NdeI und EcoRI, die Amplifikate der schweren Ketten mit NdeI und HindIII geschnitten, über ein Agarose-Gel aufgereinigt und in die vorbereiteten Expressionsvektoren ligiert. Die Überprüfung der Sequenzen wurde durch DNA-Sequenzierung erreicht.

Tabelle 3: Verwendete Primer zur Umklonierung in den *Pseudomonas* Exotoxin A Expressionsvektor ausgehend von den originalen variablen Regionen der leichten Ketten und den an Codon 44 zu Cystein mutagenesierten schweren Ketten aus den TA-Vektoren. Die Annealing Temperatur war für alle Amplifikationen 65°C.

Endkonstrukt in PE-Expressionsvektor	Matrize (in TA-Vektor)	5' Primer	3' Primer
6H8lexp	6H8 light	6H8 light fw	6H8 light rev
6D8lexp	6D8 light	6D8 light fw	6D8 light rev
7E6lexp	7E6 light	7E6 light fw	7E6 light rev
7H1lexp	7H1 light	7H1 light fw	7E6 light rev
6H8hexp	6H8 heavy mut	6H8 heavy fw	6H8 heavy rev
6D8hexp	6D8 heavy mut	6D8 heavy fw	6D8 heavy rev
7E6hexp	7E6 heavy mut	7E6 heavy fw	7E6 heavy rev
7H1hexp	7H1 heavy mut	7H1 heavy fw	7H1 heavy rev

3.2.23 Proteinsequenzierung 6H8 und 6D8 leichte Ketten

Um die DNA Sequenzen aus der Klonierung der leichten Ketten der Antikörperklone 6H8 und 6D8 zu bestätigen wurde eine Proteinsequenzierung durch die Firma Toplab, Martinsried in Auftrag gegeben. Hierfür wurden 10 µg der Antikörper in reduzierendem Proteinprobenpuffer für 5 min bei 90°C inkubiert und in einem 4-20 %igen SDS-PAGE-Gradientengel aufgetrennt. In Abwandlung zu Abschnitt 3.2.19 wurde der Transfer der Proteine auf eine PVDF Membran ein Tris-Borat Puffer verwendet. Der Transfer wurde für 2 Stunden bei 50 Volt durchgeführt. Die Membran wurde kurz in Coomassie Blau gefärbt und in Entfärbelösung entfärbt. Nach Lufttrocknung konnten die leichten Ketten auf den Blot eingezeichnet werden.

3.2.24 Screening von humanen kombinierten Antikörper-Bibliotheken (HuCAL)

Um gegen die E-Cadherin Deletionsmutanten spezifische humane Binder im „single-chain“ oder F(ab) Format zu erhalten, wurde in Kooperation mit der Firma Morphosys, Martinsried, ein Screening verschiedener humaner kombinatorischen Antikörper-Bibliotheken (HuCAL Bibliotheken)(Knappik et al. 2000) durchgeführt. Mittels eines Phage Display Screenings wurden durch die Firma Morphosys spezifische Phagen durch Bindung an Peptide, die den Übergang von Exon 7 zu Exon 9 ($\Delta 8a/b/c/e$) bzw. Exon 8 zu Exon 10

($\Delta 9a/b/c/e$; siehe Abschnitt 3.1.9) repräsentieren, selektioniert. Des Weiteren wurden zur Selektion von spezifischen Phagenbindern die E-Cadherin Deletions-Konstrukte (siehe Abschnitt 3.2.15.1) und transfizierte Zellen, die auf der Oberfläche die jeweilige Deletionsmutante exprimierten, verwendet. Positive Klone wurden auf ihre Bindungseigenschaften getestet.

3.2.25 Zytotoxizitäts-Assays

Zur Bestimmung der spezifischen Zytotoxizität der hergestellten Immuntoxine wurden zwei verschiedene Nachweisweismethoden verwendet. Der XTT-Assay basiert auf dem mitochondrialen Umsatz des Tetrazoliumsalzes XTT zu Formazan in metabolisch aktiven Zellen (Alley et al. 1988, Scudiero et al. 1988). Die Auswertung erfolgte colorimetrisch in einem ELISA-Reader. Beim Kolonie-Assay wachsen Einzelzellen zu Kolonien heran, die gefärbt und mittels Scanner dokumentiert werden können. Die Quantifizierung des zytotoxischen Effekts erfolgt durch das Auszählen der Zellkolonien.

3.2.25.1 XTT-Assay

In die Vertiefungen einer 96-well Platte wurden 4000 Zellen in 200 μ l Medium, 10 % FCS eingesät und für 2 Tage bei 37°C und 5 % CO₂ in einem Zellinkubator inkubiert. In das Medium wurden 20 μ l einer seriellen Verdünnungsreihe (in PBS, 0,2 % BSA) des Immuntoxins oder der dsFv-Konstrukte jeweils im Vierfach-Ansatz zugegeben und für 3 bis 5 Tage im Zellinkubator inkubiert. Nach Abnahme von 120 μ l des Mediumüberstandes konnte die Vitalität der Zellen durch Zugabe von 50 μ l XTT-Reagenz und Inkubation und Messung nach Angaben des Herstellers (Roche, Mannheim) bestimmt werden. Für die Berechnung des Prozentsatzes an vitalen Zellen, wurde die Adsorption in den Vertiefungen der Kontrollzellen (ohne Toxin, DMEM 10% FCS) auf 100 Prozent gesetzt.

3.2.25.2 Koloniebildungs-Assay

Zur Bestimmung des zytotoxischen Effekts mittels eines Koloniebildungs-Assays wurden jeweils 10³ Zellen in 2 ml Medium mit 10 % FCS in die Vertiefungen einer 6-well Platte

ausgesät. Nach 1 bis 2 Stunden im Zellinkubator wurden 200 µl einer seriellen Verdünnung der Immuntoxine in PBS mit 0,2 % BSA hinzugegeben (erneute 1:10 Verdünnung). Die Platten wurden für 7 bis 14 Tage im Zellinkubator inkubiert. Die Platten wurden ein mal mit PBS gewaschen und mit Diff-Quick Lösung 1 fixiert und mit Lösung 2 gefärbt. Nach dem Waschen der Platten konnten diese mit einem Scanner digital dokumentiert werden. Für die Auswertung wurden die Kolonien einer ganzen Vertiefung mit Hilfe des Bildanalyseprogrammes Scion Image (Copyright 1998 Scion Cooperation, Frederick, Maryland, USA) gezählt.

3.2.25.3 Videosequenzen unter dem Laser-Scanning Mikroskop (LSM)

Für die Langzeitbeobachtung von L929 Zellen, transfiziert mit wt- und $\Delta 9$ E-Cadherin, unter Einfluss des Immuntoxins 7E6dsFvKDEL wurde ein spezieller Zellinkubator (Spezialanfertigung der Firma Zeiss, Oberkochen) unter einem Laser-Scanning Mikroskop (LSM510, Zeiss, Oberkochen) verwendet. Der Zellinkubator erlaubte eine Inkubation der Zellen bei 5 % CO₂ und 37°C direkt im Strahlengang des Mikroskopes. Eine hohe Luftfeuchtigkeit wurde durch ein Wasserreservoir im Inneren der Inkubationskammer erreicht.

Wt E-Cadherin transfizierte L929 Zellen wurden für 16 h mit dem Farbstoff Dil (1,1'-dioctadecyl-3,3,3',3'-tetramethylindocarbocyanin *e perchlorate*) in einer Verdünnung von 1:1000 (Ausgangskonzentration 2,5 mg/ml in DMSO) in DMEM, 10 % FCS bei 37°C und 5% CO₂ in einem Zellinkubator inkubiert. Der Farbstoff Dil interkaliert mit seinen zwei langkettigen, lipophilen Alkylketten mit der Membran der Zellen. Es konnte gezeigt werden, dass dieser Farbstoff keinen merklichen Effekt auf die Zellvitalität, Zellentwicklung und grundlegenden physiologischen Eigenschaften hat (Honig und Hume 1986). Die Zellen wurden drei Mal mit PBS gewaschen und mit Versene-EDTA abgelöst. 3*10⁴ Zellen wurden in DMEM, 10% FCS in spezielle Zellkulturschalen mit Glasboden (35 mm Durchmesser, MatTek Corporation, Ashland, MA, USA) eingesät. Unter dem LSM wurde sichergestellt, daß die wt E-Cadherin transfizierten L929 Zellen den Farbstoff in ihre Zellmembran aufgenommen hatten. L929 Zellen, transfiziert mit $\Delta 9$ E-Cadherin wurden ebenfalls mit Versene-EDTA abgelöst, mit PBS gewaschen und 3*10⁴ Zellen wurden mit zu den wt E-Cadherin

transfizierten Zellen gesät. Nach einer Stunde im Zellinkubator wurde das 7E6dsFvKDEL Konstrukt in einer Konzentration von 10 ng/ml zugegeben. Die Zellschale wurde nun in den Zellinkubator bei 37°C und 5 % CO₂ unter das Laser-Scanning-Mikroskop gegeben. Es wurden alle 5 Minuten jeweils eine Phasenkontrastaufnahme und eine Aufnahme mit dem TRITC-Kanal des Mikroskopes erstellt. Die Aufnahmen wurden überlagert und zur Erstellung der Videosequenzen in das Programm Quicktime (Version 5, © Apple Computer Inc., Cupertino, CA, USA) eingelesen.

4 Ergebnisse

Grundlage dieser Arbeit waren vier monoklonale Rattenantikörper, die Klone 6H8 und 7E6 gegen Exon 9 deletiertes E-Cadherin ($\Delta 9$ E-Cadherin) und die Klone 6D8 und 7H1 gegen Exon 8 deletiertes E-Cadherin. Diese Antikörper wurden durch Immunisierung von Ratten mit Peptiden, die den Exon 7/ Exon 9 Fusionsübergang (für die $\Delta 8$ E-Cadherin spezifischen Klone) und Exon 8/ Exon 10 Übergang repräsentieren (für die $\Delta 9$ E-Cadherin spezifischen Klone) und anschließender Verschmelzung mit Hybridomzellen hergestellt (Becker et al. 1999).

Ziel der Arbeit war es, aus diesen monoklonalen Antikörpern mutationsspezifische, funktionale Immuntoxine herzustellen. Die Ausgangsantikörper wurden hierfür umfassend auf ihre Spezifität und Affinität (Bindungsstärke) mit verschiedenen Methoden analysiert. Die Etablierung der verschiedenen Methoden bildete zudem die Grundlage für die Austestung der chemisch gekoppelten, sowie der klonierten, rekombinant hergestellten Immuntoxine.

4.1 Charakterisierung der mutationsspezifischen Antikörper

4.1.1 Herstellung verschiedener E-Cadherin EC2-EC3-Varianten

Alle verwendeten Klone wurden in vorangegangenen Arbeiten auf ihre Spezifität mit Western Blot Analysen untersucht (Becker et al. 1999). Für eine Quantifizierung der Affinität der Klone und die sensitive Messung möglicher Kreuzreaktivitäten habe ich die Surface Plasmon Resonanz (SPR, Biacore) eingesetzt. Zur Kopplung an den Biacore NTA-Chip über ein Nickel-Chelat wurden die mit einer 12 fachen Histidin-Erkennungssequenz versehenen E-Cadherin Teil-Konstrukte $\Delta 8$, $\Delta 9$ und wild-typ (wt) exprimiert und aufgereinigt (siehe Abschnitt 3.2.15.1). Alle drei Konstrukte konnten in *E. coli* in Inclusion-Bodies exprimiert werden. Zwischen einem und drei Milligramm Protein konnten aus 400 ml Bakterienkultur aufgereinigt werden. Die Analyse der aufgereinigten Proteinkonstrukte im SDS-PAGE Gel zeigte Banden in den zu erwartenden Größen und einer geforderten Reinheit von größer 90 Prozent (**Abbildung 15 A**). Um eine Oligomerisierung der E-Cadherin

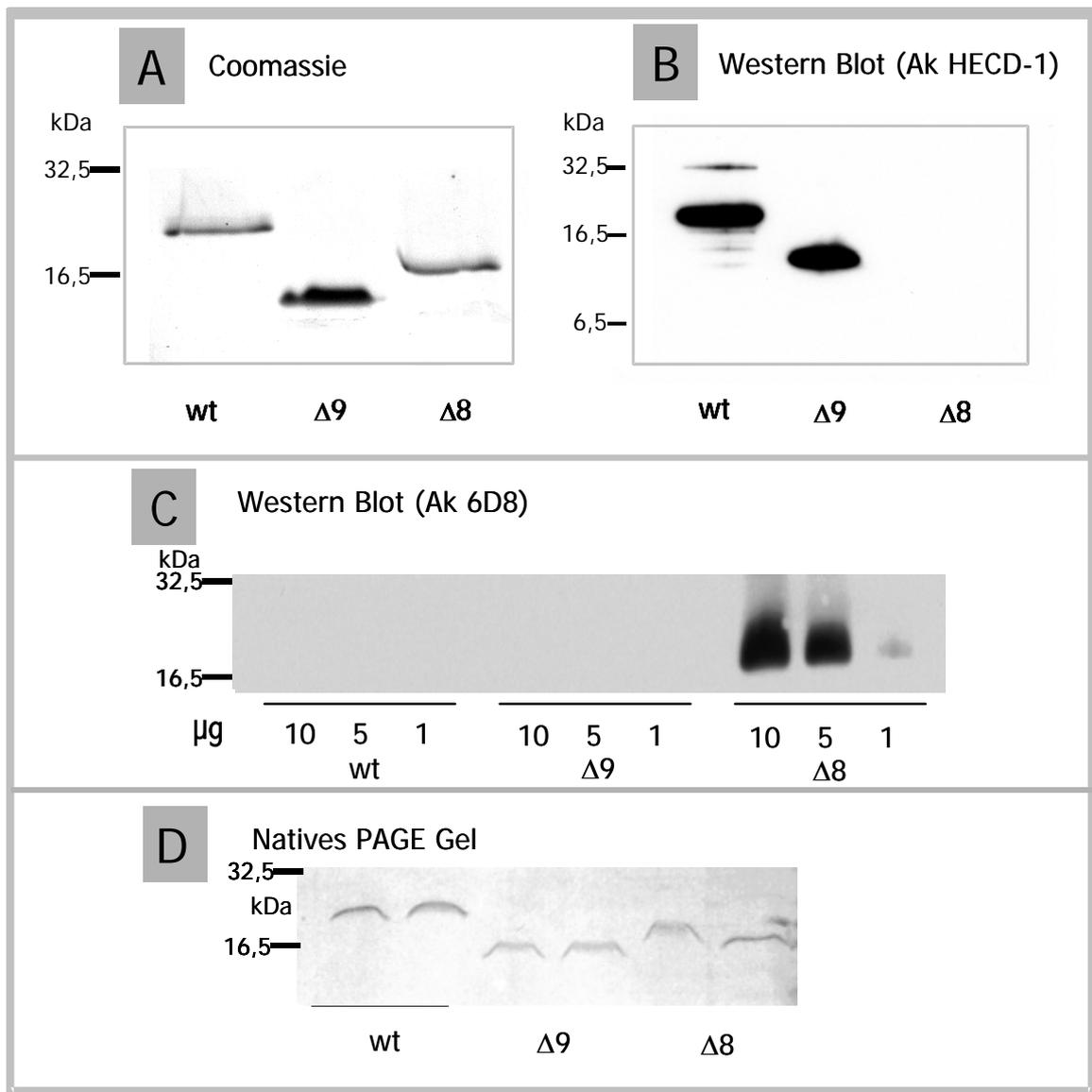


Abbildung 15:

(A) SDS-Page: Laufverhalten und Reinheit der aufgereinigten E-Cadherin Teil-Konstrukte (EC2-EC3). Alle drei Konstrukte laufen im Gel auf der durch die Proteinsequenz errechneten Größe von 21 kD (Spur 1, wt E-Cadherin), 17 kD (Spur 2, $\Delta 9$ E-Cadherin) und 15 kD (Spur 3, $\Delta 8$ E-Cadherin). Die Reinheit der drei Konstrukte kann als größer 90 Prozent eingeschätzt werden. Die Proteine wurden in einem 12,5 %igem SDS-PAGE Gel aufgetrennt und mit Coomassie Blau gefärbt. Aufgetragen wurden 1 μg Protein.

(B) Western Blot Analyse. Die wt und $\Delta 9$ E-Cadherin Konstrukte in Spur 1 und 2 konnten mit dem monoklonalen Antikörper HECD-1 nachgewiesen werden. HECD-1 reagiert nicht mit $\Delta 8$ E-Cadherin (Becker et al. 2002). Aufgetragen wurden 1 μg Protein.

(C) Western Blot Analyse der E-Cadherin Teilkonstrukte mit dem mutationsspezifischen Antikörper 6D8. Aufgetragen wurden 10, 5 und 1 μg Protein.

(D) Native PAGE Gel Elektrophorese der E-Cadherin Teilkonstrukte. Aufgetragen wurden jeweils zwei verschiedene Aliquots.

Konstrukte auszuschließen, wurde ebenfalls eine native PAGE-Gelelektrophorese durchgeführt. Es zeigten sich diskrete Banden der einzelnen Konstrukte auf der Höhe der entsprechenden Monomere (Abbildung 15 D).

Mittels Western Blot Analyse konnte bestätigt werden, dass es sich bei den aufgereinigten Proteinen um E-Cadherin handelt. Der monoklonale Antikörper HECD-1 bindet spezifisch im Exon 8 des E-Cadherins. **Abbildung 15 B** zeigt eine Anfärbung des wt E-Cadherin Konstruktes (Spur 1) und des $\Delta 9$ E-Cadherin Konstruktes (Spur 2). Das $\Delta 8$ E-Cadherin Proteinkonstrukt zeigt keine Reaktion (Spur 3), da sich das Epitop des monoklonalen Antikörpers (mAk) HECD-1 in Exon 8 des E-Cadherins befindet (Becker et al. 2002). Mittels des $\Delta 8$ E-Cadherin spezifischen Antikörpers 6D8 konnte das E-Cadherin Teilkonstrukt mit Exon 8 Deletion spezifisch angefärbt werden (**Abbildung 15 C**). Ein Antikörper gegen die Histiidin-Erkennungssequenz (Anti PentaHis, Qiagen) markierte im Western-Blot alle drei Konstrukte (Daten nicht gezeigt).

4.1.2 Bindungseigenschaften der Antikörper

Um die monoklonalen Antikörper auf mögliche Kreuzreaktivitäten mit wt E-Cadherin zu testen, wurden ein Biacore NTA-Chips mit jeweils etwa 100 bis 200 „arbitrary Response Units“ (RU) des wt E-Cadherin Konstruktes beladen. Die Messung der Kreuzreaktivität wurde mit einer 100 nM Verdünnung der zu testenden Antikörper durchgeführt. Als Positivkontrolle wurde die Bindung einer 100 nM Verdünnung des Antikörpers HECD-1 an das wt E-Cadherin gemessen (**Abbildung 16 A**). Zum Zeitpunkt des Injektionsstarts der Antikörper (bei etwa 50 Sekunden) ist ein Anstieg der SRP-Signale bei allen Antikörpern zu sehen. Dieser schnelle Anstieg basiert nicht auf einer Bindung der Antikörper, sondern ist

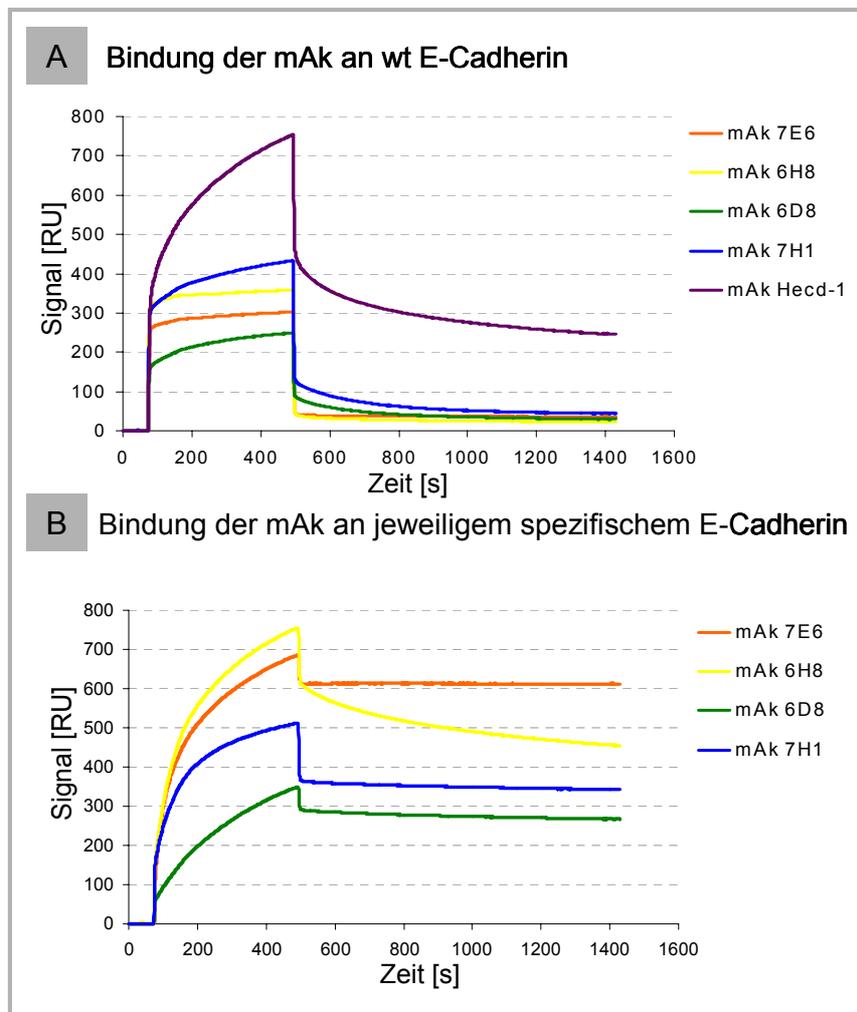


Abbildung 16: Surface Plasmon Resonanz (SPR) der monoklonalen E-Cadherin spezifischen Rattenantikörper. Injiziert wurden 60 μ l einer 100 nM Verdünnung der jeweiligen Antikörper bei einer Durchflussrate von 5 μ l pro Minute.

(A) Assoziations- und Dissoziationsverhalten der mAk auf wt E-Cadherin. Als Kontrolle für die Funktionalität des gebundenen wt E-Cadherins wurde der kommerzielle anti E-Cadherin Antikörper HECD-1 eingesetzt.

(B) Bindungsverhalten der mAk gegen spezifisches E-Cadherin. Für die mAk 7E6 und 6H8 wurde del 9 E-Cadherin, für die mAk 7H1 und 6D8 del 8 E-Cadherin auf der Chipoberfläche aufgebracht.

bedingt durch den unterschiedlichen Pufferzusammensetzung in den Antikörperverdün-
 nungen im Vergleich zu dem Laufpuffer des Biacore Systems (Puffersprung). Da die Anti-
 körper, bedingt durch unterschiedliche Ausgangskonzentrationen, verschieden stark mit
 dem Laufpuffer verdünnt werden, sind die Puffersprünge mehr oder weniger ausgeprägt.
 Für die Messungen ist dieser Effekt nicht relevant, da die Injektionsstart- und Endpunkte
 für alle Berechnungen ausgeschlossen werden. Während der Injektionsphase der Antikörper
 ist für die mutationsspezifischen Antikörper fast gar kein Ansteigen der Kurve zu beob-
 achten.

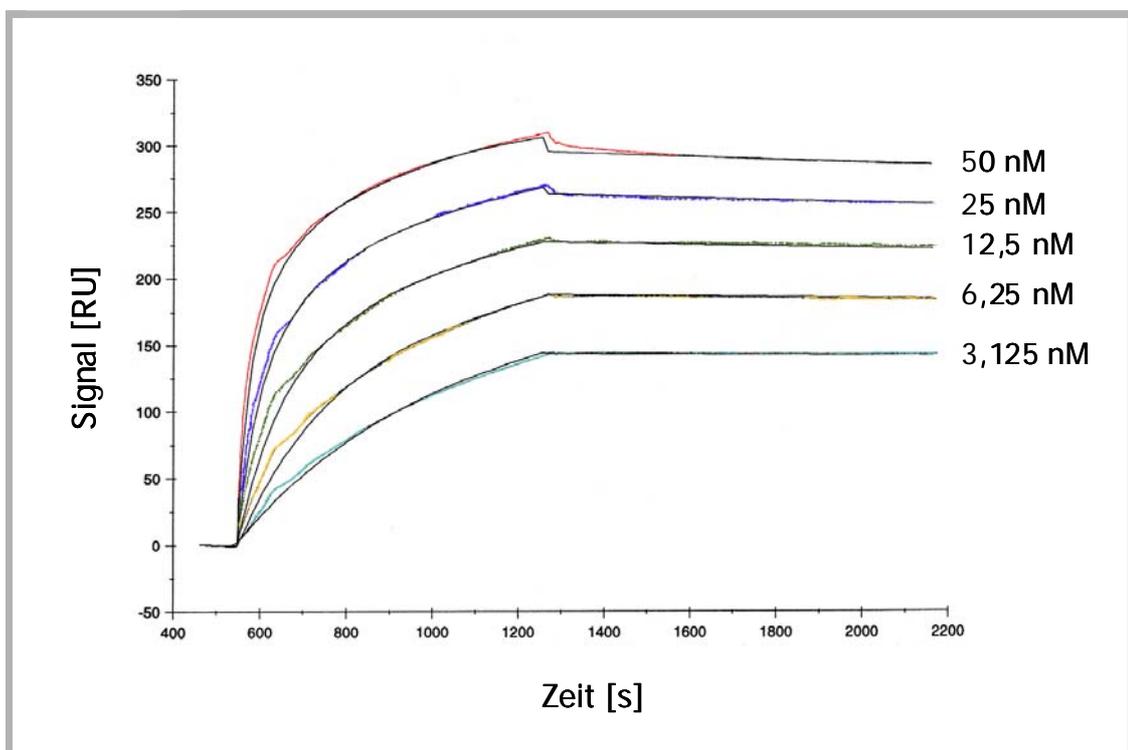


Abbildung 17: Überlagerte Surface Plasmon Resonanz Profile des Antikörpers 7E6 mit verschiedenen Konzentrationen zur Berechnung der Dissoziationskonstanten. Bei den farbigen Kurven handelt es sich um die Originaldaten, die schwarzen Kurven stellen die Angleichung an das Kinetikmodell dar (Bivalentes Modell).

Während man für die beiden $\Delta 9$ E-Cadherin spezifischen Antikörper 7E6 und 6H8 keine Bindung an das wt E-Cadherin beobachten kann, ist für die beiden $\Delta 8$ E-Cadherin spezifischen Antikörper ein leichter Anstieg der Kurven zu erkennen. Für diese zeigt sich eine – wenn auch sehr schwache- Kreuzreaktion zu wt E-Cadherin. Für den wt E-Cadherin spezifischen Antikörper HECD-1 ist eine starke Assoziation zu beobachten. Das auf den Chip aufgebrachte rekombinante wt E-Cadherin Konstrukt ist somit funktional. In **Abbildung 16**

B sind die Sensogramme von einer jeweils 100 nM Verdünnung der vier mAk gegen die jeweils passende E-Cadherin Mutante zu sehen. Alle vier mAk zeigen ausgeprägte Bindungseigenschaften. Die beiden $\Delta 9$ E-Cadherin spezifischen mAk 7E6 und 6H8 zeigen jedoch einen deutlich steileren Anstieg im Sensogramm. Die schwächste Assoziation zeigt der $\Delta 8$ spezifische Klon 6D8. Für die beiden $\Delta 9$ spezifischen Klone sind starke Unterschiede im Dissoziationsverhalten zu erkennen. Während die Kurve für den Klon 6H8 schnell abfällt, ist sie für den Klon 7E6 vergleichsweise stabil. Aus dem Vergleich aller vier Sensogramme geht dieser Klon als der beste Binder mit ausgezeichnetem Assoziations- und Dissoziationsverhalten hervor.

Zur Berechnung der Assoziations- (k_a) bzw. Dissoziationskonstanten (k_d) der vier monoklonalen mutationsspezifischen Antikörper wurden die Bindungskurven aus mindestens vier verschiedenen Antikörperverdünnungen (z.B. 50, 25, 12,5 und 6,25 nM) gegen das jeweilige spezifische E-Cadherin Konstrukt überlagert und eine Angleichung an die Kinetik

Tabelle 4: Biacore Analysen der Bindungseigenschaften der monoklonalen Antikörper. Gezeigt sind die Assoziationskonstanten k_a und die Dissoziationskonstanten k_d . Der K_D wurde errechnet aus $K_D = k_d / k_a$.

	k_a [1/Ms]	k_d [1/s]	K_D [M] (bivalent fitting)
<i>mAk gegen $\Delta 9$ E-Cadherin</i>			
7E6	$3,7 * 10^5$	$4,4 * 10^{-5}$	$1,2 * 10^{-10}$
6H8	$2,3 * 10^5$	$3,4 * 10^{-4}$	$1,5 * 10^{-9}$
<i>mAk gegen $\Delta 8$ E-Cadherin</i>			
6D8	$3,9 * 10^4$	$3,1 * 10^{-4}$	$8,1 * 10^{-9}$
7H1	$7,9 * 10^5$	$2,7 * 10^{-5}$	$3,5 * 10^{-11}$

erstellt (**Abbildung 17**). Wie **Tabelle 4** zu entnehmen ist, zeigen alle vier Klone gute Bindungseigenschaften, der errechnete K_D Wert liegt jeweils im nano- bis picomolaren Bereich. Die beiden $\Delta 9$ E-Cadherin Binder 7E6 und 6H8 zeigen eine nahezu identische Assoziationskinetik. Unterschiede sind in ihrem Dissoziationsverhalten zu erkennen. Klon 7E6 zeigt eine um zehn Größenordnungen bessere Dissoziationskinetik. Dies bedeutet, dass

die Antigen-Antikörper Bindung stabiler ist und der Antikörper langsamer abdissoziiert. In den Originalsensogrammen aus den Biacore Analysen ist dieser Effekt durch eine sehr flache, wenig abfallende Dissoziationskurve zu erkennen (siehe Bsp. mAk 7E6 in **Abbildung 17**). Die $\Delta 8$ E-Cadherin Binder 7H1 und 6D8 unterscheiden sich ebenfalls erheblich in ihrem Bindungsverhalten. Die Assoziationskonstante des Klons 7H1 ist um 20 Größen-

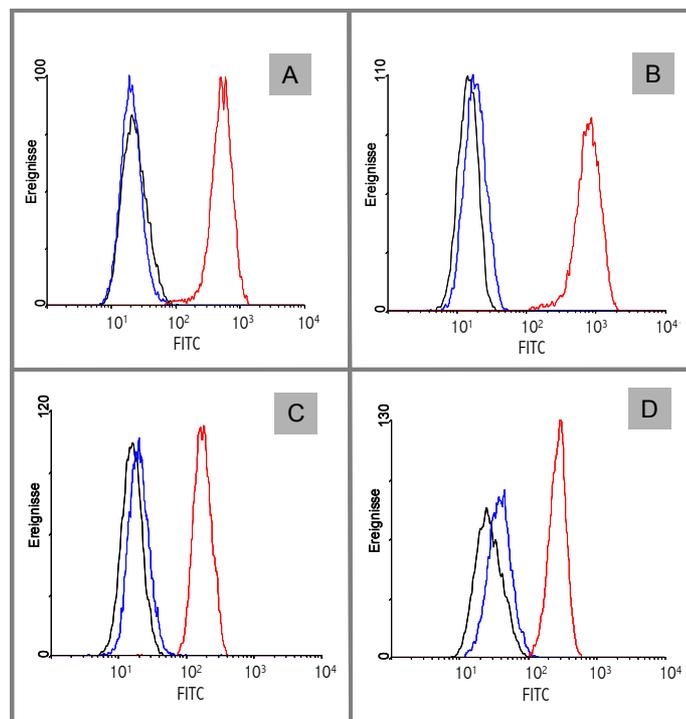


Abbildung 18: FACS Analyse von nicht transfizierten (schwarze Linie) und mit wt (blaue Linie) und $\Delta 8$ oder $\Delta 9$ E-Cadherin (rote Linie) transfizierten MDA-MB-435 Zellen

(A): Antikörper 7E6, $\Delta 9$ E-Cadherin, (B): Antikörper 6H8, $\Delta 9$ E-Cadherin, (C): Antikörper 6D8, $\Delta 8$ E-Cadherin, (D): Antikörper 7H1, $\Delta 8$ E-Cadherin.

nordnungen besser als die des Klones 6D8. Auch im Dissoziationsverhalten zeigt der Klon 7H1 im Vergleich zu Klon 6D8 ein um fast 9 Größenordnungen besseres Verhalten. Die Kinetikbestimmungen legen nahe, dass der $\Delta 9$ E-Cadherin Antikörper 7E6 und der $\Delta 8$ E-Cadherin Antikörper 7H1 die aussichtsreichsten Kandidaten für die Verwendung als Immunotoxin sind.

Um die Bindungseigenschaften der vier Klone gegen natives, auf der Oberfläche von Zellen exprimiertes E-Cadherin zu bestimmen, wurde eine E-Cadherin FACS Analyse mit unfixierten MDA-MB-435 Zellen durchgeführt. **Abbildung 18** zeigt die Bindung der Antikörper an Zellen, welche die spezifische Deletionsmutante (rote Kurve) exprimierten, im Vergleich zu

nicht transfizierten Zellen (schwarze Kurve) und mit wt E-Cadherin transfizierten Zellen (blaue Kurve). Keiner der vier Antikörperklone zeigte eine Kreuzreaktivität zu wt E-Cadherin, exprimiert auf der Oberfläche der MDA-MB-435 Zellen. Alle vier Antikörper zeigen auf den Positivansätzen (spezifische Deletionsmutante $\Delta 9$ E-Cadherin, Antikörper 7E6

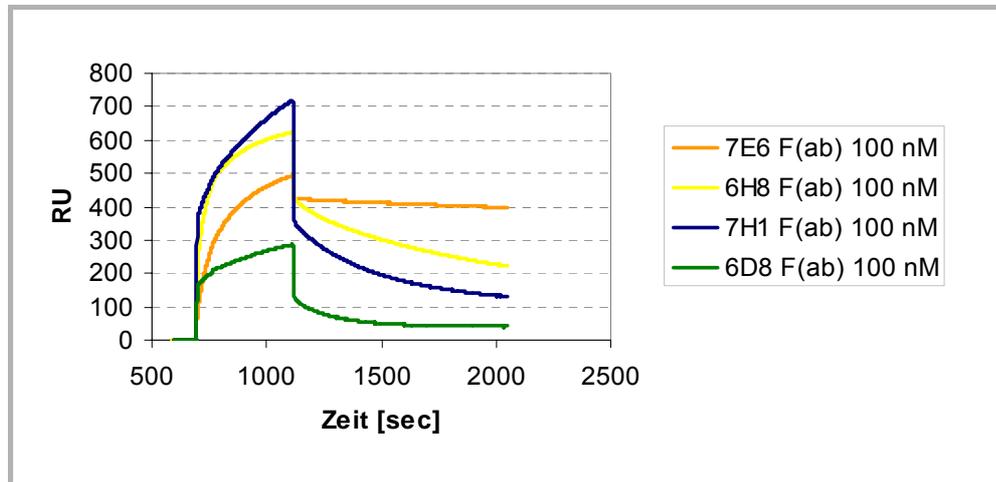


Abbildung 19: Überlagerte Biacore Sensogramme. Assoziations- und Dissoziationsverhalten der F(ab) Fragmente der vier monoklonalen mutationsspezifischen Antikörper. Gezeigt sind 100 nM Verdünnungen bei einer Flussrate von fünf $\mu\text{l}/\text{min}$.

und 6H8 und $\Delta 8$ E-Cadherin, Antikörper 7H1 und 6D8) eine starke positive Verschiebung des Fluoreszenzmaximums. Eine Kreuzreaktion mit anderen unspezifischen Proteinen, hervorgerufen durch Expression auf der Oberfläche der MDA-MB-435S Zellen, konnte ausgeschlossen werden, da keine Verschiebung der Fluoreszenzmaxima in Testansätzen ohne den ersten Antikörper zu den nicht transfizierten Zellen mit Antikörper zu beobachten waren (Daten nicht gezeigt). Analoge Ergebnisse wurden bei FACS-Analysen mit L-929 Mausfibroblasten, transfiziert mit den E-Cadherin Mutanten, erzielt (Daten nicht gezeigt).

Antikörper sind bivalent, d. h. sie besitzen zwei identische Bindungsregionen. Um das Bindungsverhalten einer einzelnen monovalenten Bindungsregion, äquivalent zu den Bindungsregionen in den rekombinanten Immuntoxinkonstrukten, zu charakterisieren, wurden F(ab) Fragmente der Antikörper durch die Spaltung mittels der Protease Papain hergestellt. Diese wurden mit der Biacore Technik analysiert und die Dissoziationskonstanten bestimmt. In **Abbildung 19** sind die Sensogramme der vier F(ab) Fragmente zu sehen. Für die beiden $\Delta 9$ E-Cadherin spezifischen Fragmente zeigen sich im Vergleich mit den Aus-

gangsantikörpern ähnliche Kurvenverläufe. Dennoch zeigt die Bestimmung der Dissoziationskonstanten eine Verringerung des K_D für beide F(ab) Fragmente um jeweils eine Zehnerpotenz. Für das F(ab) Fragment des mAk 7H1 zeigt sich ein deutlicher Unterschied zu dem Ausgangsantikörper. Die Assoziationskurve erreicht keine Plateauphase und die Dissoziationskurve fällt im Vergleich zum bivalenten monoklonalen Antikörper wesentlich stärker ab. Die Dissoziationskonstante K_D fällt von $3,5 \cdot 10^{-11}$ für den ganzen Antikörper auf $1 \cdot 10^{-7}$ für das F(ab) Fragment ab. Eine nur sehr schwache Bindung zeigt das F(ab) Fragment des mAk 6D8. Das Bindungsverhalten ist so schwach, dass keine Angleichung an eine Kinetik möglich war.

Schlussfolgerung

Die Spezifität der Antikörperklone 7E6 und 6H8 zu $\Delta 9$ E-Cadherin und der Klone 7H1 und 6D8 zu $\Delta 8$ E-Cadherin konnte mit zwei sehr sensitiven Methoden (Biacore und FACS-Analyse) bestätigt werden. In Bezug auf ihre Spezifität sind alle vier Klone ausgezeichnete Kandidaten für den Einsatz als Immuntoxin. Die Bestimmung der Bindungskonstanten zeigte zwei herausragende Klone: die Antikörper 7E6 gegen $\Delta 9$ E-Cadherin und Antikörper 7H1 gegen $\Delta 8$ E-Cadherin.

4.2 MPE600 und HSC45-M2: Zelllinien, die endogen Exon 9 deletiertes E-Cadherin exprimieren

Als Testsystem für die mutationsspezifischen Immuntoxine standen Mausfibroblastenzellen (L929) und die humane Mammakarzinomzelllinie MDA-MB-435S, transfiziert mit wt E-Cadherin, $\Delta 8$ E-Cadherin und $\Delta 9$ E-Cadherin zur Verfügung. Um ein Zellkultur-Modellsystem zu etablieren, das näher an den *in vivo* Bedingungen liegt, wurde in der Literatur nach primären Karzinomzellen gesucht, die endogen $\Delta 8$ oder $\Delta 9$ E-Cadherin exprimieren. Es konnten zwei primäre Karzinom-Zelllinien charakterisiert werden, die beide aufgrund von Splice-site Mutationen einen Exon 9 Verlust im E-Cadherin aufweisen. Zum einen die Mammakarzinomzelllinie MPE600, zum anderen die humane Magenkarzinomzelllinie mit Siegelring-Morphologie HSC45-M2.

Für die humane Mammakarzinom Zelllinie MPE600 wurde eine 21 Basenpaar Deletion am Intron 8 / Exon 9 Übergang beschrieben (Hiraguri et al. 1998). Diese Mutation deletiert den Splice-Akzeptor für Exon 9 des E-Cadherins. Auf Proteinebene konnte jedoch kein

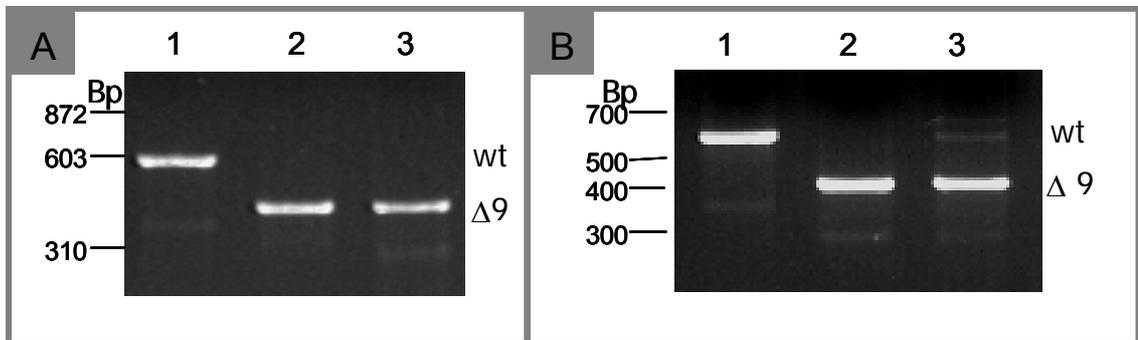


Abbildung 20: Amplifikation von cDNA von MPE600 Zellen (A) und HSC45 Zellen (B) mit den E-Cadherin spezifischen Primern Ex 7/1 und r Ex 10/2a.

(A) Das Amplifikat aus mit wt E-Cadherin transfizierten L929 Zellen (Spur 1) läuft auf der zu erwartenden Höhe von 659 bp. E-Cadherin aus MPE600 Zellen (Spur 2) ist verkürzt und läuft auf der Höhe mit Δ9 E-Cadherin transfizierten L929 Zellen (Spur 3)

(B): Spur 1: L929 wt, Spur 2: L929 Δ9, Spur 3: HSC45

E-Cadherin nachgewiesen werden. Immunfluoreszenz mit dem E-Cadherin spezifischen Antikörper E9 zeigte kein Signal. Die Autoren zogen daraus den Schluss, dass durch eine Verschiebung des Leserasters beim Spleißen kein funktionales E-Cadherin exprimiert wird (Hiraguri et al. 1998). Die Zelllinie wurde uns freundlicherweise von Dr. Helene Smith und Dr. Joe Gray, San Francisco zur weiteren Analyse zur Verfügung gestellt. **Abbildung 20 A** zeigt die Amplifikation von E-Cadherin aus cDNA zwischen Exon 7 und Exon 10. Das Amplifikat aus MPE600 Zellen (476 bp) läuft auf der Höhe der mitgeführten Δ9 E-Cadherin Kontrolle. Das PCR Ergebnis legte nahe, dass durch den Verlust des Splice Akzeptors für Exon 9 es zu einem Verlust von Exon 9 auf RNA Ebene gekommen ist.

Die humane Magenkarzinomzelllinie mit Siegelring-Morphologie HSC45-M2 (im weiteren HSC45 bezeichnet) wurde aus Aszites und Pleuraerguß eines Patienten isoliert (Yanagihara et al. 1993). Die Sequenzierung des E-Cadherin Gens zeigte eine 10 Basenpaar Deletion am Exon 9 / Intron 9 Übergang mit Verlust der Splice Donor Sequenz (GT) für Exon 9. Die Sequenzierung der E-Cadherin cDNA zeigte zwei verschiedene Transkripte, eines mit vollständig deletiertem Exon 9 und ein Transkript mit einer 57 Basenpaar Insertion, hervorgerufen durch eine kryptische 5' Splice Sequenz (GT) in Intron 9. Northern

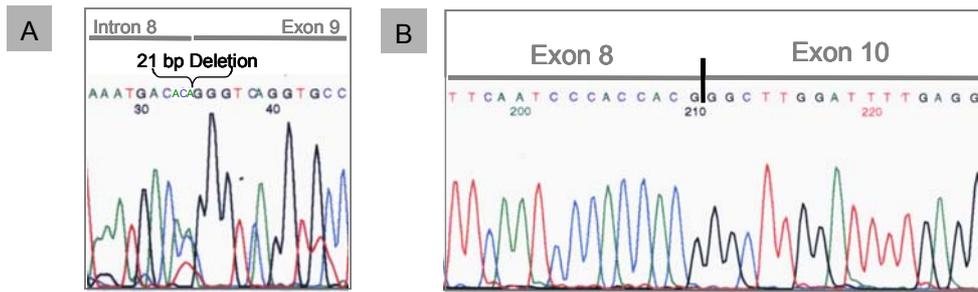


Abbildung 21: Sequenzierung des Intron 8 / Exon 9 Überganges von MPE600 DNA (A) und MPE600 cDNA (B) ausgehend vom Ende des Exons 8.

(A) Die DNA-Sequenzierung bestätigt die veröffentlichte 21 bp Deletion am Übergang von Intron 8 zu Exon 9.

(B) Die Sequenzierung des PCR-Amplifikates aus cDNA von Exon 7 bis Exon 10 zeigt einen direkten Übergang von Exon 8 zu Exon 10. Die Deletion von Exon 9 führt nicht zu einer Leserasterverschiebung.

Blot Analyse mit einer Sonde gegen Exon 9 zeigte, dass die Exon 9 deletierte RNA das Haupttranskript darstellt (Fukudome et al. 2000). **Abbildung 20 B** zeigt das PCR-Amplifikat aus HSC45 cDNA von Exon 7 (Primer Ex 7/1) bis Exon 10 (Primer rEx 10/2a) in Spur 1. Das Hauptprodukt läuft auf der Höhe von $\Delta 9$ E-Cadherin (Spur 2). Die zweite, wesentlich schwächere Bande, läuft etwas höher als das wt E-Cadherin in Spur 3. Die Ergebnisse von Fukudome et al. konnten somit von uns bestätigt werden.

Die Sequenzierung eines Amplifikates aus genomischer DNA der MPE600 Zellen vom Ende des Introns 8 bis zum Anfang des Introns 9 konnte die 21 Basenpaar Deletion der MPE600 Zellen bestätigen (**Abbildung 21 A**). Die Sequenzierung des cDNA PCR Amplifikates aus **Abbildung 20 A** zeigte den Verlust des Exons 9. Die Sequenz wies einen Übergang von Exon 8 zu Exon 10 ohne eine Leserasterverschiebung auf (**Abbildung 21 B**).

Um die Expression von E-Cadherin in den zwei Testzellen zu untersuchen und zweifelsfrei die $\Delta 9$ E-Cadherin Mutation auch auf Proteinebene festzustellen, wurden Western-Blot Analysen aus Proteinlysaten der Zellen, Immunfluoreszenz (MPE600 Zellen) und FACS-Analysen (HSC45 Zellen) durchgeführt. Der Western Blot mit dem $\Delta 9$ E-Cadherin spezifischen Antikörper 6H8 zeigt bei beiden Zelllinien (Spur 1: MPE600, Spur 4: HSC45) ein Signal auf der Höhe der mitgeführten Positivkontrolle (Spur 2: Proteinlysat aus mit $\Delta 9$ E-Cadherin transfizierten L929 Zellen). Die Tatsache, dass das Proteinlysate aus mit wild-typ transfizierten L929 Zellen (Spur 3) kein Signal zeigt, bestätigt die Mutationspezifität des Antikörpers 6H8 (**Abbildung 22**).

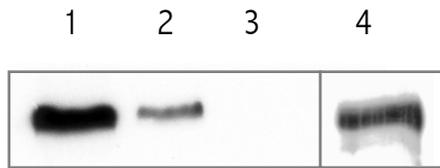


Abbildung 22: Western-Blot Analyse mit Proteinlysaten aus HSC45 und MPE600 Zellen mit dem $\Delta 9$ E-Cadherin spezifischen Antikörper 6H8. Spur 1: MPE600 Zellen, Spur 2: $\Delta 9$ E-Cadherin transfizierte L929 Zellen, Spur 3: wild-typ E-Cadherin transfizierte L929 Zellen, Spur 4: HSC45 Zellen. Aufgetragen wurden 7 μg Gesamtprotein.

Immunfluoreszenzen der MPE600 Zellen mit dem E-Cadherin spezifischen Antikörper HECD-1 und den $\Delta 9$ E-Cadherin spezifischen Antikörper 7E6 zeigten eine deutliche, randständige Markierung (**Abbildung 23 A**) und bestätigen somit die Expression von $\Delta 9$ E-Cadherin. Die positive E-Cadherin Expression steht im Gegensatz zu den negativen Immunfluoreszenzen der Zellen mit dem monoklonalen Antikörper E9 von Hiraguri et al. Der Antikörper E9, der freundlicher Weise von Dr. Margaret Wheelock, USA zur Verfügung gestellt wurde, erkennt wt E-Cadherin in Western Blot Analysen und Immunfluoreszenz (Da-

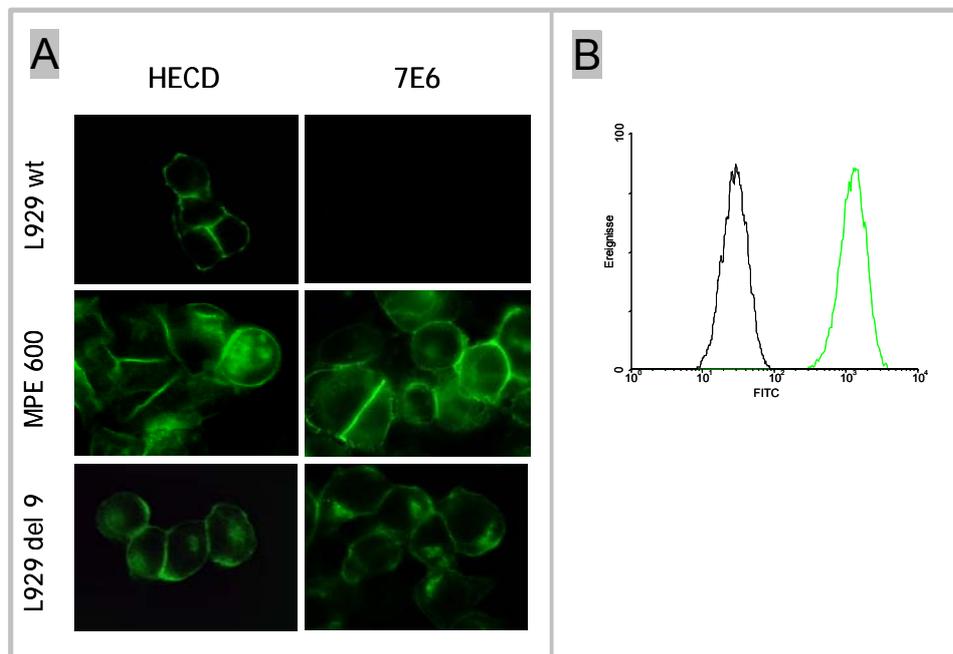


Abbildung 23: Immunfluoreszenz von MPE600 Zellen mit Antikörper HECD-1 und $\Delta 9$ E-Cadherin spezifischen Antikörper 7E6 (A). FACS Analyse von HSC45 Zellen mit $\Delta 9$ spezifischen Antikörper 6H8 (B).

(A) E-Cadherin Antikörper HECD-1 zeigt in allen Zelllinien (L929 wt E-Cadherin, MPE600 und L929 $\Delta 9$ E-Cadherin) randständige E-Cadherin Markierung. Der mutationspezifische Antikörper 7E6 markiert E-Cadherin auf MPE600 Zellen und L929 $\Delta 9$ E-Cadherin Zellen. Negativkontrolle: Antikörper 7E6 auf wt E-Cadherin exprimierenden L929 Zellen
(B) FACS-Analyse von HSC45 Zellen. Negativkontrolle: ohne 1. Antikörper (schwarz). Deutliche Fluoreszenzverschiebung mit $\Delta 9$ E-Cadherin spezifischen Antikörper 6H8 (grün)

ten nicht gezeigt). Diese Ergebnisse legen den Schluss nahe, dass der monoklonale Antikörper E9 eine Sequenz in Exon 9 des E-Cadherins erkennt, und somit mit $\Delta 9$ E-Cadherin Mutanten falsch negative Ergebnisse liefert. Diese Schlussfolgerung ist analog zu den Ergebnissen mit dem Antikörper HECD-1, von dem gezeigt wurde, dass er in Exon 8 des E-Cadherins bindet und daher mit $\Delta 8$ E-Cadherin Mutanten falsch negative Ergebnisse liefert (Becker et al. 2002). Die FACS-Analyse von unfixierten HSC45 Zellen mit dem $\Delta 9$ E-Cadherin spezifischen Antikörper 6H8 (**Abbildung 23 B**) weist eine eindeutige Verschiebung des Fluoreszenzmaximums (grüne Linie) zu der Kontrolle ohne ersten Antikörper auf (schwarze Linie). Die HSC45 Zellen exprimieren $\Delta 9$ E-Cadherin auf der Oberfläche der Zellen.

Schlussfolgerung

Die endogenen $\Delta 9$ E-Cadherin exprimierenden Zellen MPE600 und HSC45 konnten somit als Zellkultursystem für die Wirkungscharakterisierung $\Delta 9$ E-Cadherin spezifischer Immuntoxine eingesetzt werden.

4.2.1 Quantitative indirekte Immunfluoreszenz

Um die Expression des E-Cadherins auf der Oberfläche der verschiedenen Zellmodellsysteme (L929, MDA-MB-435S und endogene Mutationsträger) vergleichen zu können, wurde eine quantitative indirekte Immunfluoreszenz (QIIF) durchgeführt. **Abbildung 24** zeigt die absolute Anzahl der E-Cadherin Moleküle, die auf der Oberfläche einer Zelle nachgewiesen werden konnten. Die verschiedenen L929 Transfektanten wiesen im Vergleich zu den MDA-MB-435 Transfektanten eine etwa um den Faktor zwei erniedrigte Anzahl von E-Cadherin Molekülen auf der Oberfläche auf. Das niedrigste Expressionsniveau zeigten bei den L929 und MDA-MB-435 Zellen jeweils die $\Delta 8$ E-Cadherin Transfektanten (L929 : $3,57 \cdot 10^4$, MDA-MB-435: $8,93 \cdot 10^4$). Die wt E-Cadherin transfizierten Kontrolltransfektanten zeigten bei beiden Zelllinien jeweils die höchste Anzahl an E-Cadherin Molekülen an der Zelloberfläche (L929 wt: $1,00 \cdot 10^5$, MDA-MB-435 wt: $2,38 \cdot 10^5$) im Vergleich zu den Mutationstransfektanten. Die höchste Anzahl an E-Cadherin Molekülen auf der Oberfläche

wiesen die endogen $\Delta 9$ E-Cadherin exprimierenden Zellen MPE600 ($2,91 \cdot 10^5$ Moleküle pro Zelle) und HSC45 ($2,68 \cdot 10^5$ Moleküle pro Zelle) auf.

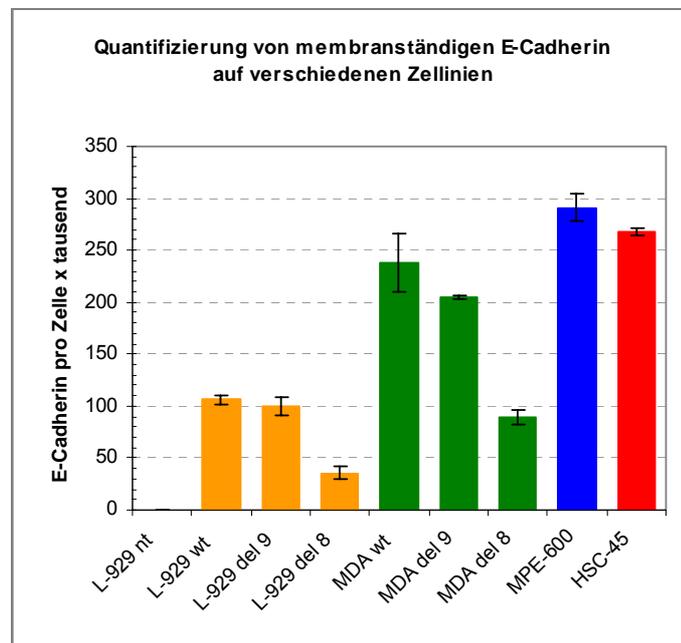


Abbildung 24: Quantitative indirekte Immunfluoreszenz. Die absolute Anzahl der E-Cadherine auf der Oberfläche der Zellen wurde durch gleichzeitige Messung der mittleren Fluoreszenzintensität (mean fluorescence intensity, MFI) von Eichbeads (Dako QIFKIT) erreicht. Die daraus ermittelte Eichgerade diente als Grundlage zur Berechnung der Oberflächenantigene der einzelnen Ansätze. Die Ergebnisse mitteln sich aus zwei unabhängigen Messungen, die jeweils im Doppelansatz durchgeführt wurden.

4.3 Charakterisierung chemisch konjugierter Immuntoxine gegen mutiertes E-Cadherin

4.3.1 Pseudomonas Exotoxin A gekoppelt an Anti- $\Delta 9$ E-Cadherin Antikörper 6H8 (6H8PE38QQR)

Die Vorarbeiten zeigten die ausgezeichnete Spezifität der vier monoklonalen Antikörper gegen ihre jeweilige E-Cadherin Mutante. Elektronenmikroskopische Aufnahmen mit Goldmarkierten Sekundärantikörpern zeigten die spezifische Internalisierung des Antikörpers 6H8 in $\Delta 9$ E-Cadherin exprimierenden MDA-MB-435S Zellen (Daten nicht gezeigt). Der $\Delta 9$ E-Cadherin spezifische Antikörperklon 6H8 wurde daher von Ph. D. Qing-cheng Wang, National Institutes of Health, Bethesda, USA, über eine kovalente durch Iminothiolan / succinimidyl 4-(N-maleimido-methyl) cyclohexan-1-carboxylate (SMCC) vermittelte Bindung

mit einer modifizierten Form des Pseudomonas Exotoxins A (PE38QQR) gekoppelt. Dadurch entstand das Immuntoxin 6H8PE38QQR. In diesem, speziell für die chemische Kopplung konstruierten Toxin, sind die zwei Lysine an Aminosäureposition 590 und 606 durch Glutamin (Q) und ein Lysin (K) an Position 613 durch Arginin (R) ausgetauscht. Zusätzlich wurde die Peptidsequenz ANLAEEAFK ("Lysin" Peptid) N-terminal angehängt. Die Kopplung des PE38QQR konnte somit nur über das N-terminale Methionin oder das Lysin im Lysin-Peptid erfolgen (Debinski und Pastan 1994). Der Versuch den Antikörper 7E6 an das PE38QQR zu koppeln scheiterte, vermutlich durch verdeckte Lysinreste in der Sekundärstruktur. Die Auftrennung des Kopplungsprodukt 6H8PE38QQR auf einem SDS-PAGE Gel zeigte eine äquimolare und vollständige Kopplung des Antikörpers mit dem Toxin (nicht gezeigt). FACS Analysen mit dem Immuntoxin 6H8PEQQR zeigten keine Änderungen im spezifischen Bindungsverhalten im Vergleich zu dem ungekoppelten Antikörper 6H8 (siehe **Abbildung 25**).

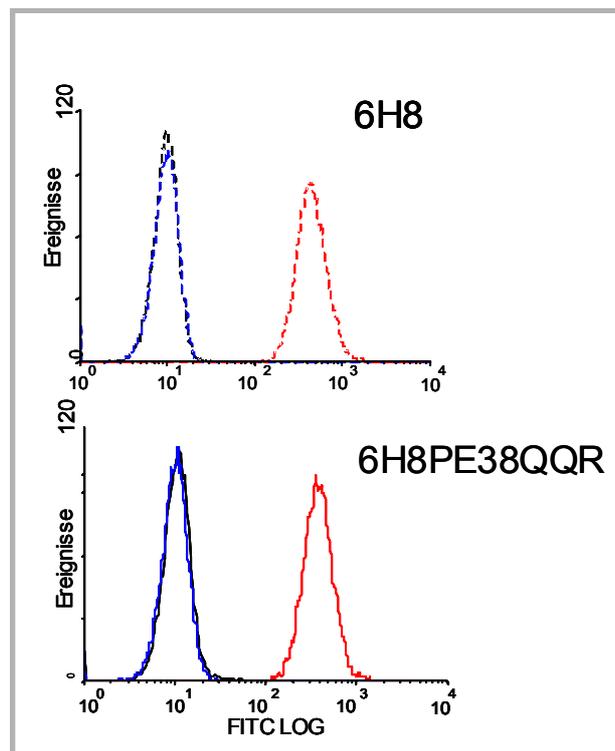


Abbildung 25: FACS Analyse von nicht transfizierten (schwarze Linie), wt E-Cadherin transfizierten (blaue Linie) und $\Delta 9$ E-Cadherin transfizierten MDA-MB-435 Zellen (rote Linie) mit Antikörper 6H8 (oben, gestrichelte Linien) und Immuntoxin 6H8PE38QQR (unten durchgezogene Linien). Als Sekundärantikörper wurde in beiden Ansätzen ein FITC-markierter Ziege anti Ratte Antikörper eingesetzt. Es sind keine Verschiebungen der mittleren Fluoreszenzaktivitäten zwischen den ungekoppelten und toxingekoppelten Antikörper festzustellen. Unspezifische Bindung an nichttransfizierte oder wt E-Cadherin transfizierte Zellen induziert durch das Toxin sind somit unwahrscheinlich.

Um die spezifische Zytotoxizität des Immuntoxins 6H8PE38QQR zu bestimmen, wurden zwei verschiedene Zytotoxizitätstests durchgeführt. Das 6H8PE38QQR Immuntoxin zeigte in XTT-Assays einen spezifischen zytotoxischen Effekt auf Zellen, die $\Delta 9$ E-Cadherin auf der Oberfläche exprimieren (siehe **Abbildung 26 A**). Eine signifikante Verringerung der Zellzahl in mit $\Delta 9$ E-Cadherin transfizierten L929 Zellen und endogen $\Delta 9$ E-Cadherin exprimierenden MPE600 Zellen ist in den Ansätzen ab 100 ng/ml 6H8PE38QQR zu erkennen. Die durch die XTT-Assays ermittelte LD_{50} für $\Delta 9$ E-Cadherin exprimierende L929 Zellen liegt über 220 ng/ml 6H8PE38QQR Immuntoxin. Für die MPE600 Zellen liegt die LD_{50} über 2200 ng/ml. Wt E-Cadherin exprimierende L929 Zellen werden über die gesamte Konzentrationsreihe des Immuntoxins im Wachstum nicht gehemmt. Auch in der maximal eingesetzten Konzentration von 2200 ng/ml ist kein zytotoxischer Effekt zu beobachten. Dies gilt ebenso für die Mammakarzinom Zelllinie MCF-7. Von MCF-7 Zellen ist gezeigt worden, dass sie E-Cadherin exprimieren (Hiraguri et al. 1998).

Die spezifische zytotoxische Wirkung des 6H8PE38QQR auf mit $\Delta 9$ E-Cadherin transfizierte L929 Zellen konnte durch Koloniebildungs-Experimente bestätigt werden (siehe **Abbildung 26 B**). Jedoch zeigte sich im Vergleich zu den Ergebnissen aus den XTT-Assays eine

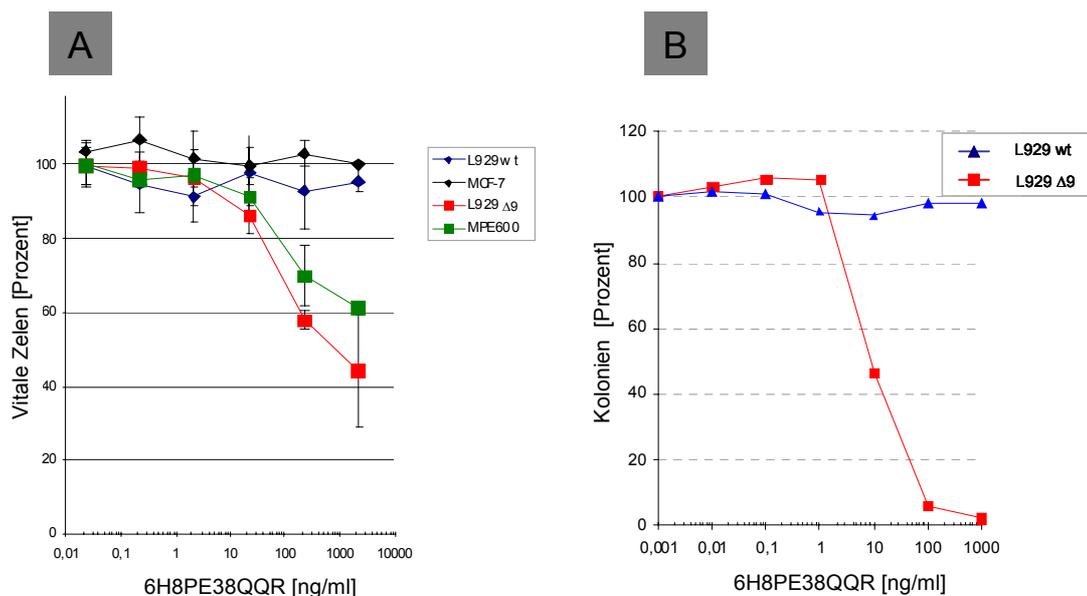


Abbildung 26: Zytotoxizität des 6H8PE38QQR Immuntoxins bestimmt mittels XTT-Assay (A) und Koloniebildungs-Assay (B).

dramatische Steigerung der Zytotoxizität. In beiden Assays konnte eine signifikante Wirkung des 6H8PE38QQR ab 22 ng/ml (XTT-Assay) bzw 10 ng/ml (Koloniebildungsassay) gezeigt werden. Im zweiten Fall wurde bei dieser Konzentration die LD₅₀ schon überschritten, während im ersten Fall noch über 80 Prozent der $\Delta 9$ E-Cadherin exprimierenden Zellen als vital angesehen werden musste. Im Koloniebildungs-Assay konnte bei 1000 ng/ml 6H8-PE38QQR eine nahezu hundertprozentige Elimination der $\Delta 9$ E-Cadherin Transfektanten festgestellt werden, während im XTT Assay auch bei 2200 ng/ml noch über 40 Prozent der Zellen vital waren. In beiden Assays ist auch in den hohen Toxinkonzentrationen die wild-typ E-Cadherin exprimierende L929 Kontrollzelllinie nicht durch das Toxin betroffen.

Die zytotoxische Wirkung des 6H8PE38QQR Immuntoxins konnte durch Zugabe an nicht mit Pseudomonas Exotoxin A gekoppelten Antikörper 6H8 inhibiert werden. **Abbildung 27** zeigt die Ergebnisse der Inhibierung, ermittelt mit Hilfe eines XTT Assays. Der ungekoppelte Antikörper 6H8 wurde im 100-fachen Überschuss direkt zu der Immuntoxinverdünnung (6H8PE38QQR: 220 ng/ml, 6H8 ohne Toxin: 22 μ g/ml) zugegeben. Es zeigte sich, dass

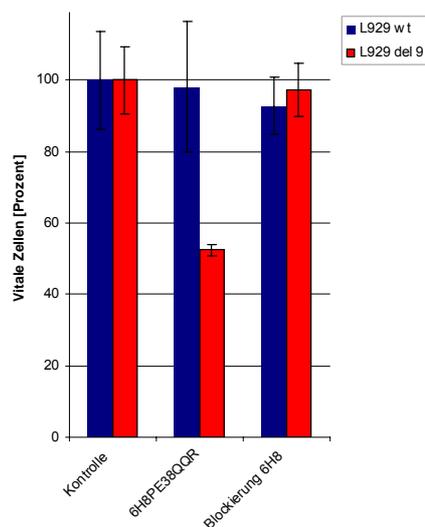


Abbildung 27: Blockierung des zytotoxischen Effekts des 6H8-PE38QQR Immuntoxin durch 100fachen Überschuss an ungekoppelten Antikörper 6H8 bestimmt mittels XTT-Assay. Wt E-Cadherin exprimierende L929 Zellen (blaue Balken), $\Delta 9$ E-Cadherin exprimierende Zellen (rote Balken). Kontrolle: Zellen ohne Immuntoxin, Konzentration 6H8-PE38QQR: 220 ng/ml, Konzentration an ungekoppelten Antikörper 6H8: 22 μ g/ml.

die Toxinwirkung in den $\Delta 9$ E-Cadherin transfizierten L929 nahezu 100-prozentig blockiert werden konnte. Während im Toxinansatz 54 Prozent der Zellen im Vergleich zur Kontrolle ohne Toxin vital waren, zeigten die Ansätze mit Immuntoxin und Antikörper 97 Prozent vitale Zellen im Vergleich zur Kontrolle.

Da wie in 4.2.1. beschrieben es nahezu keinen Unterschied in der Anzahl von wt und $\Delta 9$ E-Cadherin auf den jeweiligen Zellen gibt, konnte eine mögliche artifizielle mutationsspezifische Zytotoxizität der zu testenden Immuntoxine, abgeleitet durch geringere Expression von wt E-Cadherin auf den Kontrollzellen, ausgeschlossen werden.

4.4 HuCAL Screening: Generierung humaner mutationsspezifischer Antikörper

Um deletionsspezifische E-Cadherin Binder mit Framework und CDR-Sequenzen humanen Ursprungs zu generieren, wurde in Kooperation mit der Firma Morphosys (Martinsried) ein Screening ihrer humanen kombinierten Antikörper Bibliotheken (Human Combinatorial An-

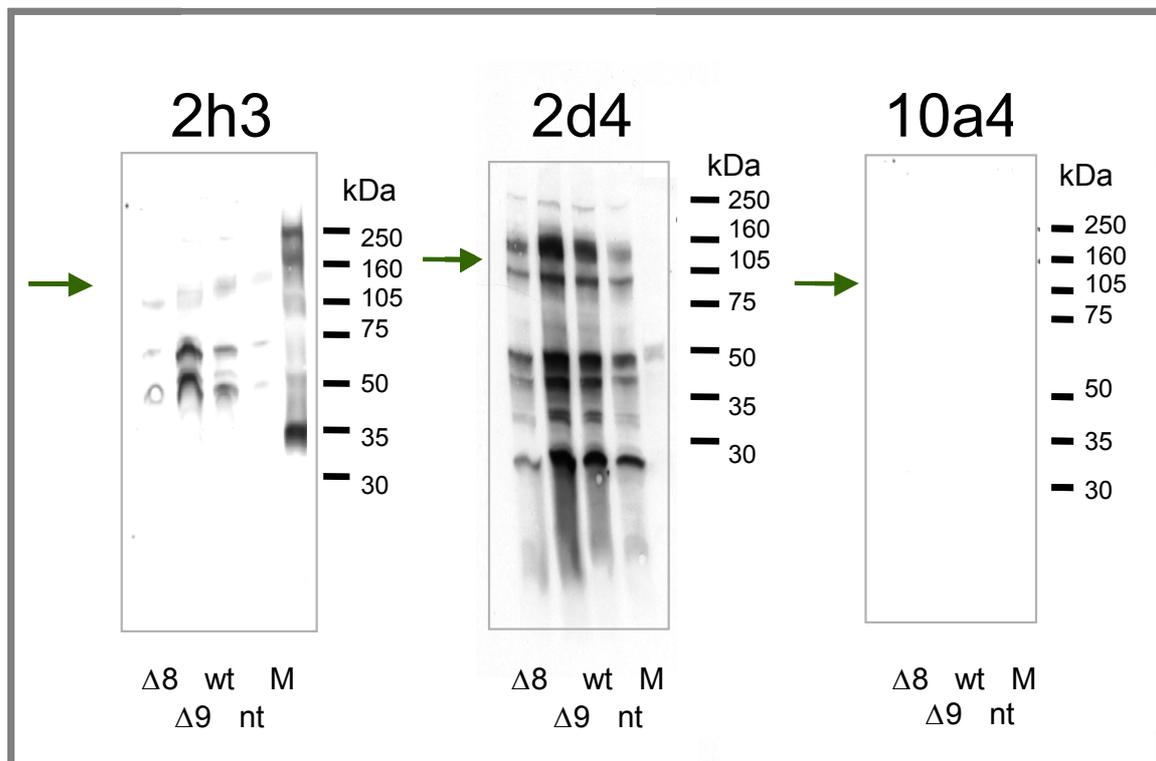


Abbildung 28: Western Blot Analyse der HuCAL Binder: Untersucht wurde die Bindung an E-Cadherin aus Proteinlysate $\Delta 8$ und $\Delta 9$ E-Cadherin transfizierter MDA-MB-435 Zellen. Klon 2h3 und 2d4: potentielle $\Delta 8$ E-Cadherin spezifische Klone, Klon 10a4: potentiell $\Delta 9$ E-Cadherin spezifischer Klon. Als Kontrolle wurden Proteinlysate wild-typ E-Cadherin transfizierter (wt) und nicht transfizierter (nt) MDA Zellen mitgeführt. M: Proteingrößenstandard. Der grüne Pfeil markiert die Höhe des E-Cadherins.

tibody Libraries, HuCAL-Screening) durchgeführt (siehe Abschnitt 3.2.24.).

Mittels ELISA-Screening mit rekombinanten E-Cadherin Mutationskonstrukten konnten drei Kandidaten (2h3 und 2d4 gegen $\Delta 8$ E-Cadherin und 10a4 gegen $\Delta 9$ E-Cadherin) von der Firma Morphosys identifiziert werden, die ich in dieser Arbeit weiter charakterisiert habe. Die $\Delta 8$ spezifischen Klone 2h3 und 2d4 zeigten in ELISAs gegen E-Cadherin mutations-spezifischen Peptide und rekombinanten E-Cadherin Teilkonstrukten spezifische Bindung. Der $\Delta 9$ spezifische Klon 10a4 zeigte nur gegen das $\Delta 9$ E-Cadherin Peptid im ELISA und nicht gegen das rekombinante E-Cadherin Teilkonstrukt signifikante Bindung (nicht dargestellt).

Getestet wurden die Klone im F(ab) Format (Krebs et al. 2001). **Abbildung 28** zeigt die Ergebnisse der Western Blots der drei Binder gegen Proteinlysate E-Cadherin transfizierter Zellen. Die $\Delta 8$ E-Cadherin spezifischen Klone zeigen multiple Banden bei allen getesteten Proteinlysaten. Auf der Höhe des E-Cadherins kann für den Klon 2h3 und den Klon 2d4 keine $\Delta 8$ E-Cadherin spezifische Bande gezeigt werden. Der $\Delta 9$ E-Cadherin spezifische Klon 10a4 zeigt keine Anfärbung im Western Blot. Als Negativkontrolle wurde zusätzlich ein Western Blot ohne ersten Antikörper (F(ab) Fragment) erstellt. Dieser wies keine Banden auf (nicht gezeigt). Die Banden bei den Western Blots der Klone 2h3 und 2d4 werden daher nicht durch Bindung der Sekundärantikörper, sondern durch unspezifische Bindung

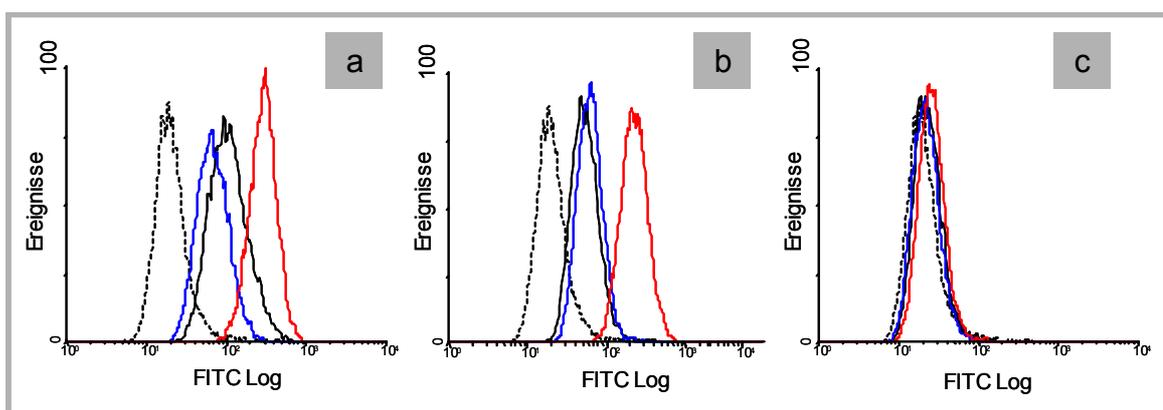


Abbildung 29: FACS Analyse der HuCAL Binder 2h3 (A), 2d4 (B) und 10a4 (C) im Fab Format an nichttransfizierte (schwarze Linie), wt E-Cadherin transfizierte (blau Linie) und die jeweils spezifische MDA-MB-435 Transfektante (A und B: $\Delta 8$ E-Cadherin, C: $\Delta 9$ E-Cadherin transfizierte Zellen, rote Linie). Gestrichelte schwarze Linie: nicht transfizierte MDA-MB-435 Zellen ohne 1. Antikörper (HuCAL F(ab) Fragment).

der HuCAL Klone hervorgerufen. Als Positivkontrolle diente ein Blot mit dem α E-Cadherin Antikörper AEC. Dieser zeigte spezifische Banden auf der zu erwartenden Höhe (Daten nicht gezeigt).

Um die Spezifität der HuCAL gegenüber nativem E-Cadherin auf der Oberfläche nicht fixierter Zellen zu analysieren, wurde ebenfalls eine FACS Analyse etabliert. In **Abbildung 29** sind die Histogramme für alle Binder zu sehen. Die beiden $\Delta 8$ E-Cadherin spezifischen Klone 2h3 und 2d4 zeigen beide eine schwache aber eindeutige Verschiebung der mittleren Fluoreszenzintensität auf Zellen mit $\Delta 8$ E-Cadherin gegenüber mit wt E-Cadherin transfizierten Zellen. Beide Klone zeigen jedoch eine Verschiebung auch bei nicht transfizierten Zellen im Vergleich zu Ansätzen, bei dem das HuCAL Fragment nicht zugegeben wurde. Dies ist ein deutlicher Hinweis auf eine unspezifische Bindung beider Klone gegen ein Antigen, exprimiert auf den MDA-MB435S Zellen. Analog zu dem Western Blot Ergebnis zeigt der Klon 10a4 auch im FACS weder spezifische noch unspezifische Bindung.

Das Bindungsverhalten der drei Klone konnte mittels Biacore Analysen bestätigt werden. Die beiden $\Delta 8$ E-Cadherin spezifischen Klone zeigen auch in diesem System eine sehr schwache aber im Bezug auf die E-Cadherin Mutation spezifische Bindung. Keine Assoziation kann für den Klon 10a4 an $\Delta 9$ E-Cadherin festgestellt werden (Daten nicht gezeigt). Die Bindungskinetiken aller drei Klone waren so schwach, dass die Assoziations- und Dissoziationskonstanten nicht bestimmt werden konnten.

4.5 Charakterisierung rekombinant hergestellter dsFv Konstrukte

4.5.1 Klonierung, Expression und Aufreinigung

Um die in Abschnitt 4.1 charakterisierten monoklonalen Rattenantikörper 7E6, 6H8, 7H1 und 6D8 im dsFv Format zu erhalten, wurden die vier variablen Regionen der leichten Ketten sowie der schweren Ketten aus den entsprechenden Hybridomzell-RNAs amplifiziert. Hierfür wurde Gesamt-RNA mit Trizol-Reagenz aus Zellpellets extrahiert und in einer Reversen Transkription mit oligo dT-Primern in cDNA umgeschrieben. Für die Amplifikation

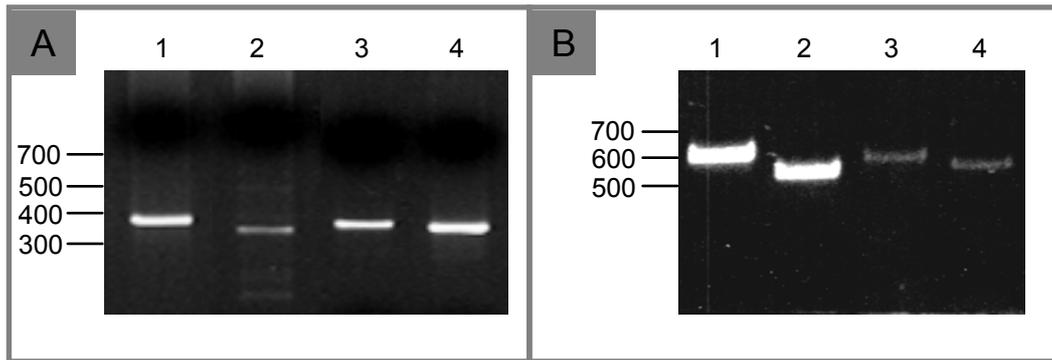


Abbildung 30: Amplifikation der variablen Regionen der leichten und schweren Ketten der Klone 6H8, 6D8, 7H1 und 7E6 aus cDNA der jeweiligen Hybridomzelllinie.

(A) Spur 1: 6H8 schwere Kette, Spur 2: 6H8 leichte Kette, Spur 3: 6D8 schwere Kette, Spur 4: 6D8 leichte Kette

(B) Spur 1: 7H1 schwere Kette, Spur 2: 7H1 leichte Kette, Spur 3: 7E6 schwere Kette, Spur 4: 7E6 leichte Kette

der variablen Regionen wurden zwei unterschiedliche Taktiken angewandt. **Abb. 30 A** zeigt die PCR Produkte der leichten und schweren Ketten der Klone 6H8 und 6D8, die mit Primern gegen Maus-Sequenzen am Anfang von Framework 1 (5' Primer) und dem Anfang der konstanten Region amplifiziert wurden (siehe Abschnitt 3.2.22.2.). Die PCR-Produkte der beiden schweren Ketten zeigten eine Größe von etwa 350 bp, die PCR-Produkte der beiden leichten Ketten liefen etwas kürzer und lagen bei etwa 330 bp. Die Fragmentgröße entsprach der RNA Sequenzlänge variabler Regionen von Antikörpern aus Maus und Ratte. **Abb. 30 B** zeigt die RACE PCR Amplifikate der leichten und schweren Ketten der Antikörper-Klone 7E6 und 7H1. Die PCR-Produkte der schweren Ketten sind etwa 600 Basenpaare lang, die leichten Ketten laufen auf etwa 550 bp. Die längeren Fragmente, die durch die RACE-PCR amplifiziert werden, beinhalten zusätzlich zur kodierenden Sequenz der variablen Regionen eine Signalpeptidsequenz und die gesamte 5' untranslatierte Sequenz.

Alle acht aufgereinigten PCR Produkte konnten in TA- oder TOPO TA-Vektoren ligiert werden. Die Sequenzen von mindestens fünf Klonen von jedem PCR Produkt wurden durch Sequenzierung mit dem Primer M13fw bestimmt und analysiert. Die Sequenzvergleiche der jeweiligen Klone einer Kette eines Antikörpers zeigten nahezu hundertprozentige Übereinstimmung. Somit konnten keine Kontaminationen mit überlagernden Sequenzen festgestellt werden. Die Datenbankrecherche der sequenzierten PCR-Produkte ergab für alle acht Ketten signifikante Homologien mit Immunglobulin cDNA Sequenzen von variablen Regionen von Maus oder Ratte (Programm BLAST, Basic local alignment search tool;

A

Leichte Ketten	FR1			CDR1	FR2	CDR2
	1	2		3	4	5
	12345678901234567890123	45678901234567890123	456789012345678901234567890123456789	0123456		
Anti Δ 8 Klone	6D8	QFRPDDPV-SMSVSLGGQVSISC DVVMTQTPVSMS	RSSQNLVHN-NGNTYLSWYIQKPSQPQLLIY	KVSNRFS		
	7H1	NSVMTQSPTSVMFISVGDRVTMNC	KASQN-----VGTNVDWCQKQKQSPKLLIY	GPSNRNT		
Anti Δ 9 Klone	6H8	DIMMTQSPLSVSVTPGESASISC DIVLSQAP	RSSKSLST-KGITSLYWYLQRPKSPQLLIY	QLSNLAS		
	7E6	DIVLTQAPLSVAVTPGESASISC	RSSKSLSS-KGSTSLYWYIQKPKSPQLLIY	RMSNLAS		

Leichte Ketten Fortsetzung	FR3			CDR3	FR4
	6	7	8	9	1
	78901234567890123456789012345678	90123456789012345678	901234567890123456789		
Anti Δ 8 Klone	6D8	GISDRFSGSGSGTDFTLKISRVEPDDLGVYYC	GQGSQYP-----ST	FG	GTKLEIKRA
	7H1	GVPDRFTGSGSGTDLTLTISNMQAEDLAVYHC	LQYKYNP-----WT	FG	DTKLELKRAD
Anti Δ 9 Klone	6H8	GVPDRFSSSGSEADFTLKISKVETADVGVYYC	GHRLENP-----PT	FG	GTKLELKRAD
	7E6	GVPDRFSVSGSETDFTLKISKVETEDVGVHYC	AQFLEHP-----PT	FG	GTKVELKRAD

Schwere Ketten	FR1			CDR1	FR2	CDR2
	1	2	3	4	5	6
	123456789012345678901234567890	123456789012345678901234567890	12345678901234567890123456789012345678901234567890	12345AB	67890123456789	012ABC3456789012345
Anti Δ 8 Klone	6D8	-VKLQESGGGLVQPGRSLKLSCLASGFTFS EEQLVESGGG	HYGMN	WLRQAPGKLEWVA	SIS--SGGSYNYADTVKG	
	7H1	EVQLVESGGGLVQTGRSLTLSCVASGFTFS	NYGMN	WIRLVPKLEWVA	SIS--TGGGYTYADTVKG	
Anti Δ 9 Klone	6H8	-VKLQESGAELAKPGSSVRISCKASGYTFP QVQLQQSGE	NYVAHSS	WIKQTTGQLEWIG	YIA--PGSGTALYNEKFKG	
	7E6	EVQLVESGXGLVQPGNSLKLSCAASGFSFS	AYAMA	WVRQSPKLEWVA	TIS--FDGYSTYYRDSVKG	

Schwere Ketten Fortsetzung	FR3			CDR3	FR4
	7	8	9	10	11
	67890123456789012345678901234	56789012345678901234	5678901234567890123456789012345678901234		
Anti Δ 8 Klone	6D8	RFTISRDNKNTLFLQMTSLRAEDTALYYCAR	QDFYYDGSY-----PH	WGQGTTVTVSS	
	7H1	RFTISRDNKNTLFLQMTSLRSGDTALYYCAR	QDFYYDGSY-----PY	WGLGVMVAVSS	
Anti Δ 9 Klone	6H8	KATLTVDRSSNTAYMQLNSLTPVDTAVYYCAR	FDGYF-----DY	WGQGTTVTVSS	
	7E6	RFTISRDNKNTLFLQMTSLRSEDTAIYYCTT	F-----DY	WGQGMVTVSS	

Tabelle 5: Aminosäuresequenz der leichten Ketten (A) und schweren Ketten (B) der variablen Regionen der Antikörper 6D8, 7H1, 6H8 und 7E6 auf Grundlage der DNA Sequenzen. FR1 bis 4: Framework Regionen 1 bis 4 (konservierte, strukturbildende Regionen). CDR 1 bis 3 (grau unterlegt): Complementary Determining Regions (involviert in Antigenbindung). Grün unterlegt: Aminosäureposition, die zur Ausbildung der Disulfidbrücke in den dsFv Konstrukten in Cystein mutiert wurden. Blau: Nachträglich durch RACE-PCR korrigierte Anfangssequenz der Framework 1 Regionen. Aminosäurenummerierung nach Kabat (Kabat et al. 1991).

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>, (Altschul et al. 1990)). Zur weiteren Verifizierung der

Sequenzen der schweren Ketten konnte ein Sequenzvergleich mit der veröffentlichten Nukleotidsequenz der nichtfunktionalen schweren Kette des Hybridompartners C63Ag8.653 durchgeführt werden (Kutemeier et al. 1992) (Sequenz: EMBL/Genbank, Accession Nummer X58634). Die Tatsache, dass keine Sequenzhomologien existent waren, wurde als weiteres Indiz gewertet, funktionale schwere Ketten amplifiziert zu haben. Für alle acht klonierten Ketten konnte ein durchgehendes Proteinleseraster bestimmt werden. Der Vergleich der Aminosäuresequenzen der CDR Regionen (CDR: Complementary Determining Regions) zwischen den Klonen gleicher Spezifität (7E6 und 6H8, sowie 7H1 und 6D8) zeigte sehr starke Homologien (siehe **Tabelle 5**). Dies trifft vor allem für die CDRs der leichten Ketten der $\Delta 9$ E-Cadherin spezifischen Klone 6H8 und 7E6 zu. Die CDR Sequenzen der leichten Ketten der $\Delta 8$ E-Cadherin spezifischen Klone 6D8 und 7H1 variieren hingegen recht stark. Für die CDR Regionen der schweren Ketten zeigt sich dagegen ein umgekehrtes Bild. Während die $\Delta 9$ E-Cadherin spezifischen monoklonalen Antikörper nur wenig Homologie zeigen, weisen die $\Delta 8$ E-Cadherin spezifischen mAk nahezu 100 Prozent Homologie im Bezug auf die Aminosäuresequenz der CDR Regionen auf. Dieser Befund legt nahe, dass die Unterschiede im Bindungsverhalten zwischen den zusammengehörenden Klonen für die $\Delta 8$ E-Cadherin Klone eher aufgrund unterschiedlicher leichter Ketten und für die $\Delta 9$ E-Cadherin Klone mehr durch Variation in den schweren Ketten vermittelt wird. Auffällig ist die um vier Aminosäuren deletierte CDR 3 Sequenz der schweren Kette des Klones 7E6. Ebenso auffallend waren die ersten neuen Aminosäuren der leichten Kette des Klones 6D8. Ein Vergleich der DNA-Sequenz zeigte, dass durch die Amplifikation mit dem Primer *kc5* ein artifizierlicher Frame Shift eingefügt wurde. Ein zweiter Klonierungsansatz der Klone 6D8 und 6H8 mittels RACE PCR und anschließende Sequenzierung konnte die Originalsequenz am Beginn der Framework 1 Regionen ermitteln (siehe **Tabelle 5**, blau unterlegte Sequenz)

Durch „site directed mutagenesis“ wurde in den TA-Vektoren, die für die schweren Ketten kodieren, in jeweils einem ausgewählten Klon das Codon 44 der schweren Ketten zu Cystein mutiert (siehe Abschnitt 3.2.9.) und mittels Sequenzierung bestätigt. Die Umklonie-

	Bezeichnung des dsFv Konstrukts	Expressionsplasmid	codiert für variable Region:	Fusionsprotein mit Pseudomonas Exotoxin A	Mutation zu Ausgangssequenz
Δ9 E-Cadherin spezifisch	7E6dsFv	7E6hexp	7E6 schwere Kette	ja	G 44 C
		7E6lexp	7E6 leichte Kette	nein	G 100 C
	7E6dsFvKDEL	7E6hexpKDEL	7E6 schwere Kette	ja, PE Mutation RDLK zu KDEL	G 44 C
		7E6lexp	7E6 leichte Kette	nein	G 100 C
	6H8dsFv	6H8hexp	6H8 schwere Kette mit artifiziellem Start in FR 1	ja	G 44 C
		6H8lexp	6H8 leichte Kette mit artifiziellem Start in FR 1	nein	G 100 C
	∅	6H8hnewexp	6H8 schwere Kette mit RACE korrigierter Sequenz	ja	G 44 C
		6H8lnewexp	6H8 leichte Kette mit RACE korrigierter Sequenz	nein	G 100 C
Δ8 E-Cadherin spezifisch	6D8dsFv	6D8hexp	6D8 schwere Kette mit RACE korrigierter Sequenz	ja	G 44 C
		6D8lexp	6D8 leichte Kette mit RACE korrigierter Sequenz	nein	G 100 C
	⊗	7H1hexp	7H1 schwere Kette	ja	G 44 C
		7H1lexp	7H1 leichte Kette	nein	G 100 C
	7H1chimsdsFv	7H1hexp	7H1 schwere Kette	ja	G 44 C
		6D8hexp	6D8 leichte Kette	nein	G 100 C

Tabelle 6: Expressionsplasmide der variablen Regionen der leichten und schweren Ketten der Antikörper 7E6, 6H8, 6D8 und 7H1 und die sich daraus ableitenden disulfidstabilisierten Immuntoxine. ∅ kein dsFv, da die schwere Kette kein Expressionsprodukt zeigte. ⊗ kein dsFv wegen unlöslicher leichter Ketten

rung in den Pseudomonas Exotoxin A Expressionsvektor (PE Vektor), wurde durch PCR-Amplifikation mit für jeden Klon spezifisch konstruierten Primern erreicht. Den 5' Primern wurde am 5' Ende eine NdeI Schnittstelle angehängt. Die Schnittstelle NdeI fügt automatisch ein Methionin Startcodon im selben Leseraster ein. Die 3' Primer wurden mit einer HindIII Schnittstelle versehen. Diese vermittelt die Ligation in den PE Vektor im Leseraster des Pseudomonas Exotoxins A.

Die Cysteinmutationen der leichten Ketten konnten während der Umklonierung in den PE Vektor realisiert werden. Den 5' Primern wurde analog zu den schweren Ketten eine NdeI Schnittstelle angefügt, im 3' Primer wurde das Codon an Position 100 zu Cystein ausgetauscht, zwei Stopcodons und eine EcoRI Schnittstelle wurde zugefügt. In dem mit NdeI und EcoRI geschnittenen PE Vektor wird das Pseudomonas Exotoxin A mit ausgeschnitten. Der durch Ligation des PCR Produkts der leichten Kette mit dem vorgeschrittenen PE Vek-

tor erhaltene Expressionsvektor exprimiert somit ausschließlich die variable Region der leichten Kette.

Nach Amplifikation, Aufreinigung und Ligation der Konstrukte in den PE Vektor wurde die korrekte Sequenz mittels DNA-Sequenzierung ausgehend von der T7 Promotorsequenz bestätigt. Die **Tabelle 6** gibt eine Übersicht der so erhaltenen Expressionsplasmide und die damit generierten disulfidstabilisierten Immuntoxine wider.

Die Expressionsplasmide aus **Tabelle 6** wurden in *E. coli*/Bl-21 Zellen transformiert und durch IPTG Induktion exprimiert. Die SDS-PAGE Elektrophorese der gelösten Inclusionbopydypellets zeigte Proteinbanden auf der Höhe von etwa 10 kDa für die leichten Ketten und etwa 48 kDa für die schweren Ketten einschließlich des Pseudomonas Exotoxins A (38 kDa). Die visuelle Analyse der aufgetrennten Proteine zeigte schon im nicht aufgereinigten Zustand eine Reinheit von über 80 Prozent in allen Ansätzen (siehe Beispiel **Abbildung 31 A**). Das Expressionsprodukt des 7H1lexp Plasmids bildete nach Aufnahme in Denaturierungspuffer eine gelartige Konsistenz aus. Eine gelelektrophoretische Auftrennung des Proteins konnte nicht realisiert werden. Das Plasmid 6H8hnexp, das für die aus den RACE-Klonierungen erhaltene korrekte Sequenz der schweren Kette des Klones 6H8 kodierte, konnte nicht zur Expression gebracht werden. Eine wiederholte DNA-Sequenzierung des Plasmids bestätigte jedoch die korrekte Sequenz, der Grund für das Scheitern der Expression konnte nicht bestimmt werden.

Die endgültigen dsFv Konstrukte wurden durch Ausbildung einer Disulfidbrücke während des Refoldingprozesses erhalten. Hierbei wurden jeweils die exprimierten leichten und schweren Ketten eines Ausgangsantikörpers in Renaturierungspuffer zusammengeführt (z.B. aus den Expressionsprodukt des Plasmids 7E6lexp und 7E6hexp). Diese Mischung wurde dem Renaturierungsprozess zugeführt. Das erhaltene Konstrukt wurde als 7E6 dsFv bezeichnet. Einzige Ausnahme war das 7H1dsFv Konstrukt, welches wie oben beschrieben eine gelartige Proteinlösung ausbildete. Ich habe versucht die gelartige Proteinlösung der leichten Kette des Antikörpers 7H1 in Anwesenheit der schweren Kette des Antikörpers 7H1 zu renaturieren. Der Renaturierungsansatz zeigte jedoch starke Ausflockungen, ver-

mutlich induziert durch Anteile an nicht löslichen leichten Ketten. Die nachfolgende Aufreinigung scheiterte, es konnte kein funktionales, d.h. $\Delta 8$ E-Cadherin bindendes Konstrukt, aufgereinigt werden. Es konnte jedoch ein chimäres dsFv Konstrukt, bestehend aus der leichten Kette des Klonen 6D8 und der schweren Kette des Klonen 7H1 erfolgreich aufgereinigt werden. Dieses Konstrukt wurde als 7H1chimdsFv bezeichnet.

Insgesamt konnten fünf dsFv Konstrukte (6H8dsFv, 6D8dsFv, 7E6dsFv, 7E6dsFvKDEL und 7H1chimdsFv) erfolgreich in drei Stufen aufgereinigt werden. **Abbildung 31 A** zeigt als Beispiel das Expressionsprodukt des 7E6lexp (Spur 1) und des 7E6hexp (Spur 2) nach der Inclusion Body Präparation, aufgetrennt in einem SDS Proteingel. In **Abbildung 31 B** ist das 7E6dsFv Konstrukt nach Renaturierung, Refolding und den drei Aufreinigungsschritten in einem SDS Gel aufgetrennt gezeigt. In Spur 3 wurde das dsFv Konstrukt, vorinkubiert in nicht-reduzierendem Proteinprobenpuffer, in Spur 4 nach Inkubation in reduzierendem Probenpuffer (mit β -Mercaptoethanol), aufgetragen. Es zeigt sich für das nicht reduzierte Protein eine Bande auf der erwarteten Höhe von etwa 62 kDa (~ 12 kDa

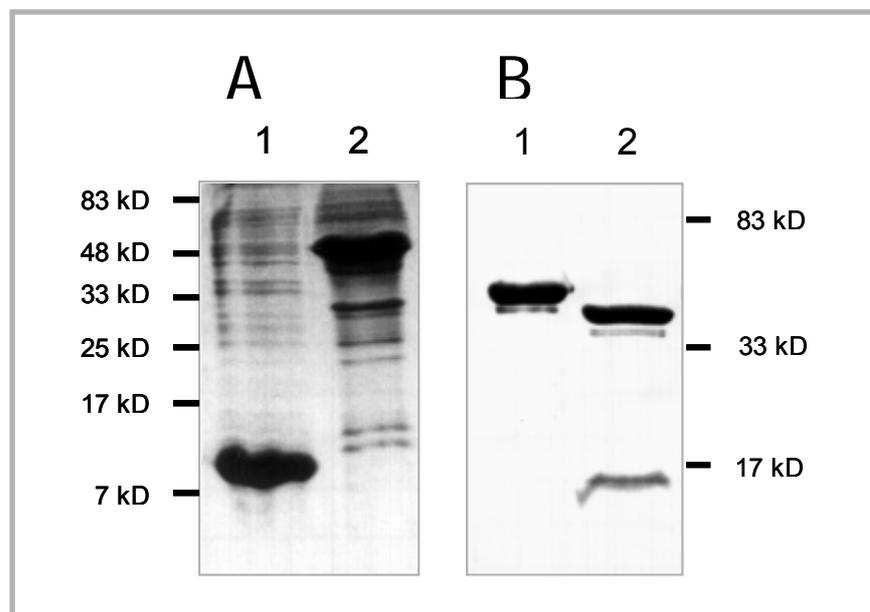


Abbildung 31: SDS-PAGE Analysen (7-20 %iges Gel).

(A) Nach der Inclusion Body Präparation. Spur 1: Expressionsprodukt des Plasmids 7E6lexp (leichte Kette); Spur 2: Expressionsprodukt des Plasmids 7E6hexp (schwere Kette und Pseudomonas Exotoxin A).

(B) Das 7E6dsFv nach Refolding und Aufreinigung. Spur 1: Protein in nicht reduzierendem Proteinprobenpuffer; Spur 2: Protein in reduzierendem Probenpuffer mit β -Mercaptoethanol

leichte Kette, ~12 kDa schwere Kette und 38 kDa Pseudomonas Exotoxin A). Im reduzierten Ansatz zeigen sich zwei Hauptbanden. Die obere Bande läuft etwas tiefer als das vollständige Konstrukt auf Spur 3 und zeigt die schwere Kette einschließlich des Pseudomonas Exotoxins A. Die zweite Bande liegt tiefer als die 17 kDa Markerbande und zeigt die durch Reduktion der Disulfidbindung abgespaltene leichte Kette des Konstrukts. Für die vier weiteren Konstrukte konnten Ergebnisse mit vergleichbaren Reinheiten erzielt werden. Für alle disulfidstabilisierten Konstrukte ist die Ausbildung der Disulfidbrücke während des Refolding Prozesses mittels SDS PAGE bestätigt worden.

4.5.2 Spezifität der dsFv Konstrukte

Die aufgereinigten dsFv Konstrukte wurden analog zu den Ausgangsantikörpern einer eingehenden Analyse ihrer Bindungseigenschaften unterzogen. In FACS Analysen zeigte sich ein starke Verschiebung des Fluoreszenzmaximums beider anti- $\Delta 9$ E-Cadherin dsFv Kon-

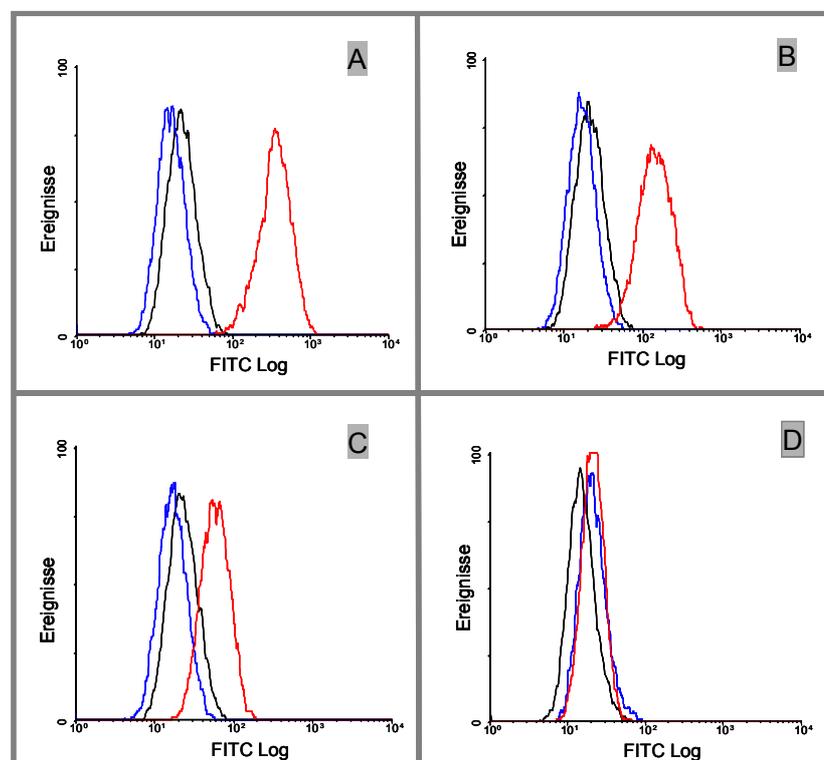


Abbildung 32: FACS-Analyse der dsFv Konstrukte 7E6dsFv (A), 6H8dsFv (B), 7H1chimsFv (C) und 6D8dsFv (D) mit nichttransfizierten (schwarze Linie), wt E-Cadherin transfizierte (blaue Linie) und mit $\Delta 9$ E-Cadherin (rote Linie; A und B) bzw. $\Delta 8$ E-Cadherin (rote Linie; C und D) transfizierten MDA-MB-435 Zellen. Als Sekundärsystem wurde ein polyklonaler α -Pseudomonas Exotoxin A Antikörper und ein FITC-gekoppelter Anti-Kaninchen Antikörper eingesetzt.

strukture (7E6dsFv und 6H8dsFv) bei mit $\Delta 9$ E-Cadherin transfizierten MDA-MB-435 Zellen (**Abbildung 32 A und B**, rote Linie) im Vergleich zu nicht transfizierten (schwarze Linie) und mit wt E-Cadherin transfizierten Zellen (blaue Linie). Eine Kreuzreaktivität mit wt E-Cadherin konnte nicht festgestellt werden. Mehr noch zeigte sich eine Erniedrigung der Hintergrundfluoreszenz bei wt E-Cadherin exprimierenden Zellen in Gegenüberstellung zu nicht transfizierten Zellen. Dieser Effekt war reproduzierbar. Auch das anti- $\Delta 8$ E-Cadherin dsFv Konstrukt 7H1chimdsFv zeigte eine spezifische Verschiebung zu stärkerer Fluoreszenz im Vergleich zu den Kontrollen (**C**). Die Verschiebung fiel jedoch schwächer aus als für die $\Delta 9$ E-Cadherin spezifischen Konstrukte. Allein das Konstrukt 6D8dsFv zeigte in den FACS-Analysen keine Bindung an die spezifische Transfektante (**D**).

Um die durch die FACS-Analysen gezeigte Bindung der dsFv Konstrukte 7E6dsFv, 6H8dsFv und 7H1chimdsFv an die jeweilig spezifische E-Cadherin Deletionsmutante zu bestätigen, wurden Western Blot Analysen mit Gesamtproteinlysaten aus MDA-MB-435 Transfektanten durchgeführt. Beide $\Delta 9$ E-Cadherin dsFv Konstrukte zeigten ausschließlich die Markierung des $\Delta 9$ E-Cadherins (**Abbildung 33 A (7E6dsFv) und B (6H8dsFv)**). $\Delta 8$ und wt E-Cadherin wurden durch die Konstrukte nicht markiert. Während das 7E6dsFv Konstrukt keine Hintergrundbindung zeigte, konnte für das 6H8dsFv Konstrukt eine leichte Hintergrundbindung beobachtet werden. Das 7H1chimdsFv zeigte eine Markierung des $\Delta 8$

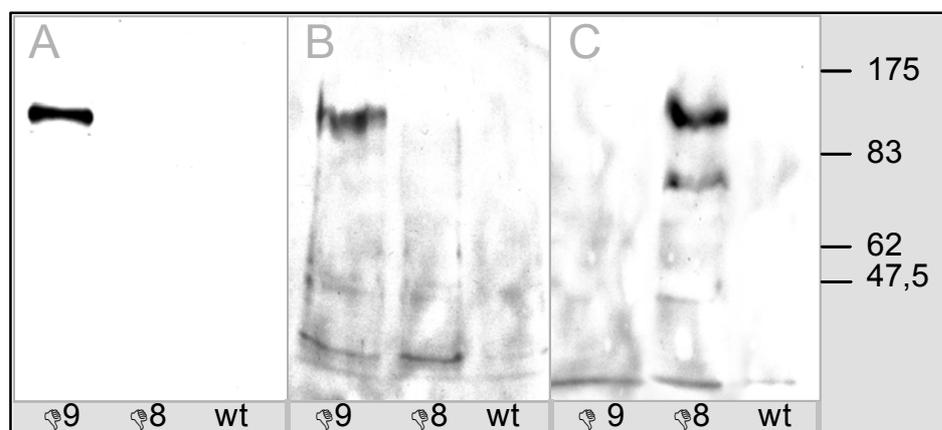


Abbildung 33: Western Blot Analyse von $\Delta 9$ E-Cadherin ($\Delta 9$), $\Delta 8$ E-Cadherin ($\Delta 8$) und mit wild-typ E-Cadherin (wt) transfizierten MDA-MB-435 Proteinlysaten. Als Primärantikörper wurden die disulfidstabilisierten Immuntoxine 7E6dsFv (**A**), 6H8dsFv (**B**) und 7H1chimdsFv (**C**) eingesetzt. Die prominente zweite Bande in (**C**) ist analog zu anderen E-Cadherin spezifischen Antikörpern vorhanden (AEC, SHE, $\Delta 8$ E-Cadherin spezifische Ak 6D8).

E-Cadherins (C). Analog zu Western Blot Ergebnissen mit den $\Delta 8$ E-Cadherin spezifischen Ausgangsantikörpern, konnte die Markierung einer zweiten, tiefer laufenden Bande gezeigt werden. Bei dieser Bande handelt es sich vermutlich um eine $\Delta 8$ E-Cadherin spezifische Abbaubande oder um alternativ prozessiertes Protein. Ein schwacher Hintergrund konnte auch für dieses Konstrukt beobachtet werden. Zusammenfassend zeigten die Western Blot Ergebnisse eindeutig die Spezifität der dsFv Konstrukte an die jeweilige Deletionsmutante. Biacore Analysen konnten die Spezifität der Konstrukte bestätigen. **Abbildung 34** zeigt die Sensogramme der verschiedenen dsFv Konstrukte an wt E-Cadherin (A) und an die jeweili-

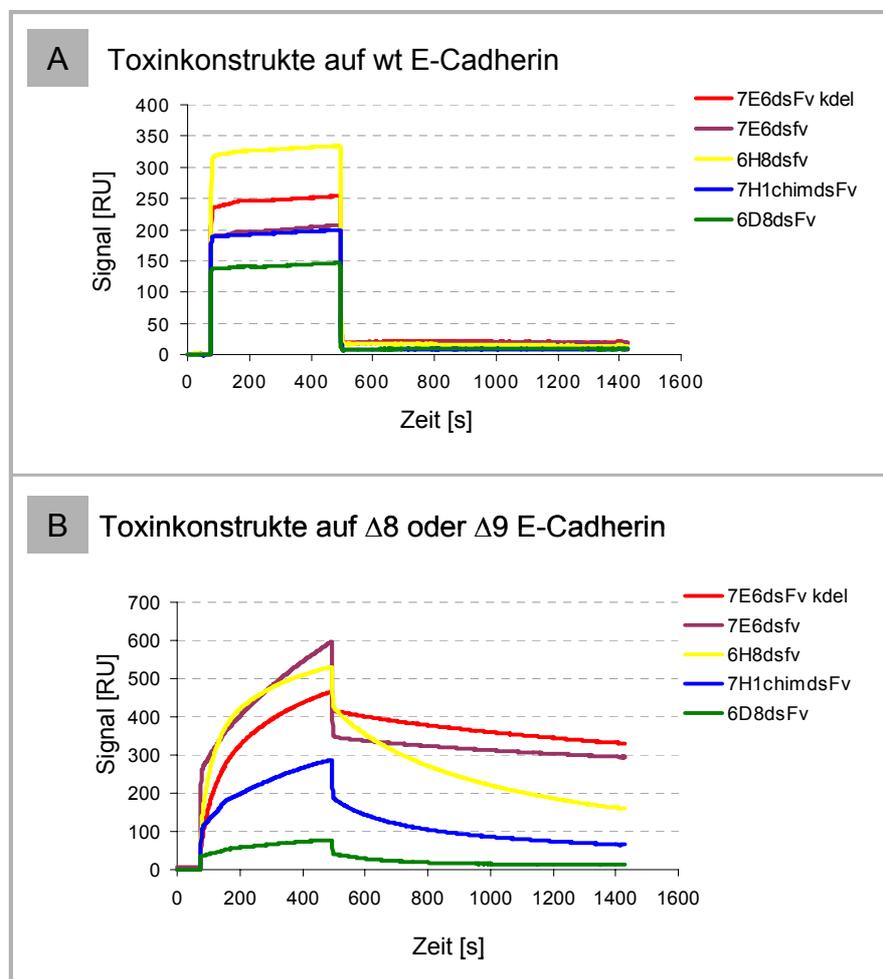


Abbildung 34: Bindungsanalysen der dsFv Konstrukte durch Biacore Analysen.

(A) Bindungskurven verschiedener dsFv Konstrukte an rekombinantes wt E-Cadherin.

(B) Bindungskurven der dsFv Konstrukte an die jeweilig spezifische rekombinante E-Cadherin Mutante.

Ein Biacore NTA-Chip wurde mit 100 RU der E-Cadherin Konstrukte beladen. Die Assoziation der dsFv Konstrukte wurde durch eine Injektion der Proben bei einer Durchflussrate von 5 $\mu\text{l}/\text{min}$ für 7 Minuten erfasst, die Dissoziation wurde über 15 Minuten bei 5 $\mu\text{l}/\text{min}$ Elutionspuffer bestimmt. Die Konzentration der dsFv Konstrukte betrug in allen Fällen 100 nM.

ge E-Cadherin Deletionsmutante (B). Keines der dsFv Konstrukte zeigte signifikante Assoziation an wt E-Cadherin (**Abbildung 34 A**). Die $\Delta 9$ E-Cadherin spezifischen dsFv Konstrukte 7E6dsFv (orange Kurve), 7E6dsFvKDEL (rote Kurve) und 6H8dsFv (grüne Kurve) zeigen eine gute Assoziation an das $\Delta 9$ E-Cadherin während der Injektionsphase. Die stärker abfallende Kurve nach Abbruch der Injektion bei dem Konstrukt 6H8dsFv im Vergleich zu 7E6dsFv verhielt sich analog zu den Dissoziationskurven der Ausgangsantikörper 6H8 und 7E6. Das $\Delta 8$ E-Cadherin spezifische Konstrukt 6D8dsFv (grüne Linie) zeigte, wie auch in den FACS-Analysen in **Abbildung 32** nachgewiesen, keine signifikante Assoziation an $\Delta 8$ E-Cadherin. Das 7H1 chimidsFv Konstrukt (blaue Kurve) zeigte moderate Assoziation an $\Delta 8$ E-Cadherin, bei schneller Dissoziation nach Beendigung der Injektionsphase. Als Kontrolle wurde die Funktionalität des wt E-Cadherins mit einer Injektion von 100 nM des E-Cadherin Antikörpers HECD-1 überprüft. Es zeigte sich im Gegensatz zu den mutationsspezifischen dsFv Konstrukten eine starke Assoziation an wt E-Cadherin (nicht gezeigt).

Die FACS-, Western Blot- und Biacore-Analysen zeigten, dass durch die Klonierung der variablen Regionen der $\Delta 9$ E-Cadherin spezifischen Antikörperklone 7E6 und 6H8 und deren Expression und Aufreinigung als disulfidstabilisierte Immuntoxine die Spezifität der

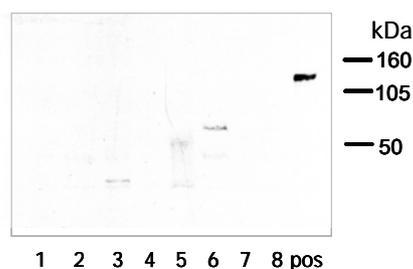


Abbildung 35: Western-Blot mit Proteinlysaten aus verschiedenen Geweben. Spur 1: Leber, Spur 2: Pankreas, Spur 3: Kolon, Spur 4: Duodenum, Spur 5: Magen, Spur 6: Ösophagus, Spur 7: Lunge, Spur 8: Niere, pos.: MDA-MB435S $\Delta 9$. Aufgetragen wurden jeweils 7 μ g Gesamtprotein.

Ausgangsantikörper erreicht werden konnte. Im Gegensatz hierzu konnte für das 6D8dsFv keine spezifische Bindung an $\Delta 8$ E-Cadherin nachgewiesen werden. Für das chimäre Konstrukt aus der leichten Kette der variablen Region des Antikörperklones 6D8 und der schweren Kette des Klones 7H1 konnte interessanterweise eine spezifische, wenn auch schwache Bindung an $\Delta 8$ E-Cadherin nachgewiesen werden.

Um die Spezifität des 7E6dsFvKDEL - in Analogie zu *in vivo* Bedingungen- genauer zu charakterisieren, wurde ein Western Blot mit Proteinlysaten humaner Organe durchgeführt (Abbildung 35). Als Positivkontrolle wurde ein Proteinlysat mit $\Delta 9$ E-Cadherin transfizierten MDA-MB-435S Zellen mitgeführt (pos). Hier zeigte sich eine prominente Bande auf der zu erwartenden Höhe des E-Cadherins. Insgesamt zeigten die übrigen Proteinlysate kaum Anfärbung. Zwei sehr schwache Banden sind in den Lysaten aus Kolon und Ösophagus zu erkennen. Zwei kaum wahrnehmbare Banden sind in dem Proteinlysat aus Magen auszumachen. Als weitere Kontrolle wurde mit den gleichen Proteinlysaten ein Western Blot mit dem Antikörper AEC, der wt E-Cadherin erkennt, durchgeführt. Hier zeigten sich in allen Lysaten Banden auf der Höhe des E-Cadherins (Becker et al. 1999).

4.5.3 Bindungskinetiken der dsFv Konstrukte

Analog zur Bestimmung der Bindungskinetiken der Ausgangsantikörper wurden die Bindungskonstanten des dsFv mittels Biacore-Analysen bestimmt (siehe Tabelle 7). Hierfür wurden ebenfalls mindestens vier verschiedene Konzentrationen der dsFvs gegen die jeweilige spezifische E-Cadherin Mutante gemessen. Das 6D8dsFv zeigte in Vorversuchen keine nachweisbare Bindung. Daher wurde auf die Kinetikbestimmung für dieses Konstrukt verzichtet. Die Interaktion des 7H1chimdsFv mit $\Delta 8$ E-Cadherin war sehr schwach. Eine mathematische Angleichung konnte nicht durchgeführt werden.

	k_a (1/MS)	k_d (1/s)	K_D (M)
<i>$\Delta 9$ spezifische dsFvs</i>			
7E6dsFv kdel	$8,9 \cdot 10^4$	$1,4 \cdot 10^{-4}$	$1,6 \cdot 10^{-9}$
6H8dsFv	$1,2 \cdot 10^5$	$9,6 \cdot 10^{-4}$	$8,2 \cdot 10^{-9}$
<i>$\Delta 8$ spezifische dsFvs</i>			
6D8dsFv	-	-	-
7H1chimdsFv	*	*	*

Tabelle 7: Bindungskinetiken der dsFv Konstrukte bestimmt durch *Surface Plasmon Resonance* (Biacore-Analyse). Gezeigt ist die Assoziationskonstante k_a , die Dissoziationskonstante k_d und die Gleichgewichtskonstante K_D berechnet unter Annahme einer einfachen 1 zu 1 Interaktion (Langmuir Bindungs Modell). - : Keine Bindung nachweisbar. * : Angleichung an Langmuir Modell wegen zu schwacher Interaktion nicht möglich.

Die $\Delta 9$ E-Cadherin Binder 7E6dsFv und 6H8dsFv zeigten ein gutes Bindungsverhalten. Im Vergleich zu den Ausgangsantikörpern 7E6 und 6H8 verringerten sich die Werte der Dis-

soziationskonstanten K_D um etwa eine Zehnerpotenz. Die Dissoziationskonstanten der $\Delta 9$ E-Cadherin spezifischen dsFv Konstrukte verhalten sich entsprechend der K_D s der F(ab) Fragmente. Dies bedeutet, dass trotz der rekombinanten Manipulation kein wesentlicher Verlust der Affinität aufgetreten ist. Die $\Delta 8$ E-Cadherin spezifischen dsFvs zeigen beide so schwache Affinitäten, dass eine Bestimmung der Dissoziationskonstante nicht möglich war.

4.5.4 Zytotoxizität der dsFv Konstrukte

Die spezifische Zytotoxizität der disulfidstabilisierten Konstrukte 6D8dsFv und 7H1chimdsFv gegen $\Delta 8$ E-Cadherin, sowie der Konstrukte 6H8dsFv und 7E6dsFvkdell gegen $\Delta 9$ E-Cadherin wurde mittels XTT-Assays mit L929 Zellen, die mit der jeweiligen spezifischen E-Cadherinmutante bzw. wt E-Cadherin transfiziert wurden, getestet (**Abbildung 36**). Zwei Konstrukte zeigten keine zytotoxische Wirkung in diesem System: Das 6D8dsFv und das 6H8dsFv. Sie zeigten selbst bei der sehr hohen Konzentration von 1000 ng/ml keine signifikante Hemmung der L929 Zellen mit transfiziertem $\Delta 8$ E-Cadherin und $\Delta 9$ E-Cadherin. Das 6D8dsFv zeigte in den vorangegangenen Bindungsstudien eine sehr schwache Assoziation an das mutierte E-Cadherin. Eine spezifische, durch Bindung an das mutierte E-Cadherin vermittelte Zytotoxizität, war daher nicht wahrscheinlich. Im Gegensatz hierzu zeigte das 6H8dsFv in den Biacore-Analysen eine gute Bindung an das $\Delta 9$ E-Cadherin. Dennoch zeigte das Konstrukt in vier wiederholten Ansätzen keine Toxizität.

Eine moderate Zytotoxizität zeigte das 7H1chimdsFv gegen $\Delta 8$ E-Cadherin exprimierende L929 Zellen. Der LD_{50} -Wert, diejenige Konzentration, bei der 50 Prozent der Zellen durch das Toxin gehemmt werden, liegt für dieses Konstrukt bei etwa 200 ng/ml. Bei der maximal eingesetzten Konzentration von 1000 ng/ml zeigte sich eine über 60 prozentige Hemmung der $\Delta 8$ E-Cadherin transfizierten Zellen. Bei dieser Konzentration zeigt sich keine Hemmung der mit wt E-Cadherin transfizierten Zellen.

Das 7E6dsFvkdsl zeigte die stärkste zytotoxische Wirkung in diesem System. Die LD₅₀ wurde für dieses Konstrukt bei einer Konzentration unter 10 ng/ml erreicht. Bei 100 ng/ml waren im Vergleich zur Kontrolle (Zellen ohne dsFv) nur noch zehn Prozent der Zellen vital. Bei dieser Konzentration zeigte sich eine schwache Hemmung der mit wt E-Cadherin transfizierten Kontrollzellen (etwa zehn Prozent). Bei 1000 ng/ml ist die spezifi-

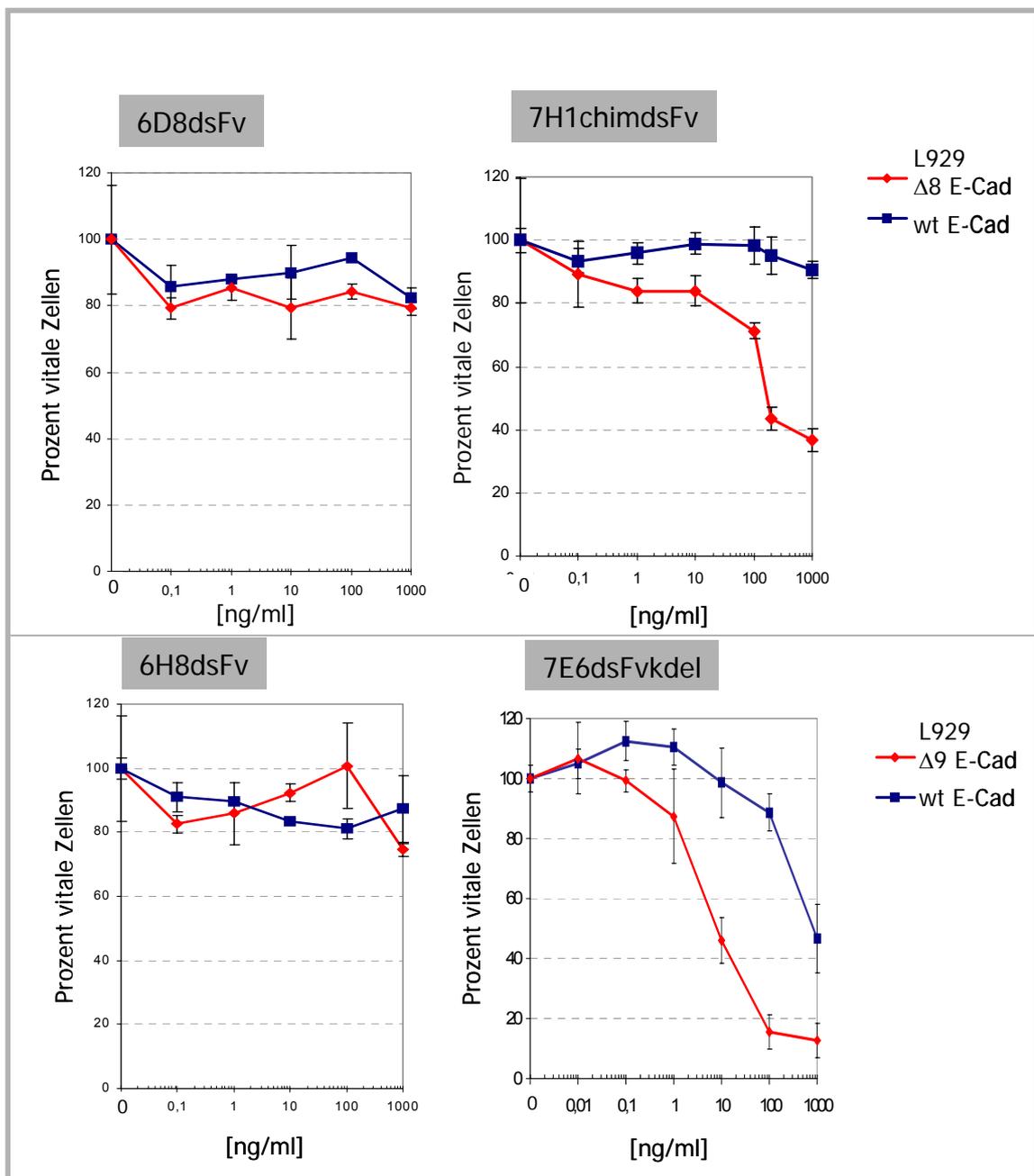


Abbildung 36: XTT-Assays der dsFv Konstrukte auf mit Δ9 E-Cadherin bzw. Δ8 E-Cadherin (jeweils rote Linie) und wild-typ E-Cadherin (blaue Linie) transfizierten L929 Fibroblasten. Die Abweichungsbalken geben die Standardabweichung aus vier verschiedenen Ansätzen wieder.

sche Zytotoxizität nur noch gering verstärkt, es zeigt sich jedoch eine sehr starke unspezifische Toxizität gegen mit wt E-Cadherin transfizierte Zellen. Somit kann festgestellt werden, dass dieses Toxin im Konzentrationsbereich um 100 ng/ml eine ausgesprochen spezifische Toxizität gegen mit $\Delta 9$ E-Cadherin transfizierte Zellen im Vergleich zu Zellen, die mit wt E-Cadherin transfiziert wurden, aufweist.

Um die spezifische Toxizität des 7E6dsFvkdcl Konstruktes zu bestätigen, wurden Koloniebildungs-Assays mit transfizierten L929 Fibroblasten und MDA-MB-435S Mammakarzinomzelllinien durchgeführt (**Abbildung 37 A und B**). Das Konstrukt zeigte auch in diesem Assay eine spezifische Zytotoxizität gegen mit $\Delta 9$ E-Cadherin transfizierte L929 Zellen. Im

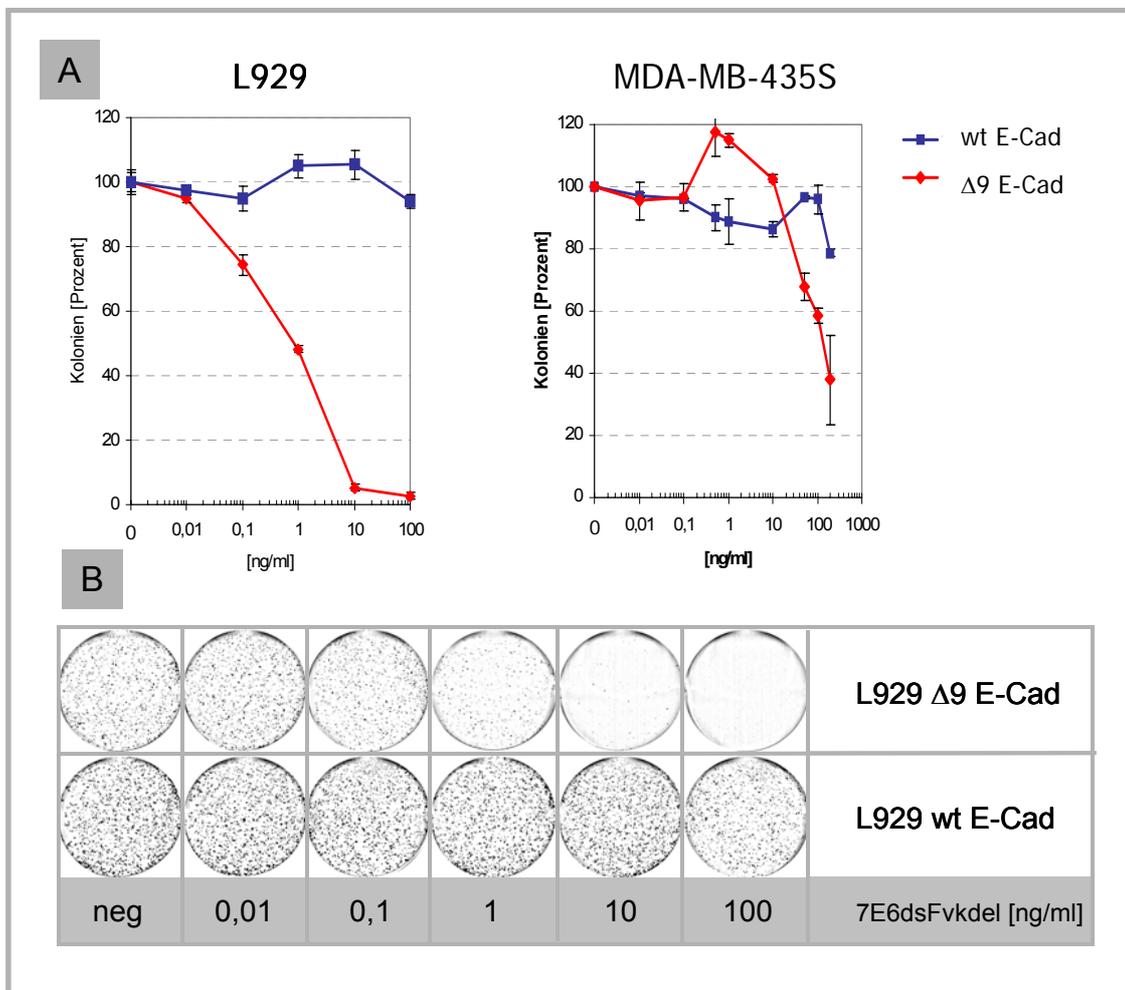


Abbildung 37: Konzentrationsabhängige Zytotoxizität des dsFv 7E6dsFvkdcl bestimmt durch Koloniebildungs-Assays.

(A) Quantifizierung der Koloniebildungs-Assays auf mit $\Delta 9$ E-Cadherin (rote Linie) und mit wild-typ E-Cadherin (blaue Linie) transfizierten L929 Fibroblasten und MDA-MB-435S Mammakarzinomzellen. Die Abweichungsbalken geben die Standardabweichung aus zwei verschiedenen Ansätzen wieder.

(B) Original Scans der gefärbten Kolonien von L929 Fibroblasten aus (A)

Unterschied zu den XTT-Assays ließ sich schon bei 1 ng/ml eingesetztem Toxin eine Verringerung der Kolonienzahl von über 50 Prozent gegenüber den Kontrollansätzen ohne Toxin nachweisen. Ab 10 ng/ml Toxin konnten kaum mehr Kolonien gezählt werden. Bei dieser Konzentration war in den Ansätzen mit wt E-Cadherin transfizierten Zellen keine Verringerung der Kolonienzahl messbar.

Im Vergleich zu den L929 Zellen war die Wirkung des 7E6dsFvkd Δ 9 auf transfizierte MDA-MB-435S Zellen nicht so stark ausgeprägt. Bei der höchsten eingesetzten Konzentration von 200 ng/ml wurde für die mit Δ 9 E-Cadherin transfizierten Zellen lediglich eine Hem-

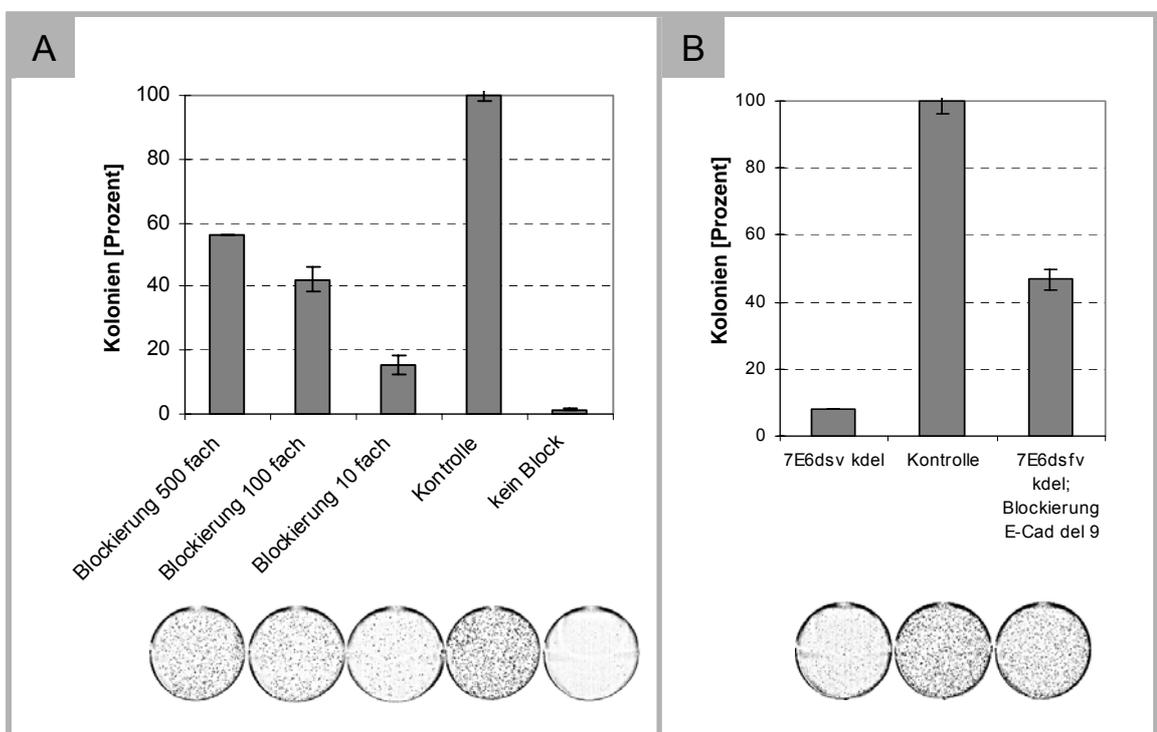


Abbildung 38: Blockierung der zytotoxischen Aktivität des 7E6dsFvkd Δ 9 ermittelt mittels Koloniebildungs-Assays mit L929 Zellen. (A) Blockierung durch Überschuss an monoklonalem Antikörper 7E6. (B) Blockierung durch rekombinantes Δ 9 E-Cadherin (100 facher Überschuss). Eingesetzt wurden 10 ng/ml Toxin. Gezeigt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen. Im unteren Teil sind Original Scans der gefärbten Kolonien von L929 Fibroblasten aus (A) und (B) abgebildet.

mung der Kolonienanzahl auf etwa 40 Prozent bestimmt. Bei dieser Konzentration zeigte sich eine leichte unspezifische Hemmung im Zellwachstum bei den mit wt E-Cadherin transfizierten Kontrollzellen um etwa 20 Prozent. Dennoch konnte für das 7E6dsFvkd Δ 9 auf transfizierten MDA-MB-435S Zellen bei 100 ng/ml eine spezifische Hemmung des Kolonienwachstums um etwa 40 Prozent erreicht werden.

Um die Spezifität des 7E6dsFvkdsl Immuntoxins weiter zu charakterisieren, wurden Blockierungsexperimente, basierend auf Koloniebildungs-Assays mit L929 Zellen, durchgeführt. In **Abbildung 38 A** ist die Blockierung durch den monoklonalen Antikörper 7E6 gezeigt. Während bei der Kontrolle ohne Antikörper („kein Block“) unter Zugabe von 10 ng/ml des 7E6dsFvkdsl weniger als zwei Prozent der Kolonien im Vergleich zu Ansätzen ohne Toxin gemessen werden konnten, zeigte sich schon bei zehnfachem Überschuss an mAk 7E6 eine Hemmung der Koloniausbildung durch das dsFv. Der Prozentsatz der Kolonien stieg hier auf etwa 15 Prozent an. Bei einem 100fachen Überschuss an kompetitivem Antikörper 7E6 stieg die Kolonienanzahl weiter auf 42 Prozent an. Der 500fache Überschuss führte zu der maximalen Hemmung von 56 Prozent der Kolonien im Vergleich zu Ansätzen ohne Toxin.

Eine weitere spezifische Blockierung des 7E6dsFvkdsl ist in **Abbildung 38 (B)** dargestellt. Die Zugabe von $\Delta 9$ E-Cadherin in den Toxinansatz zeigte eine Erhöhung der absoluten mittleren Kolonienanzahl von 45, in den Ansätzen ohne $\Delta 9$ E-Cadherin und 10 ng/ml 7E6dsFvkdsl, auf 267 Kolonien in den Ansätzen mit zusätzlich 1 $\mu\text{g/ml}$ rekombinantes E-Cadherin (in Abbildung: 8 auf 46 Prozent).

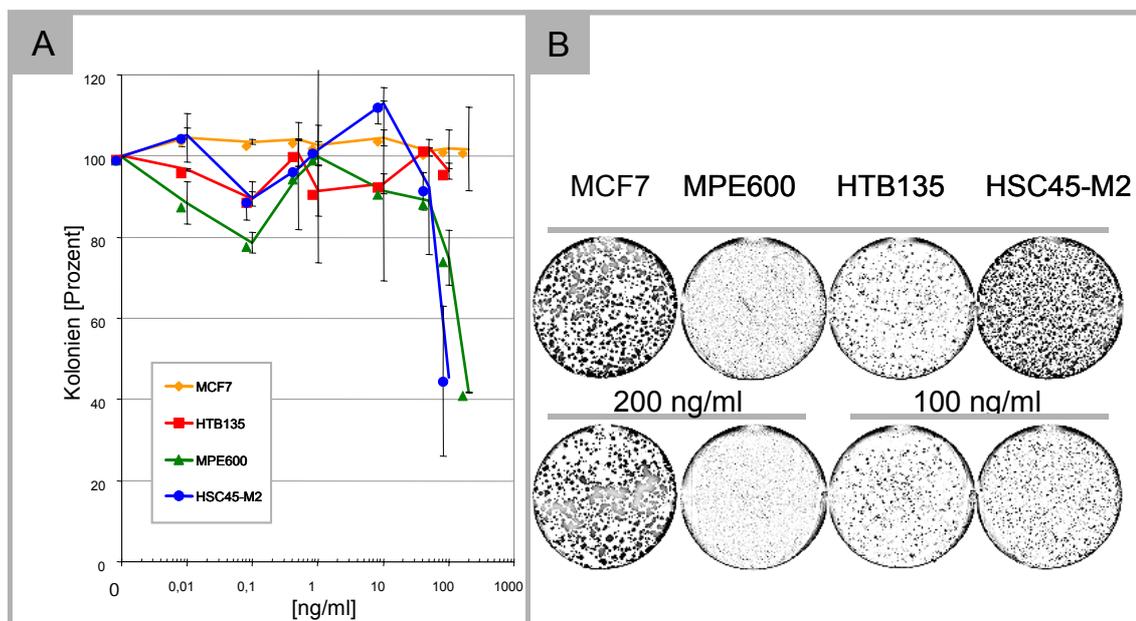


Abbildung 39: Koloniebildungs-Assays des 7E6dsFvkdsl auf endogen E-Cadherin exprimierenden Zelllinien. (A) Quantifizierung der konzentrationsabhängigen Hemmung. Gezeigt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen aus zwei Versuchen. (B) Original Scans von gefärbten Zellkolonien aus (A)

Die zytotoxische Wirkung des 7E6dsFvkdell auf Zellen, die endogen E-Cadherin exprimieren, ist in **Abbildung 39** zusammengefasst. Die wild-typ E-Cadherin exprimierende Zelllinie MCF7 und die E-Cadherin negative Zelllinie HTB135 zeigten über den gesamten eingesetzten Konzentrationsbereich des 7E6dsFvkdell (100 bzw. 200 ng/ml) keine Erniedrigung in der Kolonienanzahl im Vergleich zu Ansätzen ohne Toxin. Für die beiden endogen $\Delta 9$ E-Cadherin exprimierenden Zelllinien MPE600 und HSC45-M2 war im Vergleich zu den Ergebnissen mit den transfizierten L929 Zellen nur eine schwache zytotoxische Wirkung des Konstruktes zu ermitteln. Bei 100 ng/ml eingesetztem Toxin wurde die Kolonienanzahl in den MPE600 Ansätzen um etwas mehr als 20 Prozent gehemmt. Bei dieser Konzentration wurde die Ausbildung messbarer Zellkolonien in den HSC45-M2 Ansätzen um etwas mehr als 50 Prozent erniedrigt. Dieser Prozentsatz wurde in den MPE600 Zellen bei einer Konzentration von 200 ng/ml erreicht. Bei lichtmikroskopischer Betrachtung der mit 200 bzw. 100 ng/ml 7E6dsFvkdell inkubierten Kolonien zeigte sich, dass in den Ansätzen der MPE600 bzw. HSC45-M2 Zellen ein signifikanter Unterschied in der Größe der verbleibenden Kolonien im Vergleich zu Ansätzen ohne Toxin festzustellen war. Dieser Größenunterschied ist in der wild-typ exprimierenden Zelllinie MCF7 und der E-Cadherin negativen Zelllinie HTB135 nicht zu beobachten (Daten nicht gezeigt).

4.5.5 Zytotoxischer Effekt des 7E6dsFvkdell Immuntoxins im zeitlichem Verlauf

Durch den Einsatz einer Zellinkubationskammer an einem Laser Scanning Mikroskop konnte die Wirkung des 7E6dsFvkdell auf wt E-Cadherin und $\Delta 9$ E-Cadherin exprimierende L929 Fibroblasten über einen Zeitraum von 34,5 Stunden beobachtet und über Einzelaufnahmen alle drei Minuten dokumentiert werden. Die Bilder wurden mit dem Programm Quicktime (Apple Computer) zu einer Videosequenz zusammengeführt (<http://www.jimages.de>). In **Abbildung 41** sind Einzelaufnahmen im Abstand von 90 Minuten gezeigt. Dem Zeitpunkt Null ging eine 24-stündige Vorinkubation mit dem Immuntoxin voraus. Durch Analyse mehrerer Gesichtsfelder wurde sichergestellt, dass alle wt E-Cadherin exprimierenden Zellen durch die Vorinkubation mit dem lipophilen Farbstoff Dil angefärbt wurden.

Wt E-Cadherin exprimierende Zellen zeigten über den gesamten Beobachtungszeitraum eine vitale Morphologie. Mehrere Zellteilungen der wt E-Cadherin exprimierenden Zellen waren zu beobachten. Der zur Markierung verwendete Farbstoff Dil ging hierbei auf beide Tochterzellen über. In der gezeigten Zellpopulation ist während der gesamten Sequenz kein Zelltod zu erkennen.

Im Gegensatz hierzu fand bei $\Delta 9$ E-Cadherin exprimierenden Zellen keine Zellteilung statt. Die meisten der $\Delta 9$ E-Cadherin exprimierenden Zellen starben im Beobachtungszeitraum (etwa 80 Prozent). Die morphologischen Veränderungen während des Zelltodes (Schrumpfen des Zytoplasmas, Einschnürungen der Zytoplasmamembran, apoptotische Vesikel) deuten auf Apoptose als Hauptmechanismus des toxinvermittelten Zelltodes hin. In **Abbildung 41** sind vergrößerte Darstellungen des Zeitpunktes Null und 34,5 Stunden gezeigt.

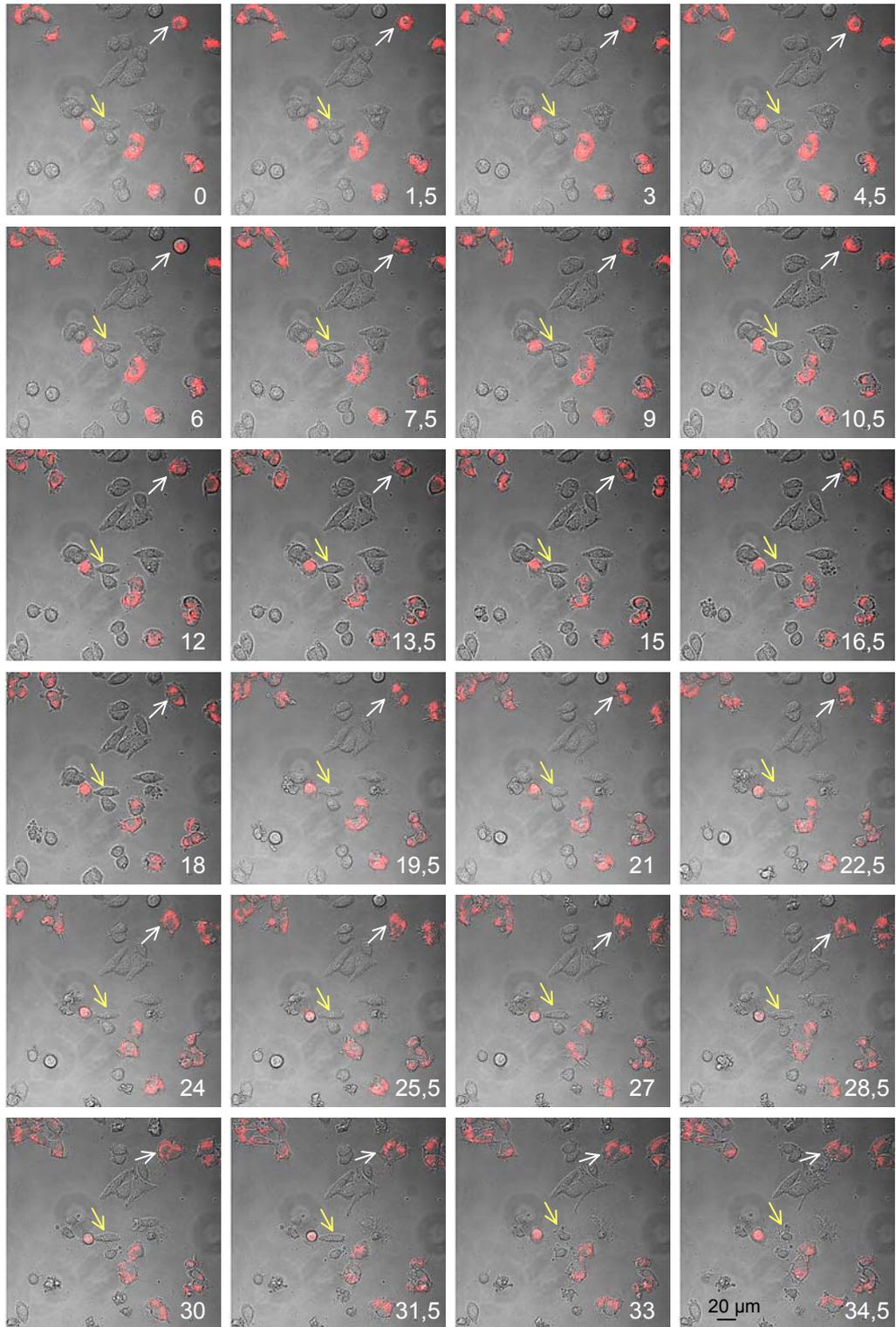


Abbildung 40: Langzeitbeobachtung des zytotoxischen Effekts mit einem Zellinkubator unter dem Laser Scanning Mikroskop:

Wt E-Cadherin exprimierende L929 Zellen (rot gefärbt, weißer Pfeil) und $\Delta 9$ E-Cadherin exprimierende Zellen (nicht gefärbt, gelber Pfeil) unter dem Einfluss von 10 ng/ml 7E6 dsFv. Dem ersten Bild (0 h) geht eine 24-stündige Inkubation mit dem Immunotoxin voraus. In dieser Zeit ist kein Unterschied bei den beiden Transfektanten zu beobachten.

Die vollständige Videosequenz ist im Anhang veröffentlicht.

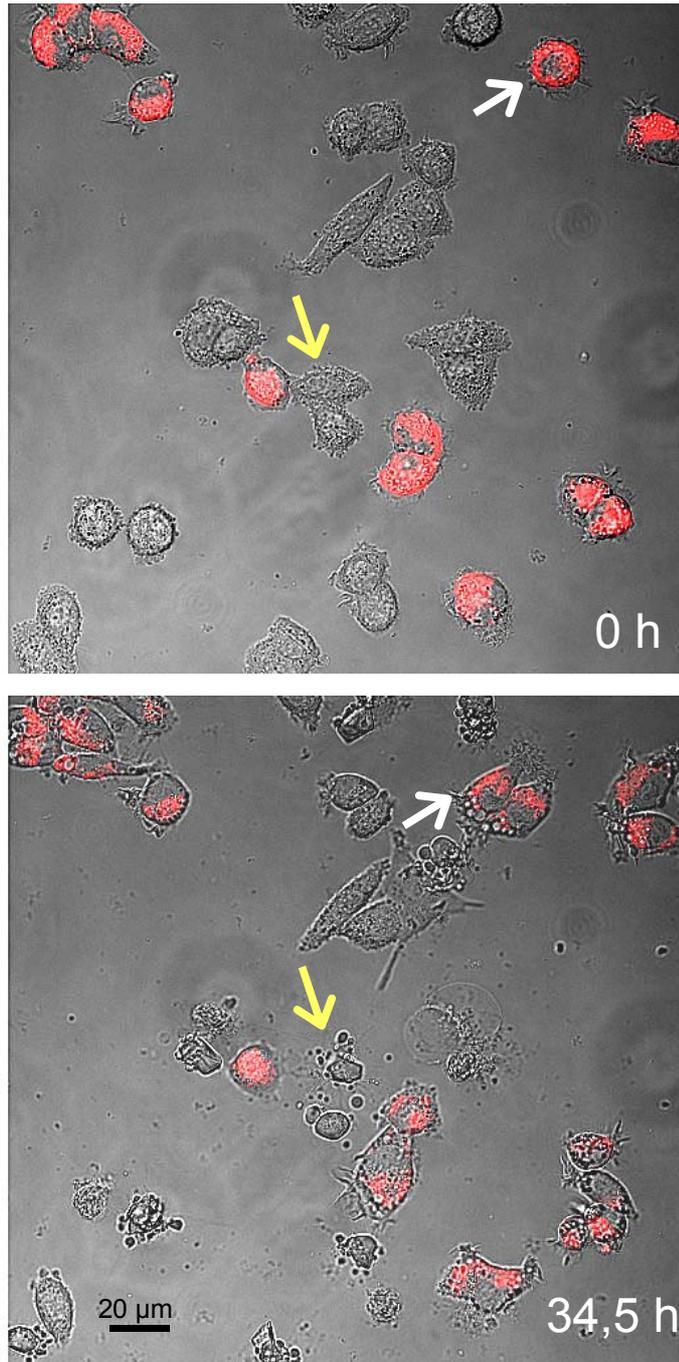


Abbildung 41: Morphologische Veränderungen der wt E-Cadherin und $\Delta 9$ E-Cadherin exprimierenden L929 Zellen: Vergrößerte Darstellung der Laser Scanning Aufnahmen aus **Abbildung 40** (Zeitpunkt 0 und 34,5 Stunden). Weißer Pfeil: Sich teilende wt E-Cadherin exprimierende Zelle, gelber Pfeil: Sterbende $\Delta 9$ E-Cadherin exprimierende Zelle.

5 Diskussion

Spezifität der monoklonalen mutationsspezifischen Antikörper

Humane Tumore entstehen durch eine Serie von Mutationen, von denen viele zur Expression von Proteinen mit neuer Funktion führen. Diese veränderten Proteine sind attraktive Ziele für neue immuntherapeutische Ansätze, da nur Antikörper gegen derartige somatische Mutationen tatsächlich tumorspezifisch sind.

Die in dieser Arbeit charakterisierten Antikörper und die daraus generierten rekombinanten Immuntoxine richten sich gegen zwei verschiedene Antigene, Exon-9 deletiertes E-Cadherin und Exon-8 deletiertes E-Cadherin, die durch somatische Mutationen während der Onkogenese entstanden sind. Diese Antigene werden daher exklusiv auf Tumorzellen exprimiert. Die meisten in der Literatur beschriebenen „tumorspezifischen“ Zielantigene sind hingegen auf Tumorzellen nur überexprimiert (Kreitman et al. 2000a). In diesen Fällen ist es nicht auszuschließen, dass das jeweilige Immuntoxin, bedingt durch schwache Expression des Zielantigens, auch auf Nicht-Tumorzellen bindet und damit *gesunde* Zellen schädigt. Das einzige in der Literatur beschriebene Beispiel für ein weiteres mutationsspezifisches Zielmolekül auf verschiedenen Tumorarten ist der epidermale Wachstumsfaktor Rezeptor (EGFR). In Glioblastomen und in Lungen- und Mammakarzinomen wurde eine somatische Mutation entdeckt, die zu einer in-frame Deletion in diesem Molekül führt (Wikstrand et al. 1995). Im mutierten Protein sind die extrazellulären Aminosäuren 6 bis 273 (Exon 2 bis 7) deletiert und im Übergang wird ein Glycin eingefügt. Auch gegen dieses tumorspezifische Antigen konnten spezifische Antikörper generiert werden. Immuntoxine, hervorgehend aus diesem Antikörper, zeigten spezifische Zytotoxizität gegen Zellen, die mit der mutierten Form des EGFR transfiziert wurden. Zellen, die ausschließlich die wild-typ Form des EGFR exprimierten, wurden nicht geschädigt, obwohl die Expressionsrate an EGFR viermal so hoch war (Lorimer et al. 1995).

In dieser Arbeit werden zum zweiten Mal überhaupt Immuntoxine vorgestellt, die wirklich tumorspezifisch sind.

In Vorarbeiten wurde die Spezifität der Antikörper durch nicht native Nachweisverfahren (Western-Blot, Immunhistochemie) eindrucksvoll gezeigt. Durch FACS Analysen nicht fixierter Zellen konnte erstmals auch die Mutationsspezifität gegen natives E-Cadherin, exprimiert auf der Oberfläche der transfizierten Zellen, nachgewiesen werden. Dies ist ein entscheidender Nachweis, da die monoklonalen Antikörper durch Immunisierung mit Peptiden und nicht mit nativen, d. h. mit ausgebildeter Sekundärstruktur versehenen, Proteinen hergestellt wurden (Becker et al. 1999, Becker et al. 2002). Für die Durchführung der sehr sensitiven Biacore Analysen zur Bestimmung etwaiger Kreuzreaktionen mit wild-typ E-Cadherin wurde zurückgefaltetes, also ebenfalls natives, rekombinantes Protein verwendet. Für die beiden $\Delta 9$ E-Cadherin spezifischen Antikörper 6H8 und 7E6 kann faktisch keine Kreuzreaktivität beobachtet werden. Die beiden $\Delta 8$ E-Cadherin spezifischen Klone 6D8 und 7H1 zeigen hingegen geringe Assoziation an wild-typ E-Cadherin in den Biacore Kurven. Die Assoziation ist jedoch so schwach, dass ein Einsatz dieser Antikörper als Immuntoxin nicht in Frage gestellt ist.

Die Bestimmung der Assoziationskonstante K_a und der Dissoziationskonstante K_d der monoklonalen Antikörper zeigten ausgezeichnete Werte für den K_d zwischen $3,4 \cdot 10^{-4}$ und $2,3 \cdot 10^{-5}$. Die sich daraus errechnenden K_D Werte, wobei $K_D = k_d/k_a$ ist, liegen im nanobis picomolaren Bereich (7E6: 120 pM; 6H8: 1,2 nM; 6D8: 8,1 nM, 7H1: 35 pM). Im Vergleich mit Affinitäten verschiedener Antikörper, die für tumorspezifische Therapieansätze evaluiert wurden, schneiden die getesteten mutationsspezifischen Antikörper sehr gut ab. So zeigt zum Beispiel der Antikörper K1, spezifisch gegen das Protein Mesothelin, das auf Mesotheliomen und Ovariakarzinomen überexprimiert wird, einen K_D von 8 nM, ermittelt ebenfalls mittels Biacore (Brinkmann et al. 1997). Dieser Antikörper, chemisch gekoppelt mit Pseudomonas Exotoxin A als Effektorprotein, vermittelte spezifische Zytotoxizität in einem Zellkultursystem und im Tiermodell (Hassan et al. 2000). Für die Antikörper TAI, BD5 und RC6, spezifisch für das Tumorantigen HER-2/c-erbB-2, das in vielen Mammakarzinomen überexprimiert wird, wurden mittels Radioimmunoassays Dissoziationskonstanten (K_D) zwischen 3 und 10 nM bestimmt (Boyer et al. 1999). Der Antikörper gegen das Car-

cinoembryonic Antigen (CEA), das auf kolorektalen Karzinomzellen überexprimiert ist, zeigt mit einer Dissoziationskonstante von 3,4 nM ebenfalls vergleichbare Affinitäten und, als mit Pseudomonas Exotoxin A gekoppeltes Immuntoxin, spezifische Zytotoxizität gegenüber einer CEA-positiven kolorektalen Zelllinie (Akamatsu et al. 1998). Die Affinitäten der hier getesteten mutationsspezifischen E-Cadherin Antikörper liegen somit für die Klone 7E6, 6H8 und 7H1 deutlich über spezifischen Antikörpern, die schon erfolgreich als Immuntoxin eingesetzt worden sind und stellen daher ideale Kandidaten für eine tumorspezifische Intervention dar.

Zusammenfassend kann eine nahezu einmalige Spezifität und ausgezeichnete Affinität der vier getesteten mutationsspezifischen Antikörper festgehalten werden.

Um das Bindungsverhalten der mutationsspezifischen Antikörper in ihrer monovalenten Form zu bestimmen, wurden Biacore Analysen mit F(ab) Fragmenten der Antikörper durchgeführt. Hier zeigten sich deutliche Unterschiede zwischen den beiden $\Delta 9$ E-Cadherin und den zwei $\Delta 8$ E-Cadherin spezifischen Antikörpern. Die $\Delta 9$ E-Cadherin spezifischen Binder 6H8 und 7E6 wiesen einen Verlust der Bindungsaffinität um etwa eine Zehnerpotenz im Vergleich zum intakten Antikörper auf. Die $\Delta 8$ E-Cadherin spezifischen F(ab) Fragmente zeigten stärkere Einbußen in ihrer Affinität, verglichen mit dem bivalenten Ausgangsantikörper. Das F(ab) Fragment des Antikörpers 7H1 fällt um vier Zehnerpotenzen von $K_D=3,5 * 10^{-11}$ auf $K_D=1 * 10^{-7}$ ab. Die Assoziation des F(ab) Fragmentes des Antikörpers 6D8 ist so schwach, dass keine Dissoziationskonstante bestimmt werden kann.

Auch für das F(ab) Fragment des Antikörpers K1 wurde ein Reduzierung der Dissoziationskonstante K_D von 8 nM (ganzer Antikörper) auf 100 nM F(ab) Fragment beschrieben (Brinkmann et al. 1997). Ebenso für den Antikörper B3, gerichtet gegen das LeY Antigen, wurde ein vergleichbarer Verlust der Bindungsstärke des F(ab) Fragmentes bestimmt (Bera und Pastan 1998). Ein Verlust an Affinität beim Übergang von der Bivalenz auf monovalente F(ab) Fragmente war somit zu erwarten. Warum die $\Delta 8$ E-Cadherin spezifischen Binder als F(ab) Fragmente einen wesentlich stärkeren Abfall der Bindungskinetik im Vergleich zu den $\Delta 9$ E-Cadherin Antikörpern zeigten, bleibt unklar.

Charakterisierung der verwendeten Zelllinien

Um für die Zytotoxizitätsassays Zellen verwenden zu können, die endogen die untersuchten E-Cadherin Mutationen aufweisen, wurde in der Literatur nach potentiellen Kandidaten gesucht. Für die humane Magenkarzinomzelllinie HSC45 wurde ein Verlust des Exons 9, hervorgerufen durch eine 10 Basenpaardeletion im Intron 9, beschrieben (Fukudome et al. 2000). Die Autoren wiesen den Verlust des Exons 9 des E-Cadherins, aufgrund dieser splice-site Mutation, auf cDNA Ebene nach. Diese Zelllinie stellt ein ausgezeichnetes Modellsystem dar, da sie, bedingt durch ihren Ursprung, dem späteren Ziel der Immuntoxine – nämlich disseminierte diffuse Magenkarzinomzellen- sehr nahe kommt.

Für die Mammakarzinomzelllinie MPE600 wurde E-Cadherin mRNA Expression beschrieben. Das Protein konnte mit dem E-Cadherin spezifischen Antikörper E9 im Western-Blot jedoch nicht nachgewiesen werden. Die Tatsache, dass auf DNA Ebene eine 21 Basenpaardeletion am Ende des Introns 8 einschließlich der ersten Base des Exons 9 (Splice site Akzeptorstelle) bestimmt wurde (Hiraguri et al. 1998), ließ auf einen potentiellen Verlust des Exons 9 des E-Cadherins bei dieser Zelllinie schließen. Eigene Sequenzanalysen bestätigten die 21 Basenpaardeletion in der genomischen DNA. Die Sequenzierung eines PCR-Produktes aus cDNA von Exon 7 bis Exon 10 zeigte den direkten Übergang von Exon 8 zu Exon 10 ohne eine Verschiebung des Proteinleserasters. Dieser Befund ist der zweite bisher bekannte Nachweis der Expression einer endogenen $\Delta 9$ E-Cadherin Mutante in einer Karzinomzelllinie. Mit dem $\Delta 9$ E-Cadherin spezifischen Antikörper 6H8 konnte dementsprechend die Expression des mutierten Proteins im Western-Blot gezeigt werden. Immunfluoreszenzen der MPE600 Zellen mit dem $\Delta 9$ E-Cadherin spezifischen Antikörper 7E6 zeigten starke, E-Cadherin-spezifische randständige Anfärbung. Es konnte gezeigt werden, dass der vermeintliche Verlust an E-Cadherin Expression durch den verwendeten Antikörper E9 erklärt werden kann. Immunfluoreszenzen und Western-Blots, durchgeführt mit diesem Antikörper, zeigten die Anfärbung von wild-typ E-Cadherin, $\Delta 9$ E-Cadherin wurde jedoch nicht angefärbt. Die Bindungsregion des Antikörpers E9 konnte somit auf

das Exon 9 des E-Cadherins eingegrenzt werden.

Um die verwendeten Zelllinien genauer zu charakterisieren, wurde eine Quantifizierung des membranständigen E-Cadherins durchgeführt. Hierbei wiesen die beiden endogenen $\Delta 9$ E-Cadherin exprimierenden Zellen MPE600 und HSC45 mit $2,9 * 10^5$ bzw. $2,7 * 10^5$ eine vergleichbare und sehr hohe Molekülanzahl auf ihrer Oberfläche auf. Ein Vergleich mit anderen tumorspezifischen Antigenen, gegen die erfolgreich Immuntoxine generiert und getestet wurden, legt nahe, dass das mutierte E-Cadherin, bezogen auf die Quantität der Expression, ein hervorragendes Zielmolekül für die Immuntherapie darstellt. So wurde ein Immuntoxin, gerichtet gegen CD30, überexprimiert bei der Hodgkin´s Krankheit, erfolgreich gegen Zellen getestet, die $5 * 10^4$ CD30 Moleküle pro Zelle aufwiesen (Rozemuller et al. 2001). Die spezifische Zytotoxizität eines disulfidstabilisierten Immuntoxins gegen CD22 positive Zellen aus Patienten mit chronischer lymphatischer Leukämie konnte ab einer Molekülzahl von etwa 350 CD22 Antigenen pro Zelle gezeigt werden (Kreitman et al. 2000a).

Für beide Transfektionssysteme (L929 Fibroblasten und MDA-MB-435 Mammakarzinomzellen, transfiziert mit wild-typ E-Cadherin, $\Delta 8$ E-Cadherin und $\Delta 9$ E-Cadherin) konnte ich insgesamt eine verringerte Anzahl an E-Cadherinmolekülen pro Zelle im Vergleich zu den endogen E-Cadherin exprimierenden Zellen feststellen ($3,5 - 10 * 10^4$ Moleküle für die L929 Transfektanten und $8,9 - 24 * 10^4$ Moleküle für die MDA-MB-435 Transfektanten). Es konnte gezeigt werden, dass in beiden Transfektionssystemen die wild-typ E-Cadherin Transfektanten die höchste Anzahl an Molekülen auf der Zelloberfläche aufwiesen. Die Spezifität der getesteten Immuntoxine ist daher nicht durch eine mögliche Überexpression der Deletionsmutanten, sondern durch die Mutationsspezifität der Bindungsregionen gegeben.

Für beide Zelllinien habe ich einen signifikanten Unterschied in der E-Cadherin Anzahl auf den Zellen zwischen einerseits mit wild-typ E-Cadherin oder $\Delta 9$ E-Cadherin transfizierten Zellen und andererseits den $\Delta 8$ E-Cadherin exprimierenden Zellen festgestellt. Eine Erklärung hierfür könnte eine alternative Prozessierung des $\Delta 8$ E-Cadherin Proteins oder ein

durch die Exon 8 Deletion induzierter Abbau sein. Western-Blot Analysen aus Proteinlysaten der L929 und MDA-MB-435 zeigten eine prominente E-Cadherin Abbaubande, die typischerweise bei den $\Delta 8$ E-Cadherin Transfektanten auftrat (Handschuh et al. 1999, siehe auch **Abbildung 33 C**). Eine Proteinsequenzierung dieser zweiten Bande konnte N-terminal keine Unterschiede zu wt E-Cadherin ermitteln. Möglicherweise kommt es, induziert durch den Exon 8 Verlust, zu einem partiellen Verlust der Transmembranregion auf Proteinebene und somit zur Anhäufung von zytosolischem $\Delta 8$ E-Cadherin.

Das Immuntoxin 6H8PE38QQR

Zur Beantwortung der Frage, ob die mutationsspezifischen Antikörper generell für die Verwendung als Immuntoxin geeignet sind, wurde zunächst versucht, den Antikörper 7E6 über eine chemische Kopplungsgruppe mit einer modifizierten Version des Pseudomonas Exotoxins A (PE38QQR) zu koppeln. Pseudomonas Exotoxin A wurde als Effektormolekül gewählt, da es in der Wirkungsweise bestens charakterisiert ist, und weite und erfolgreiche Verbreitung im Einsatz in Immuntoxinen findet. Zudem wurden von Pseudomonas Exotoxin A verschiedene Mutationsvarianten generiert, die das Toxin in seiner Rolle als Effektoranteil in Immuntoxinen immer wieder optimierten (Brinkmann und Pastan 1994). Gegen den zweiten möglichen Kandidaten, das ebenfalls sehr potente Diphtheria Toxin, sind viele Menschen immunisiert und besitzen daher neutralisierende Antikörper (Brinkmann 1996). Daher wurde die Verwendung des Pseudomonas Exotoxins A favorisiert.

Der Antikörper 7E6 konnte unerwarteterweise nicht über einen Iminothiolan / SMCC Linker gekoppelt werden, was vermutlich darauf zurückzuführen ist, dass in der Sekundärstruktur des Antikörpers die C-terminalen Lysinreste, die zur Kopplung benötigt werden, nicht zugänglich sind. Dieses Ergebnis steht im Widerspruch zur Literatur, in der sich keine Hinweise auf Antikörper finden, die sich mit dieser Methode nicht koppeln lassen. Jedoch werden zumeist Antikörper aus der Maus eingesetzt, der Effekt könnte somit einen Subtyp des Immunglobulins G der Ratte betreffen.

Alternativ konnte der zweite $\Delta 9$ E-Cadherin spezifische Antikörper 6H8 erfolgreich gekoppelt werden. In den in dieser Arbeit durchgeführten FACS Analysen zeigte sich, dass die Kopplung an das Toxin die Spezifität des Antikörpers nicht verminderte. Das chemisch generierte Immuntoxin 6H8-PE38QQR zeigte in den durchgeführten XTT-Assays nur schwache Zytotoxizität auf mit $\Delta 9$ E-Cadherin transfizierten L929 und endogen $\Delta 9$ E-Cadherin exprimierenden MPE600 Zellen (LD_{50} von 200 ng/ml bzw. > 2200 ng/ml). Im Gegensatz hierzu zeigte dasselbe Immuntoxin in Koloniebildungsassays auf mit $\Delta 9$ E-Cadherin transfizierten L929 Zellen eine verstärkte Zytotoxizität mit einer LD_{50} von etwa 10 ng/ml.

Die Diskrepanz der Ergebnisse in den zwei verschiedenen Assays könnte durch eine mögliche kompetitive Hemmung des Immuntotoxins durch lösliche, abgespaltene E-Cadherin Ektodomänen erklärt werden. Die konstitutive Abspaltung der Ektodomäne des E-Cadherins wurde erstmals durch die Entdeckung eines 80 kD großen E-Cadherin Fragments im Überstand von humanen Mammakarzinomzellen (MCF-7) gezeigt (Wheelock et al. 1987). Das 80 kD Fragment (sE-Cad) löste in den epithelialen Zellen eine partielle Auflösung der Zell-Zellkontakte aus, die durch Zugabe E-Cadherin spezifischer Antikörper neutralisiert werden konnte. Dieser parakrine Effekt des sE-Cad konnte durch synthetische E-Cadherin Peptide, die eine Histidin-Alanin-Valin (HAV) Sequenz enthalten, nachgeahmt werden. Es zeigte sich nach Zugabe eines HAV Peptides eine deutliche Auflösung epithelialer Strukturen, eine Inhibierung der Aggregation und eine Induktion der Invasion in der Zellkultur (Noe et al. 1999). Welche Proteasen für die endogene Abspaltung des sE-Cad verantwortlich sind, ist noch unklar. Jedoch wurde gezeigt, dass die Metalloproteasen Matrilysin und Stromelysin-1 sE-Cad von der Oberfläche von MDCKts.srcC12 Zellen abspalten können (Noe et al. 2001). Die Serinprotease Trypsin spaltet in Anwesenheit von Calcium ebenfalls ein extrazelluläres E-Cadherin Fragment ab (Takeichi 1991), welches jedoch etwas kleiner ist als endogenes sE-Cad (Noe et al. 2001). Erst kürzlich wurde berichtet, dass auch die Serinprotease Plasmin funktionales, d.h. E-Cadherin inhibierendes sE-Cad abspaltet (Ryniers et al. 2002).

sE-Cad konnte in Serum und Urin von Karzinompatienten nachgewiesen werden (Banks et al. 1995, Gofuku et al. 1998, Griffiths et al. 1996). In 81 Magenkarzinompatienten wurde eine Serum sE-Cad Konzentration von 4735 ± 2310 ng/ml festgestellt. Im Vergleich hierzu wiesen gesunde Kontrollprobanden mit 2515 ± 744 ng/ml eine signifikant geringere Serum sE-Cad Konzentration auf (Gofuku et al. 1998).

In pulse-chase Experimenten konnte wildtyp sE-Cadherin schon nach 30 Minuten im Überstand der Zellen nachgewiesen werden (Noe et al. 2001). In den von mir durchgeführten XTT Assays wurden 4000 Zellen in 100 μ l Medium ausgesät und vor Zugabe des Immuntoxins für zwei Tage inkubiert. Im Gegensatz hierzu wurden für den Koloniebildungsassay 1000 Zellen in 2000 μ l ausgesetzt. Das Immuntoxin wurde, nach erfolgter Adhärenz der Zellen, nach zwei Stunden zugegeben. Bei Annahme einer Abspaltung eines gewissen Prozentsatzes des mutierten Oberflächen E-Cadherins ohne Berücksichtigung der längeren Vorinkubation wäre die Konzentration des mutierten sE-Cadherins im Überstand der Zellen im XTT-Assay etwa 80 mal höher als im Zellkulturüberstand der Ansätze des Koloniebildungsassays. Das Immuntoxin könnte an das veränderte sE-Cadherin binden und somit in geringeren freien Konzentrationen zur Verfügung stehen. Im Falle der Kontrollansätze mit wt E-Cadherin transfizierten Zellen sollte sE-Cadherin nicht zur kompetitiven Hemmung des Immuntoxins führen, da in dieser Arbeit gezeigt wurde, dass das 6H8-PE38QQR nicht an wt E-Cadherin bindet. Ob mutiertes E-Cadherin tatsächlich genauso prozessiert wird wie wildtyp E-Cadherin ist jedoch nicht klar.

Mit einer LD_{50} von 10 ng/ml auf mit $\Delta 9$ E-Cadherin transfizierten L929 Zellen nimmt das 6H8-PE38QQR Immuntoxin im Vergleich zu anderen chemisch gekoppelten Immuntoxinen einen Platz im Mittelfeld ein. In der Literatur finden sich für chemisch gekoppelte Immuntoxine Werte zwischen 0,1 ng/ml bis zu 20 ng/ml (Essand und Pastan 1998, Lorimer et al. 1995). Jedoch wurde für die dort beschriebenen Immuntoxine diejenige Dosis bestimmt, bei der der Einbau von [3 H] markiertem Leucin während der Translation um 50 Prozent gehemmt wird. Da das Pseudomonas Exotoxin A direkt die Translation durch die irreversible Inaktivierung des Translations-Elongationsfaktors EF-2 hemmt, greift dieser Assay an

einem sehr frühen Zeitpunkt an. Eine quantitative Aussage über die eigentliche Zytotoxizität ist mit diesem Assay somit nicht möglich.

Generierung humaner mutationsspezifischer Antikörperfragmente (HuCal Screening)

Im Vorgriff auf eine mögliche klinische Anwendung E-Cadherin mutationsspezifischer Immuntoxine wurde nach einer Möglichkeit gesucht, deletionspezifische humane Antikörper zu generieren, da Antikörper aus der Maus oder der Ratte im Menschen die Produktion von anti-Maus bzw. anti-Ratte Immunglobulinen (HAMA bzw. HARA) induzieren können (Kreitman et al. 2001, White et al. 201). Zusätzlich zeigen sich auch neutralisierende Antikörper gegen das bakterielle *Pseudomonas Exotoxin A* (Kreitman et al. 2000b, Pastan 2003). Dieses zweite Problem könnte durch eine Maskierung des Toxinmoleküls umgangen werden. Es konnte gezeigt werden, dass durch Einführung einer Cysteinmutation und anschließender Derivatisierung mit fünf oder 20 kDa großem Polyethylen Glykol-Maleimid eine signifikante Verringerung der Immunantwort nach Immunisierung in der Maus erreicht wurde. Dieser positive Effekt der Polyglykosylierung des Toxins zeigte keine Auswirkung auf die spezifische Zytotoxizität des Immuntoxins im Vergleich mit dem nicht maskierten Ausgangsprodukt (Tsutsumi et al. 2000, Wang et al. 1993).

Verschiedene Möglichkeiten zur Humanisierung von Maus-Antikörpern konnten erfolgreich getestet werden (Lo 2004, Maeda et al. 1991, Queen et al. 1989, Riechmann et al. 1988a, Verhoeyen et al. 1988). Die HuCal Technologie (Human Combinatorial Antibody Libraries, HuCAL-Screening) stellt eine schnelle und einfache Möglichkeit dar, vollständig humane Antikörper aus synthetisch generierten Phagenbibliotheken zu generieren. Die Methode geht von der Beobachtung aus, dass in humanen Antikörpern 95 Prozent der Diversität durch sieben V_H und sieben V_L Keimbahnfamilien abgedeckt werden (Knappik et al. 2000). Für die insgesamt 14 Familien wurden Konsensussequenzen gebildet. In allen möglichen V_H und V_L Kombinationen ergeben sich 49 Mastersequenzen. Die CDR Regionen wurden durch flankierende Restriktionsschnittstellen ausgeschnitten und zurückligiert, so dass eine modular aufgebaute Bibliothek gebildet wurde. Weitere Diversität wird durch die

Tatsache gegeben, dass zusätzlich die CDR3 Region mittels Trinucleotiden randomisiert wurde.

Insgesamt konnten mit Hilfe der HuCal Phagen drei Binder durch Phage Display Technologie selektioniert werden, die im ELISA positiv auf mutiertes E-Cadherin oder mutationsspezifische Peptidsequenzen reagierten (Klon 2h3 und 2d4 gegen $\Delta 8$ E-Cadherin, Klon 10a4 gegen $\Delta 9$ E-Cadherin). In den von mir durchgeführten weiteren Tests (Western-Blots und FACS Analysen) zeigte jedoch keiner der Klone ein spezifisches Bindungsverhalten für die jeweilige Deletionsmutante. Vermutlich reicht die alleinige Hypervariabilität der CDR3 Region in den V_L und V_H Ketten nicht aus, um hochaffine Binder zu generieren, die nicht mit wild-typ E-Cadherin kreuzreagieren (wild-typ E-Cadherin diente als negative Selektion für die HuCal Phagen). Es muss betont werden, dass es sich bei den Deletionsmutanten um keine gewöhnlichen Antigene zur Immunisierung handelt. Ein wirklich spezifischer Antikörper entsteht nur, wenn der Hauptanteil der Bindung genau am Übergang von Exon 8 und Exon 10 für die $\Delta 9$ Mutante und am Übergang von Exon 7 und Exon 9 für die $\Delta 8$ Mutante besteht. Bindet der Antikörper in die eine oder andere Richtung verschoben, wird er mit wild-typ E-Cadherin kreuzreagieren.

In diesem Zusammenhang ist interessant, dass es wiederholt nicht gelang, E-Cadherin mutationsspezifische Antikörper durch Immunisierung von Mäusen zu erhalten (Elisabeth Kremmer, persönliche Mitteilung). Deshalb wurde auf die Ratte zur Immunisierung gewechselt.

Rekombinant hergestellte dsFv Konstrukte gegen mutiertes E-Cadherin

Um rekombinante Immuntoxine aus den monoklonalen Antikörpern herzustellen, mussten die variablen Regionen der vier leichten Ketten und vier schweren Ketten aus den jeweiligen Hybridomzellen kloniert werden. Während bis zum Jahr 2000 in der NCBI Nukleotidbank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?CMD=search&DB=nucleotide>) etwa 5400 Sequenzen für Maus-Antikörperketten zur Verfügung standen, war die Daten-

lage für Antikörpersequenzen aus der Ratte mit rund 180 Sequenzen wenig umfassend.

Orlandi et al. publizierte ein Set von 4 Primern für die Amplifikation von leichten Ketten und schweren Ketten des IgG aus der Maus, basierend auf einem Vergleich schon vorhandener Sequenzdaten (Orlandi et al. 1989). Zwei Publikationen zeigten die erfolgreiche Amplifikation von IgG Ketten aus der Ratte (Dubel et al. 1994, Kutemeier et al. 1992). Mittels dieser Primer konnte ich die variablen Ketten der Antikörper erfolgreich amplifizieren. Jedoch zeigten sich nach Sequenzvergleichen mit publizierten Antikörpersequenzen starke Variationen im 5' Bereich der Sequenzen (Framework 1). Daher wurden die variablen Sequenzen dieser Klone und der Klone 7E6 und 7H1 in einem zweiten Ansatz mittels der „Rapid amplification of cDNA ends“ (RACE) Methode kloniert. Diese Methode wurde erfolgreich für die Klonierung von variablen Immunglobulin Domänen aus Maus und Mensch eingesetzt (Doenecke et al. 1997, Ruberti et al. 1994). Der Vorteil der Methode liegt vor allem darin, dass kein spezifischer 5' Primer benötigt wird. Eine artifiziell eingeführte Sequenz, bedingt durch nicht hundertprozentige Homologie der 5' Primer, wird dadurch ausgeschlossen. Die spezifischen 3' Primer wurden aus veröffentlichten Sequenzen, am Beginn der konstanten Region der Antikörperketten, extrahiert (Kabat et al. 1991). Dies stellte wiederum sicher, dass auch die 3' Region der amplifizierten Ketten (Framework 4) keine artifiziellen Sequenzen aufweisen. Ein Vergleich der Sequenzen der variablen Ketten der Antikörper 6H8 und 6D8 aus der ersten Klonierung und der RACE Klonierung zeigte Variationen nur im Bereich des 5' Primers. Es kann festgehalten werden, dass die RACE Methode eine einfache und zuverlässige Methode darstellt, Immunglobulinketten aus Hybridomen zu amplifizieren. Alle acht amplifizierten Immunglobulin Ketten zeigten im Sequenzvergleich mit schon publizierten Daten starke Homologien. Auffällig waren lediglich die CDR3 Regionen der schweren Kette der beiden $\Delta 9$ E-Cadherin spezifischen Antikörpers 7E6 und 6H8. Diese wiesen im Vergleich zu veröffentlichten Sequenzen verkürzte Sequenzen auf. Während bei dem Klon 6H8 im Abgleich mit Konsensussequenzen eine Aminosäure deletiert ist, sind in der CDR3 Region des Antikörpers fünf Aminosäuren deletiert. Die Tatsache, dass die gegen die jeweilige Deletionsmutante gerichteten Klonpaare starke Homologien

aufwiesen, wurde als erster Hinweis gewertet, dass funktionale variable Regionen amplifiziert wurden. Die Auswertung der Sequenzen mittels Clusteranalyse (*Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean, UPGMA*, <http://www.ebi.ac.uk/clustalw/index.html?>), basierend auf der Homologie der Aminosäuresequenzen, zeigte Unterschiede zwischen den $\Delta 8$ E-Cadherin und den $\Delta 9$ E-Cadherin spezifischen Klonen. Bei den $\Delta 8$ E-Cadherin spezifischen Klonen sind sehr starke Homologien in den schweren Ketten zu erkennen, während die leichten Ketten starke Unterschiede aufweisen (Distanz von 15,9 für die schweren Ketten und 47,1 für die leichten Ketten). Bei den $\Delta 9$ E-Cadherin spezifischen Klonen zeigte die leichten Ketten die wesentlich stärkere Homologie (Distanz von 13,5 für die leichten Ketten und 55,5 für die schweren Ketten). Dies ist ein Hinweis darauf, dass die Spezifität gegen das $\Delta 8$ Epitop hauptsächlich durch die schweren Ketten und die Spezifität gegen das $\Delta 9$ Epitop durch die leichten Ketten vermittelt wird. Die leichten Ketten der Klone 6H8 und 6D8 wurden zur zusätzlichen Verifizierung der Sequenzen auf Proteinebene sequenziert. Die sequenzierten elf N-terminalen Aminosäuren zeigten hundertprozentige Homologie zu den durch die RACE-Klonierung erhaltenen Sequenzen und bestätigten zudem die Richtigkeit der klonierten Sequenzen.

Die zwei heute verwendeten Formate für rekombinante Immuntoxine sind auf der einen Seite single chain Immuntoxine (scIT), bei denen die leichte- und schwere Kette über einen Peptidlinker verbunden werden, und auf der anderen Seite disulfidstabilisierte Immuntoxine (dsFv), bei denen die leichte und die schwere Kette über eine Cysteinbrücke kovalent zusammengeführt werden. Es spielt hierbei keine Rolle, ob das Toxin an die leichte oder an die schwere Kette fusioniert wird (Reiter und Pastan 1996). Disulfidstabilisierte Immuntoxine zeigen *in vitro* und *in vivo* starke Vorteile gegenüber ihrer scIT Varianten. Dies ist im Hinblick auf eine zukünftige Anwendung an Patienten von Bedeutung, da nachgewiesen wurde, dass die Halbwertszeit (gemessen an der biologischen Aktivität der Immuntoxine) für dsFv Immuntoxine, inkubiert in humanem Serum bei 37°C, drastisch erhöht sein kann. Für das disulfidstabilisierte Immuntoxin B3(dsFv) konnte eine biologische Halbwertszeit von mehr als 14 Tagen im Vergleich zu eineinhalb bis zwei Stunden für das single chain

Analogon bestimmt werden (Reiter et al. 1994c). Die Bindungseigenschaften und die zytotoxische Wirkung vieler dsFv Immuntoxine sind vergleichbar oder besser als die ihrer single chain Varianten. **Tabelle 8** zeigt die Affinität und die inhibitorische Dosis 50 (bezogen auf die Hemmung der Proteinsynthese) für verschiedene Immuntoxine der beiden diskutierten

Antikörper	Spezifität	dsFv / sclT	Aktivität in Zytotoxizitätsassys (Inhibierung der Proteinbiosynthese um 50 Prozent) [ng/ml]	Affinität (nM) K _D
B1	Lewis ^Y	sclT	0,25	1000
		dsFv	0,40	4000
Anti-Tac	Il2-Rezeptor	sclT	0,03	1,4
		dsFv	0,013	1,1
e23	erbB2	sclT	0,3	40
		dsFv	0,06	10
55.1	Mucin Kohlenhydrat	sclT	0,5	120
		dsFv	0,3	80
HB21	Transferin Rezeptor	sclT	0,0025	20-25
		dsFv	0,0035	20-35
Y10	Mutierter EGFR	sclT	800-1000	450
		dsFv	20-80	150
RFB4	CD22	sclT	10	90
		dsFv	10	10
7E6	Δ9 E-Cadherin	dsFv	7 ⊗ 1 ⊕	1,6
6H8	Δ9 E-Cadherin	dsFv	-	8,2
6D8	Δ8 E-Cadherin	dsFv	-	-
7H1 schwere Kette und 6D8 leichte Kette	Δ8 E-Cadherin	dsFv	200 ⊗	*

Tabelle 8: Vergleich der Bindungseigenschaften und Zytotoxizität verschiedener disulfidstabilisierter Immuntoxine (dsFv) mit ihren single chain Analoga (sclT) und den in dieser Arbeit generierten dsFvs.

⊗ bestimmt mittels XTT Assay mit L929 Zellen. ⊕ bestimmt mittels Koloniebildungs-Assay mit L929 Zellen.

- : nicht nachweisbar. * : Angleichung an Langmuir Modell wegen zu schwacher Interaktion nicht möglich.

Verändert nach (Reiter et al. 1996).

Immuntoxinformaten. Nur für den Antikörper B1 erweist sich die single chain Variante in der Affinität und der Aktivität überlegen. Die anderen Antikörper zeigen entweder gleichbleibende Werte (Antikörper HB21 und RFB4) oder stark verbesserte Werte für die dsFv Variante im Vergleich zu dem single chain Analogon (Antikörper Anti-Tac, e23, 55.1 und Y10).

Auch werden einige dsFv Immuntoxine bereits in klinischen Versuchsreihen mit ersten Erfolgen an Patienten getestet (Pastan 2003).

Aufgrund des Vorteils der wesentlich erhöhten Stabilität unter *in vitro* Bedingungen und der für die meisten dsFv gezeigten erhöhten Zytotoxizität, wurde das disulfidstabilisierte Format verwendet. Als Expressionssystem für die disulfidstabilisierten Konstrukte wurde die Überexpression in *E. coli*/BL21(λ DE3) gewählt (Studier und Moffatt 1986). Das Protein akkumuliert in diesem System in *Inclusion Bodies* und muss daher renaturiert werden (Buchner et al. 1992). Andere Autoren beschreiben die erfolgreiche Expression verschiedener Antikörperfragmente durch Sekretion in *E. coli* in nativer und vollständig funktionaler Form (Better et al. 1988, Skerra und Pluckthun 1988). Dieses System ist jedoch nicht mit jeder Sequenz möglich. Aufwändige Anpassungen der Expression durch Veränderung verschiedener Parameter, wie zum Beispiel der Erniedrigung der Temperatur, können notwendig sein (Glockshuber et al. 1990). Die Überexpression in *Inclusion Bodies* kann dagegen standardisiert vorgenommen werden. Ein weiterer Vorteil der Überexpression liegt in der Tatsache, dass durch die einfache Aufreinigung der *Inclusion-Body Pellets* schon eine Anreicherung des exprimierten Proteins stattfindet. In den im Rahmen dieser Arbeit erzeugten Ansätzen zeigte sich eine Reinheit der exprimierten Zielmoleküle von etwa 90 % in den *Inclusion-Body* Präparationen.

Das Expressionsplasmid 6H8hnewexp, das für die durch die RACE-Klonierung erhaltene 5' korrigierte Sequenz der schweren Kette des Klonen 6H8 kodiert, konnte nicht exprimiert werden. Eine Sequenzanalyse bestätigte jedoch die Korrektheit der Sequenz. Der Grund für das Scheitern der Expression kann in einer möglichen Toxizität des Konstruktes in den Bakterien liegen. Dieser Befund konnte für einige Immuntoxinkonstrukte beobachtet werden (Ira Pastan, persönliche Mitteilung).

Die renaturierten disulfidstabilisierten Immuntoxine wurden mittels Ionenaustausch Chromatographie (Q-Sepharose und MonoQ Säule) und Gelfiltration aufgereinigt (Chaudhary et al. 1989). In der Literatur werden Ausbeuten aus 100 mg Protein im Renaturierungsansatz zwischen 9,8 mg und 20,5 mg beschrieben (Brinkmann et al. 1993, Reiter et al.

1994b). Die Ausbeuten der hier dargestellten Konstrukte variierten stark und sind im Vergleich zu den Literaturwerten geringer. So konnten für das 7E6dsFvKDEL nur etwa 2 mg Protein aufgereinigt werden, während die Ausbeute für das 6H8dsFv bei über 10 mg lag. Dies ist vermutlich auf die Tatsache zurückzuführen, dass für die Aufreinigung der Konstrukte 7E6dsFv, 7E6dsFvKDEL und 7HchimdsFv keine FPLC bei vier Grad Celsius zur Verfügung stand und es daher zu einer Aggregation des Proteins während des Aufreinigungsprozesses gekommen ist. Es konnte kein vollständiges dsFv Immuntoxin aus den leichten und schweren Ketten des Antikörperklones 7H1 gewonnen werden. Das Proteinprodukt der leichten Kette dieses Klonen bildete beim Auflösen des *Inclusion-Body* Pellets ein gelartige Struktur aus. Während des Renaturierungsprozesses zeigte die Proteinlösung starke Ausflockung, was darauf hinweist, dass das Protein nicht in Lösung geht.

In der Literatur finden sich Hinweise, dass die leichten Ketten von Antikörpern aus Maus und Mensch, amyloide Fibrillen, ausgelöst durch Veränderungen der Sekundärstruktur und einer sich daraus ergebenden Selbst-Aggregation, ausbilden können (Dealwis und Wall 2004). Martsev et al. zeigten die Ausbildung solcher amyloiden Fibrillen einer rekombinanten variablen Region einer leichten Kette eines Antikörpers der Maus bei niedrigem pH Wert (Martsev et al. 2002).

Insgesamt konnten im Rahmen dieser Arbeit fünf verschiedene disulfidstabilisierte Immuntoxinstrukturen (6H8dsFv, 6D8dsFv, 7E6dsFv, 7E6dsFvKDEL und 7H1chimdsFv) aufgereinigt werden (siehe **Tabelle 8**). Außer dem 6D8dsFv Konstrukt zeigten alle rekombinanten Konstrukte ausgezeichnete Spezifität, die vergleichbar mit den monoklonalen Ausgangsantikörpern war, ermittelt durch FACS Analysen, Western-Blots und Biacore Analysen. Die mangelnde Spezifität des Immuntoxins 6D8dsFv Konstruktes kann vermutlich darauf zurückgeführt werden, dass die Ausrichtung der CDRs bei der Ausbildung der Disulfidbrücken zwischen der leichten und der schweren Ketten so verändert wird, dass die Bindung an das Antigen nicht mehr möglich ist. Alternative Aminosäurepositionen für die Einführung der Cysteinmutation, wie zum Beispiel V_H105 und V_L43 anstatt V_H44 und V_L100 könnten hier eine Verbesserung bringen (Jung et al. 1994). Interessant ist die Tatsache,

dass das chimäre Konstrukt, bestehend aus der leichten Kette des Antiköpers 6D8 und der schweren Kette des Antiköpers 7H1 (7H1dsFvchim), spezifische Bindungseigenschaften aufweist.

Die beiden $\Delta 9$ E-Cadherin spezifischen rekombinanten disulfidstabilisierten Immuntoxine 7E6dsFvkd1 und 6H8dsFv zeigten in der Kinetikbestimmung mittels Biacore mit einem K_D von $1,6 \cdot 10^{-9}$ bzw. $8,2 \cdot 10^{-9}$ sehr gute Affinitäten. Für diese Klone zeigt sich eine erwartete Verminderung der Affinität um etwa eine Zehnerpotenz. Eine derartige Abnahme beim Übergang von der Bivalenz auf die Monovalenz ist für viele Antikörperkonstrukte bestimmt worden (Bera und Pastan 1998, Brinkmann et al. 1997).

Im Gegensatz hierzu wurde für das 6D8dsFv in den Biacore Analysen keine Assoziation an $\Delta 8$ E-Cadherin festgestellt. Das 7H1dsFvchim Konstrukt zeigte Assoziation, jedoch so schwach, dass keine Angleichung an eine Kinetik durchgeführt werden konnte. Dieses Ergebnis verhält sich analog zu den Bindungskinetiken für die F(ab)-Fragmente der monoklonalen Antikörper. Auch hier zeigten die $\Delta 8$ E-Cadherin spezifischen Binder einen rapiden Abfall der Bindungsstärke beim Übergang zur Monovalenz. Es stellt sich daher die Frage, ob die Verwendung von monovalenten Konstrukten für die $\Delta 8$ E-Cadherin spezifischen Binder überhaupt erfolgreich sein kann. Möglicherweise ist dies, bedingt durch die Struktur des Antigens und der daraus selektionierten Antikörper, gar nicht möglich. Es ist vorstellbar, dass die Bindung der bivalenten Antikörper entweder nur über die leichte Kette oder nur über die schwere Kette vermittelt wird, und dementsprechend zwei Antigene zur Bindung benötigt werden. Eine Möglichkeit dies festzustellen ist die Generierung eines bivalenten disulfidstabilisierten Immuntoxins. Bera et al. konnten am Beispiel eines bivalenten dsFv Konstruktes gegen erbB2 zeigen, dass dieses Format stabil und funktional hergestellt werden kann (Bera et al. 1998). In diesem speziellen Fall zeigte sich eine etwa dreifache Erhöhung der Affinität und eine fast zehnfach verstärkte Zytotoxizität für das bivalente Konstrukt im Vergleich zu dem monovalenten dsFv.

Zwei der disulfidstabilisierten Immuntoxine zeigten in der Zellkultur spezifische Zytotoxizität gegen die jeweilige Deletionsmutante, das 7E6dsFvkd1 und das 7H1chimdsFv.

Für das 7H1 chimdsFv konnte in XTT-Assay nur eine schwache Zytotoxizität festgestellt werden. Die LD₅₀ wird für dieses Konstrukt erst bei etwa 200 ng/ml erreicht und eine vollständige Inhibierung der Zellen konnte auch bei der sehr hohen Konzentration von 1 µg/ml nicht erreicht werden. Dennoch zeigte es ausgesprochen gute Spezifität. Bei der maximalen Dosis von 1 µg/ml werden mehr als 60 % der Δ8 E-Cadherin positiven Zellen abgetötet, während über 90 % der wild-typ E-Cadherin exprimierende Zellen noch vital sind. Es konnte gezeigt werden, dass es prinzipiell möglich ist, auch gegen die Δ8 E-Cadherin Deletionsmutante ein funktionales Immuntoxin herzustellen, das jedoch im Vergleich zu anderen rekombinanten Immuntoxinen aus der Literatur in der Wirkungsleistung abfällt. Da dieses Immuntoxin aus der leichten und schweren Kette zweier verschiedener Klone zusammengesetzt wurde (s. o.) , ist die nur schwache Wirkung nicht überraschend.

Um ein Δ8 E-Cadherin spezifisches Immuntoxin mit höherer Aktivität zu erhalten, bietet sich die Phage Display Methode zur Erhöhung der Affinität des Konstruktes an (Chowdhury und Pastan 1999, Plückthun 1994). Diese Methode wurde ursprünglich für single chain Konstrukte eingesetzt, es konnte jedoch demonstriert werden, dass diese Methode auch zur Selektion verbesserter dsFv Konstrukte verwendet werden kann (Brinkmann et al. 1995).

Das rekombinante Immuntoxin 7E6dsFvkdcl, gerichtet gegen die Exon-9 Deletion des E-Cadherins, zeigte in den Assays mit L929 Zellen ausgezeichnete Zytotoxizität. In den Koloniebildungsassays mit L929 Zellen wird die LD₅₀ bei etwa 1 ng/ml erreicht. Bei 10 ng/ml sind in den Δ9 E-Cadherin Ansätzen kaum mehr Kolonien zu zählen, während die Koloniezahl in den wild-typ E-Cadherin Ansätzen im Vergleich zu Ansätzen ohne Immuntoxin nicht reduziert ist. Ein Vergleich dieser Wirkungskonzentrationen mit Literaturwerten ist schwierig, da üblicherweise der Einbau von radioaktivem Tritium während der Proteinbiosynthese als Assay verwendet wird (Reiter und Pastan 1996). Üblicherweise bewegen sich in der Literatur die Dosen, bei denen der Einbau des Tritium markierten Leucins um 50 Prozent reduziert ist, im Bereich von 0,015 ng/ml bis 9 ng/ml (Reiter et al. 1994b).

Die Spezifität des 7E6dsFvkdcl konnte durch Inhibierungsexperimente klar bestätigt wer-

den. Es zeigte sich eine konzentrationsabhängige Zunahme an Kolonien bei Erhöhung der Konzentration des Antikörpers 7E6 in den Ansätzen mit dem 7E6dsFvkdcl Konstrukt. Ebenso konnte die Zugabe von rekombinantem $\Delta 9$ E-Cadherin die Toxinwirkung des Konstruktes um etwa 50 Prozent hemmen. Das Problem von möglicherweise abgespaltenen E-Cadherin Fragmenten im Überstand der Testzellen oder aber auch im Serum von Patienten wurde bereits diskutiert. In den Inhibierungsversuchen zeigte sich eine Zunahme der zytotoxischen Wirkung des Immuntoxins bei zusätzlicher Zugabe von rekombinantem wild-typ E-Cadherin. Möglicherweise dimerisiert das rekombinante wild-typ E-Cadherin mit dem abgespaltenenen $\Delta 9$ E-Cadherin im Zellkulturüberstand und maskiert somit die Bindungsstelle des freien $\Delta 9$ E-Cadherins und verhindert somit die Blockierung des Immuntoxins. Die gemeinsame Injektion von deletionsspezifischem Immuntoxin und rekombinantem wild-typ E-Cadherin stellt eine interessante Option für zukünftige Experimente in der Maus dar. Im Vergleich mit den transfizierten L929 Zellen zeigte das 7E6dsFvkdcl in den MDA-MB435S Transfektanten und in den endogenen $\Delta 9$ E-Cadherin exprimierenden Zellen MPE600 und HSC45-M2 eine verminderte Zytotoxizität (LD_{50} von 200 ng/ml für die MDA-MB-435S und MPE600 Zellen, 100 ng/ml für die HSC45-M2 Zellen). Diese Erniedrigung der Zytotoxizität kann durch eine verringerte Expression der Protease Furin in diesen Zellen bedingt sein. In der Literatur ist beschrieben, dass die Spaltung des Pseudomonas Exotoxins A durch Furin ein notwendiger und limitierender Schritt für die Wirkung des Toxins darstellt (Chiron et al. 1997). Eine Möglichkeit die Wirkung des Immuntoxins auf Zellen zu verstärken, die eine verminderte Expression der Protease Furin zeigen, ist die Verwendung einer Pseudomonas Exotoxin A Deletionsmutante (PE35 bzw. PE33), die für ihre zytotoxische Aktivität keine proteolytische Spaltung benötigt (Kuan und Pastan 1996a, Kuan und Pastan 1996b). Eine Umklonierung der variablen Regionen des 7E6 Antikörpers in dieses furin-unabhängige System stellt eine relativ einfache mögliche Verbesserung des 7E6dsFvkdcl Immuntoxins dar.

Ein weiterer limitierender Faktor für die Wirkung des Pseudomonas Exotoxins A stellt die Translokation des Toxins aus dem Endoplasmatischen Retikulum in das Zytosol der Zelle

dar (Hudson und Neville 1987). In einer weiteren PE Deletionsmutante, in der acht Aminosäuren der Domäne II deletiert sind (PE-delF), zeigte sich eine Verstärkung der Translokationseffizienz um 60 Prozent und eine daraus resultierende sechsfache Erhöhung der Zytotoxizität (Taupiac et al. 1999). Auch dieses System stellt eine Möglichkeit zur Verbesserung der Zytotoxizität des Immuntoxins in den endogen $\Delta 9$ E-Cadherin exprimierenden Zellen dar.

Die Langzeitbeobachtungen unter dem Laser Scanning Mikroskop konnten die Spezifität des 7E6dsFvkdcl Immuntoxins eindrucksvoll bestätigen. Keine der beobachteten markierten wild-typ E-Cadherin exprimierenden Zellen zeigte morphologische Zeichen eines Zelltodes. Sondern es teilten sich sogar fünf von zwölf wild-typ E-Cadherin exprimierenden Zellen in dem Beobachtungszeitraum. Dagegen sterben mehr als 80 % der $\Delta 9$ E-Cadherin positiven Zellen. Die morphologischen Veränderungen während des Zelltodes weisen auf Apoptose als Mechanismus des toxinvermittelten Zelltodes hin. Die Zellen zeigen ein Schrumpfen des Zytoplasmas, Einschnürungen der Zytoplasmamembran und die Bildung apoptotischer Vesikel auf. Apoptose als Schicksal Immuntoxin behandelte Zellen ist in der Literatur für viele Systeme beschrieben (Decker et al. 2004, Keppler-Hafkemeyer et al. 1998, Keppler-Hafkemeyer et al. 2000, Komatsu et al. 1998).

In dieser Arbeit habe ich erstmalig funktionsfähige mutationsspezifische E-Cadherin Immuntoxine generiert und charakterisiert. Durch die aufgezeigten Optimierungsvorschläge lassen sich die Konstrukte soweit verbessern, dass sie im Mausmodell getestet werden können, bevor sie schließlich bei Magenkarzinompatienten eingesetzt werden.

6 Abkürzungen

α	Anti-
$\Delta 8$ E-Cad	Exon 8 deletiertes E-Cadherin
$\Delta 9$ E-Cad	Exon 9 deletiertes E-Cadherin
Abb	Abbildung
ad	Auffüllen auf
Ak	Antikörper
AS	Aminosäure
bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin
dATP	Desoxyadenosintriphosphat
dCTP	Desoxycytidintriphosphat
dGTP	Desoxyguanosintriphosphat
DMEM	Dulbeccos Modified Eagle Medium
DNA	Desoxyribonukleinsäure
Dom	Domäne
dsFv-IT	Disulfidstabilisiertes Immuntoxin
DTT	Dithiothreitol
dTTP	Desoxythymidintriphosphat
E. coli	<i>Escherichia coli</i>
EC	Extracelluläre Domäne
ECL	Enhanced Chemiluminescence
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
engl	Englisch
ER	Endoplasmatisches Reticulum
FITC	Fluorescein Isothio-Cyanat-Dextran
GlcNAc	N-Acetyl-Glucosamin
HAMA	Human anti Maus Antikörper
HARA	Human anti Ratte Antikörper
HEPES	N-(2-Hydroxyethyl)Piperazin-N'-(2-Ethansulfonsäure)
HRP	Meerrettich-Peroxidase
HuCAL	Engl.: Human Combinatorial Antibody Library
IT	Immuntoxin (Toxin kovalent gekoppelt an Antikörper)
Ka	Assoziationskonstante
kb	Kilobasenpaare
Kd	Dissoziationskonstante
KD	Gleichgewichtskonstante
kDa	10 ³ Dalton, Molekulargewicht von Proteinen
LD ₅₀	Konzentration, bei der das Zellwachstum um 50 Prozent gehemmt ist
mAk	Monoklonaler Antikörper
MEM	Minimum Essential Medium
M-MLV	Moloney Murine Leukemia Virus
NTA	Nitrilotriessigsäure
OD	Optische Dichte
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	Phosphat-Buffered-Saline
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PE	Pseudomonas Exotoxin A
PE(38)	Pseudomonas Exotoxin A (38 kDa)

PE(40)	Pseudomonas Exotoxin A (40 kDa)
PEG	Polyethylenglycol
PenStrep	Penicillin – Streptomycin – Glycin
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
QIIF	Quantitative indirekte Immunfluoreszenz
RACE	Rapid Amplification of cDNA-Ends
RNA	Ribonukleinsäure
Sarkosyl	N-Lauroylsarkosin
scFv-IT	Single-chain Immuntoxin
SDS	Natriumdodecylsulfat
SPR	Surface Plasmon Resonance
Tab.	Tabelle
TCA	Trichloressigsäure
TM	Transmembrandomäne
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
Triton X-100	t-Octylphenoxypropylpolyoxyethanol
Tween 20	Polyoxyethylen-Sorbitan-Monolaurat
w/v	Gewicht pro Volumen
wt E-Cad	wild-typ = nicht mutiertes E-Cadherin
X-Gal	5-Bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-galactopyranosid

Aminosäuren wurden nach dem Einbuchstaben-Code bezeichnet. Ausnahme His: Histidin, Cys: Cystein.

Gewichts- und andere Einheiten wurden nach dem internationalen SI-System benannt.

7 Literatur

- Akamatsu, Y., J. C. Murphy, K. F. Nolan, P. Thomas, R. J. Kreitman, S. O. Leung, R. P. Junghans. 1998. A single-chain immunotoxin against carcinoembryonic antigen that suppresses growth of colorectal carcinoma cells. *Clin Cancer Res* 4: 2825-32.
- Allen, T. M. 2002. Ligand-targeted therapeutics in anticancer therapy. 2: 750-63.
- Alley, M. C., D. A. Scudiero, A. Monks, M. L. Hursey, M. J. Czerwinski, D. L. Fine, B. J. Abbott, J. G. Mayo, R. H. Shoemaker, M. R. Boyd. 1988. Feasibility of drug screening with panels of human tumor cell lines using a microculture tetrazolium assay. *Cancer Res* 48: 589-601.
- Allured, V. S., R. J. Collier, S. F. Carroll, D. B. McKay. 1986. Structure of exotoxin A of *Pseudomonas aeruginosa* at 3.0-Ångstrom resolution. *Proc Natl Acad Sci USA* 83: 1320-4.
- Altschul, S. F., W. Gish, W. Miller, E. W. Myers, D. J. Lipman. 1990. Basic local alignment search tool. *J Mol Biol* 215: 403-10.
- Banks, R. E., W. H. Porter, P. Whelan, P. H. Smith, P. J. Selby. 1995. Soluble forms of the adhesion molecule E-cadherin in urine. *J Clin Pathol* 48: 179-80.
- Battle, E., E. Sancho, C. Franci, D. Dominguez, M. Monfar, J. Baulida, A. Garcia De Herreros. 2000. The transcription factor snail is a repressor of E-cadherin gene expression in epithelial tumour cells. *Nat Cell Biol* 2: 84-9.
- Batra, J. K., Y. Jinno, V. K. Chaudhary, T. Kondo, M. C. Willingham, D. J. FitzGerald, I. Pastan. 1989. Antitumor activity in mice of an immunotoxin made with anti-transferrin receptor and a recombinant form of *Pseudomonas* exotoxin. *Proc Natl Acad Sci USA* 86: 8545-9.
- Becker, K. F., M. J. Atkinson, U. Reich, I. Becker, H. Nekarda, J. R. Siewert, H. Hofler. 1994. E-cadherin gene mutations provide clues to diffuse type gastric carcinomas. *Cancer Res* 54: 3845-52.
- Becker, K. F., M. J. Atkinson, U. Reich, H. H. Huang, H. Nekarda, J. R. Siewert, H. Hofler. 1993. Exon skipping in the E-cadherin gene transcript in metastatic human gastric carcinomas. *Hum Mol Genet* 2: 803-4.
- Becker, K. F., E. Kremmer, M. Eulitz, I. Becker, G. Handschuh, C. Schuhmacher, W. Muller, H. E. Gabbert, A. Ochiai, S. Hirohashi, H. Hofler. 1999. Analysis of E-cadherin in diffuse-type gastric cancer using a mutation-specific monoclonal antibody. *Am J Pathol* 155: 1803-9.
- Becker, K. F., E. Kremmer, M. Eulitz, S. Schulz, J. Mages, G. Handschuh, M. J. Wheelock, A. M. Cleton-Jansen, H. Hofler, I. Becker. 2002. Functional allelic loss detected at the protein level in archival human tumours using allele-specific E-cadherin monoclonal antibodies. *J Pathol* 197: 567-74.
- Benhar, I. und I. Pastan. 1995. Characterization of B1(Fv)PE38 B1(dsFv)PE38: single-chain and disulfide-stabilized Fv immunotoxins with increased activity that cause complete remissions of established human carcinoma xenografts in nude mice. *Clin Cancer Res* 1: 1023-9.
- Bera, T. K., M. Onda, U. Brinkmann, I. Pastan. 1998. A bivalent disulfide-stabilized Fv with improved antigen binding to erbB2. *J Mol Biol* 281: 475-83.

- Bera, T. K. und I. Pastan. 1998. Comparison of recombinant immunotoxins against LeY antigen expressing tumor cells: influence of affinity, size, and stability. *Bioconjug Chem* 9: 736-43.
- Bera, T. K., J. Viner, E. Brinkmann, I. Pastan. 1999. Pharmacokinetics and antitumor activity of a bivalent disulfide-stabilized Fv immunotoxin with improved antigen binding to erbB2. *Cancer Res* 59: 4018-22.
- Berx, G., K. F. Becker, H. Hofler, F. van Roy. 1998. Mutations of the human E-cadherin (CDH1) gene. *Hum Mutat* 12: 226-37.
- Berx, G., K. Staes, J. van Hengel, F. Molemans, M. J. Bussemakers, A. van Bokhoven, F. van Roy. 1995. Cloning and characterization of the human invasion suppressor gene E-cadherin (CDH1). *Genomics* 26: 281-9.
- Better, M., C. P. Chang, R. R. Robinson, A. H. Horwitz. 1988. Escherichia coli secretion of an active chimeric antibody fragment. *Science* 240: 1041-3.
- Bier, H., T. Hoffmann, I. Haas, A. van Lierop. 1998. Anti-(epidermal growth factor) receptor monoclonal antibodies for the induction of antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity against squamous cell carcinoma lines of the head and neck. *Cancer Immunol Immunother* : 46: 167-73.
- Birchmeier, W. und J. Behrens. 1994. Cadherin expression in carcinomas: role in the formation of cell junctions and the prevention of invasiveness. *Biochim Biophys Acta* 1198: 11-26.
- Blakey, D. C., G. J. Watson, P. P. Knowles, P. E. Thorpe. 1987. Effect of chemical deglycosylation of ricin A chain on the in vivo fate and cytotoxic activity of an immunotoxin composed of ricin A chain and anti-Thy 1.1 antibody. *Cancer Res* 47: 947-52.
- Boggon, T. J., J. Murray, S. Chappuis-Flament, E. Wong, B. M. Gumbiner, L. Shapiro. 2002. C-cadherin ectodomain structure and implications for cell adhesion mechanisms. *Science* 296: 1308-13.
- Borgstrom, P., M. A. Bourdon, K. J. Hillan, P. Sriramarao, N. Ferrara. 1998. Neutralizing anti-vascular endothelial growth factor antibody completely inhibits angiogenesis and growth of human prostate carcinoma micro tumors in vivo. *The Prostate* 35: 1-10.
- Bourrie, B. J., P. Casellas, H. E. Blythman, F. K. Jansen. 1986. Study of the plasma clearance of antibody-ricin-A-chain immunotoxins. Evidence for specific recognition sites on the A chain that mediate rapid clearance of the immunotoxin. *Eur J Biochem* 155: 1-10.
- Boyer, C. M., L. Pusztai, J. R. Wiener, F. J. Xu, G. S. Dean, B. S. Bast, K. C. O'Briant, M. Greenwald, K. A. DeSombre, R. C. Bast, Jr. 1999. Relative cytotoxic activity of immunotoxins reactive with different epitopes on the extracellular domain of the c-erbB-2 (HER-2/neu) gene product p185. *Int J Cancer* 82: 525-31.
- Bradford, M. M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72: 248-54.
- Brinkmann, U. 1996. Recombinant immunotoxins: protein engineering for cancer therapy. *Mol Med Today* 2: 439-46.
- Brinkmann, U., P. S. Chowdhury, D. M. Roscoe, I. Pastan. 1995. Phage display of disulfide-stabilized Fv fragments. *J Immunol Methods* 182: 41-50.
- Brinkmann, U. und I. Pastan. 1994. Immunotoxins against cancer. *Biochim Biophys Acta* 1198: 27-45.
- Brinkmann, U., Y. Reiter, S. H. Jung, B. Lee, I. Pastan. 1993. A recombinant immunotoxin containing a disulfide-stabilized Fv

- fragment. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90: 7538-42.
- Brinkmann, U., K. Webber, A. Di Carlo, R. Beers, P. Chowdhury, K. Chang, V. Chaudhary, M. Gallo, I. Pastan. 1997. Cloning and expression of the recombinant FAb fragment of monoclonal antibody K1 that reacts with mesothelin present on mesotheliomas and ovarian cancers. *Int J Cancer* 71: 638-44.
- Buchner, J., I. Pastan, U. Brinkmann. 1992. A method for increasing the yield of properly folded recombinant fusion proteins: single-chain immunotoxins from renaturation of bacterial inclusion bodies. *Anal Biochem* 205: 263-70.
- Cano, A., M. A. Perez_Moreno, I. Rodrigo, A. Locascio, M. J. Blanco, M. G. del_Barrio, F. Portillo, M. A. Nieto. 2000. The transcription factor snail controls epithelial-mesenchymal transitions by repressing E-cadherin expression. *Nat Cell Biol* 2: 76-83.
- Cardarelli, P. M., M. Quinn, D. Buckman, Y. Fang, D. Colcher, D. J. King, C. Bebbington, G. Yarranton. 2002. Binding to CD20 by anti-B1 antibody or F(ab')(2) is sufficient for induction of apoptosis in B-cell lines. *Cancer Immunol Immunother* 51: 15-24.
- Chaudhary, V. K., Y. Jinno, D. FitzGerald, I. Pastan. 1990. Pseudomonas exotoxin contains a specific sequence at the carboxyl terminus that is required for cytotoxicity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87: 308-12.
- Chaudhary, V. K., C. Queen, R. P. Junghans, T. A. Waldmann, D. J. FitzGerald, I. Pastan. 1989. A recombinant immunotoxin consisting of two antibody variable domains fused to Pseudomonas exotoxin. *Nature* 339: 394-7.
- Chiron, M. F., C. M. Fryling, D. FitzGerald. 1997. Furin-mediated cleavage of Pseudomonas exotoxin-derived chimeric toxins. *J Biol Chem* 272: 31707-11.
- Chomczynski, P. and N. Sacchi. 1987. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* 162: 156-9.
- Chowdhury, P. S. and I. Pastan. 1999. Improving antibody affinity by mimicking somatic hypermutation in vitro. *Nat Biotechnol* 17: 568-72.
- Coit, D. G. and M. F. Brennan. 1990. Gastric neoplasms in F. G. Moody, L. C. Carey, R. S. Jones, K. A. Kelly, D. L. Nahrwold, D. B. Skinner, eds. *Surgical Treatment of Digestive Disease*. Year Book Medical Publishers, Chicago.
- Cole, G. J. und L. Glaser. 1986. A heparin-binding domain from N-CAM is involved in neural cell-substratum adhesion. *J Cell Biol* 102: 403-12.
- Comijn, J., G. Berx, P. Vermassen, K. Verschueren, L. van_Grunsven, E. Bruyneel, M. Mareel, D. Huylebroeck, F. van Roy. 2001. The two-handed E box binding zinc finger protein SIP1 downregulates E-cadherin and induces invasion. *Molecular Cell* 7: 1267-78.
- Cunningham, B. A., J. J. Hemperly, B. A. Murray, E. A. Prediger, R. Brackenbury, G. M. Edelman. 1987. Neural cell adhesion molecule: structure, immunoglobulin-like domains, cell surface modulation, and alternative RNA splicing. *Science* 236: 799-806.
- Cunningham, B. A., Y. Leutzinger, W. J. Gallin, B. C. Sorkin, G. M. Edelman. 1984. Linear organization of the liver cell adhesion molecule L-CAM. *Proc Natl Acad Sci U S A* 81: 5787-91.
- Damsky, C. H., J. Richa, D. Solter, K. Knudsen, C. A. Buck. 1983. Identification and purification of a cell surface glycoprotein

- mediating intercellular adhesion in embryonic and adult tissue. *Cell* 34: 455-66.
- Dealwis, C. und J. Wall. 2004. Towards understanding the structure-function relationship of human amyloid disease. *Curr Drug Targets* 5: 159-71.
- Debinski, W. und I. Pastan. 1994. An immunotoxin with increased activity and homogeneity produced by reducing the number of lysine residues in recombinant *Pseudomonas* exotoxin. *Bioconjug Chem* 5: 40-6.
- Decker, T., M. Oelsner, R. J. Kreitman, G. Salvatore, Q. C. Wang, I. Pastan, C. Peschel, T. Licht. 2004. Induction of caspase-dependent programmed cell death in B-cell chronic lymphocytic leukemia by anti-CD22 immunotoxins. *Blood* 103: 2718-26.
- Doenecke, A., E. L. Winnacker, M. Hallek. 1997. Rapid amplification of cDNA ends (RACE) improves the PCR-based isolation of immunoglobulin variable region genes from murine and human lymphoma cells and cell lines. *Leukemia* 11: 1787-92.
- Dubel, S., F. Breitling, P. Fuchs, M. Zewe, S. Gotter, M. Welschof, G. Moldenhauer, M. Little. 1994. Isolation of IgG antibody Fv-DNA from various mouse and rat hybridoma cell lines using the polymerase chain reaction with a simple set of primers. *J Immunol Methods* 175: 89-95.
- Duvic, M. 2000. Bexarotene and DAB(389)IL-2 (denileukin diftitox, ONTAK) in treatment of cutaneous T-cell lymphomas: algorithms. 1 Suppl 1: S51-5.
- Efstathiou, J. A., D. Liu, J. M. Wheeler, H. C. Kim, N. E. Beck, M. Ilyas, A. J. Karayiannakis, N. J. Mortensen, W. Kmiot, R. J. Playford, M. Pignatelli, W. F. Bodmer. 1999. Mutated epithelial cadherin is associated with increased tumorigenicity and loss of adhesion and of responsiveness to the motogenic trefoil factor 2 in colon carcinoma cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 96: 2316-21.
- Ellison, G., T. Klinowska, R. F. Westwood, E. Docter, T. French, J. C. Fox. 2002. Further evidence to support the melanocytic origin of MDA-MB-435. *Mol Pathol* 55: 294-9.
- Enggebraaten, O., G. O. Hjortland, S. Juell, H. Hirschberg, O. Fodstad. 2002. Intratumoral immunotoxin treatment of human malignant brain tumors in immunodeficient animals. *Int J Cancer*. 97: 846-52.
- Essand, M. und I. Pastan. 1998. Anti-prostate immunotoxins: cytotoxicity of E4 antibody-*Pseudomonas* exotoxin constructs. *Int J Cancer* 77: 123-7.
- Fagerberg, J., A. L. Hjelm, P. Ragnhammar, J. E. Frodin, H. Wigzell, H. Mellstedt. 1995. Tumor regression in monoclonal antibody-treated patients correlates with the presence of anti-idiotypic-reactive T lymphocytes. *Cancer Res* 55: 1824-7.
- Frixen, U. H., J. Behrens, M. Sachs, G. Eberle, B. Voss, A. Warda, D. Lochner, W. Birchmeier. 1991. E-cadherin-mediated cell-cell adhesion prevents invasiveness of human carcinoma cells. *J Cell Biol* 113: 173-85.
- Fuchs, C. S. und R. J. Mayer. 1995. Gastric carcinoma. *N Engl J Med* 333: 32-41.
- Fujimori, K., D. G. Covell, J. E. Fletcher, J. N. Weinstein. 1989. Modeling analysis of the global and microscopic distribution of immunoglobulin G, F(ab')₂, and Fab in tumors. *Cancer Res* 49: 5656-63.
- Fukudome, Y., K. Yanagihara, M. Takeichi, F. Ito, S. Shibamoto. 2000. Characterization of a mutant E-cadherin protein encoded by a mutant gene frequently seen in diffuse-type human gastric carcinoma. *Int J Cancer* 88: 579-83.

- Fulton, R. J., T. F. Tucker, E. S. Vitetta, J. W. Uhr. 1988a. Pharmacokinetics of tumor-reactive immunotoxins in tumor-bearing mice: effect of antibody valency and deglycosylation of the ricin A chain on clearance and tumor localization. *Cancer Res* 48: 2618-25.
- Fulton, R. J., J. W. Uhr, E. S. Vitetta. 1988b. In vivo therapy of the BCL1 tumor: effect of immunotoxin valency and deglycosylation of the ricin A chain. *Cancer Res* 48: 2626-31.
- Garcia de Palazzo, I., M. Holmes, C. Gerchel Taylor, L. M. Weiner. 1992. Antitumor effects of a bispecific antibody targeting CA19-9 antigen and CD16. *Cancer Res* 52: 5713-9.
- Garnett, M. C. 2001. Targeted drug conjugates: principles and progress. *Adv Drug Deliv Rev* 53: 171-216.
- Gayther, S. A., K. L. Goringe, S. J. Ramus, D. Huntsman, F. Roviello, N. Grehan, J. C. Machado, E. Pinto, R. Seruca, K. Halling, P. MacLeod, S. M. Powell, C. E. Jackson, B. A. Ponder, C. Caldas. 1998. Identification of germ-line E-cadherin mutations in gastric cancer families of European origin. *Cancer Res* 58: 4086-9.
- Giroldi, L. A., P. P. Bringuier, J. A. Schalken. 1994-95. Defective E-cadherin function in urological cancers: clinical implications and molecular mechanisms. *Invasion & Metastasis* 14: 71-81.
- Globoscan_2000. 2001. *GLOBOSCAN 2000: Cancer Incidence, Mortality and Prevalence Worldwide, Version 1.0*. IARC Press, Lyon.
- Glockshuber, R., M. Malia, I. Pfitzinger, A. Pluckthun. 1990. A comparison of strategies to stabilize immunoglobulin Fv-fragments. *Biochemistry* 29: 1362-7.
- Gofuku, J., H. Shiozaki, Y. Doki, M. Inoue, M. Hirao, N. Fukuchi, M. Monden. 1998. Characterization of soluble E-cadherin as a disease marker in gastric cancer patients. *Br J Cancer* 78: 1095-101.
- Goldenberg, D. M. 2003. Advancing role of radiolabeled antibodies in the therapy of cancer. *Cancer Immunology, Immunotherapy: Cii* 52: 281-96.
- Griffiths, T. R., I. Brotherick, R. I. Bishop, M. D. White, D. M. McKenna, C. H. Horne, B. K. Shenton, D. E. Neal, J. K. Mellon. 1996. Cell adhesion molecules in bladder cancer: soluble serum E-cadherin correlates with predictors of recurrence. *Br J Cancer* 74: 579-84.
- Guilford, P., J. Hopkins, J. Harraway, M. McLeod, N. McLeod, P. Harawira, H. Taite, R. Scoular, A. Miller, A. E. Reeve. 1998. E-cadherin germline mutations in familial gastric cancer. *Nature* 392: 402-5.
- Guilford, P. J., J. B. Hopkins, W. M. Grady, S. D. Markowitz, J. Willis, H. Lynch, A. Rajput, G. L. Wiesner, N. M. Lindor, L. J. Burgart, T. T. Toro, D. Lee, J. M. Limacher, D. W. Shaw, M. P. Findlay, A. E. Reeve. 1999. E-cadherin germline mutations define an inherited cancer syndrome dominated by diffuse gastric cancer. *Hum Mutat* 14: 249-55.
- Gunthert, U., M. Hofmann, W. Rudy, S. Reber, M. Zoller, I. Haussmann, S. Matzku, A. Wenzel, H. Ponta, P. Herrlich. 1991. A new variant of glycoprotein CD44 confers metastatic potential to rat carcinoma cells. *Cell* 65: 13-24.
- Handschuh, G., S. Candidus, B. Luber, U. Reich, C. Schott, S. Oswald, H. Becke, P. Hutzler, W. Birchmeier, H. Hofler, K. F. Becker. 1999. Tumour-associated E-cadherin mutations alter cellular morphology, decrease cellular adhesion and increase cellular motility. *Oncogene* 18: 4301-12.
- Handschuh, G., B. Luber, P. Hutzler, H. Hofler, K. F. Becker. 2001. Single amino acid substitutions in conserved extracellular

- domains of E-cadherin differ in their functional consequences. *J Mol Biol* 314: 445-54.
- Hassan, R., M. R. Lerner, D. Benbrook, S. A. Lightfoot, D. J. Brackett, Q. C. Wang, I. Pastan. 2002. Antitumor activity of SS(dsFv)PE38 and SS1(dsFv)PE38, recombinant antimesothelin immunotoxins against human gynecologic cancers grown in organotypic culture in vitro. *Clinical Cancer Res* 8: 3520-6.
- Hassan, R., J. L. Viner, Q. C. Wang, I. Margulies, R. J. Kreitman, I. Pastan. 2000. Anti-tumor activity of K1-LysPE38QQR, an immunotoxin targeting mesothelin, a cell-surface antigen overexpressed in ovarian cancer and malignant mesothelioma. *J Immunother* 23: 473-9.
- Hiraguri, S., T. Godfrey, H. Nakamura, J. Graff, C. Collins, L. Shayesteh, N. Doggett, K. Johnson, M. Wheelock, J. Herman, S. Baylin, D. Pinkel, J. Gray. 1998. Mechanisms of inactivation of E-cadherin in breast cancer cell lines. *Cancer Res* 58: 1972-7.
- Holliger, P. und H. Hoogenboom. 1998. Antibodies come back from the brink. *Nature Biotech* 16: 1015-6.
- Honig, M. G. und R. I. Hume. 1986. Fluorescent carbocyanine dyes allow living neurons of identified origin to be studied in long-term cultures. *J Cell Biol* 103: 171-87.
- Hudson, T. H. und D. M. Neville, Jr. 1987. Temporal separation of protein toxin translocation from processing events. *J Biol Chem* 262: 16484-94.
- Huse, W. D., L. Sastry, S. A. Iverson, A. S. Kang, M. Alting-Mees, D. R. Burton, S. J. Benkovic, R. A. Lerner. 1989. Generation of a large combinatorial library of the immunoglobulin repertoire in phage lambda. *Science* 246: 1275-81.
- Hwang, J., D. J. Fitzgerald, S. Adhya, I. Pastan. 1987. Functional domains of Pseudomonas exotoxin identified by deletion analysis of the gene expressed in E. coli. *Cell* 48: 129-36.
- Hyafil, F., C. Babinet, F. Jacob. 1981. Cell-cell interactions in early embryogenesis: a molecular approach to the role of calcium. *Cell* 26: 447-54.
- Iglewski, B. H. und D. Kabat. 1975. NAD-dependent inhibition of protein synthesis by Pseudomonas aeruginosa toxin. *Proc Natl Acad Sci USA* 72: 2284-8.
- Jackson, M. E., J. C. Simpson, A. Girod, R. Pepperkok, L. M. Roberts, J. M. Lord. 1999. The KDEL retrieval system is exploited by Pseudomonas exotoxin A, but not by Shiga-like toxin-1, during retrograde transport from the Golgi complex to the endoplasmic reticulum. *J Cell Sci* 112: 467-75.
- Jalkanen, S., R. A. Reichert, W. M. Gallatin, R. F. Bargatze, I. L. Weissman, E. C. Butcher. 1986. Homing receptors and the control of lymphocyte migration. *Immunol Rev* 91: 39-60.
- Jung, S. H., I. Pastan, B. Lee. 1994. Design of interchain disulfide bonds in the framework region of the Fv fragment of the monoclonal antibody B3. *Proteins* 19: 35-47.
- Kabat, E. A., National Institutes of Health (U.S.), and Columbia University. 1991. *Sequences of proteins of immunological interest*. U.S. Dept. of Health and Human Services Public Health Service National Institutes of Health, Bethesda, MD.
- Keller, G., H. Vogelsang, I. Becker, J. Hutter, K. Ott, S. Candidus, T. Grundei, K. F. Becker, J. Mueller, J. R. Siewert, H. Hofler. 1999. Diffuse type gastric and lobular breast carcinoma in a familial gastric cancer patient with an E-cadherin germline mutation. *Am J Pathol* 155: 337-42.

- Keppeler-Hafkemeyer, A., U. Brinkmann, I. Pastan. 1998. Role of caspases in immunotoxin-induced apoptosis of cancer cells. *Biochemistry* 37: 16934-42.
- Keppeler-Hafkemeyer, A., R. J. Kreitman, I. Pastan. 2000. Apoptosis induced by immunotoxins used in the treatment of hematologic malignancies. *Int J Cancer* 87: 86-94.
- Kinsella, A. R., G. C. Lepts, C. L. Hill, M. Jones. 1994. Reduced E-cadherin expression correlates with increased invasiveness in colorectal carcinoma cell lines. *Clin Exp Metastasis* 12: 335-42.
- Knappik, A., L. Ge, A. Honegger, P. Pack, M. Fischer, G. Wellenhofer, A. Hoess, J. Wolle, A. Pluckthun, B. Virnekas. 2000. Fully synthetic human combinatorial antibody libraries (HuCAL) based on modular consensus frameworks and CDRs randomized with trinucleotides. *J Mol Biol* 296: 57-86.
- Kohler, G. und C. Milstein. 1975. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature* 256: 495-7.
- Komatsu, N., T. Oda, T. Muramatsu. 1998. Involvement of both caspase-like proteases and serine proteases in apoptotic cell death induced by ricin, modeccin, diphtheria toxin, and pseudomonas toxin. *J Biochem (Tokyo)* 124: 1038-44.
- Kondo, T., D. FitzGerald, V. K. Chaudhary, S. Adhya, I. Pastan. 1988. Activity of immunotoxins constructed with modified Pseudomonas exotoxin A lacking the cell recognition domain. *J Biol Chem* 263: 9470-5.
- Kounnas, M. Z., R. E. Morris, M. R. Thompson, D. J. FitzGerald, D. K. Strickland, C. B. Saelinger. 1992. The alpha 2-macroglobulin receptor/low density lipoprotein receptor-related protein binds and internalizes Pseudomonas exotoxin A. *J Biol Chem* 267: 12420-3.
- Krebs, B., R. Rauchenberger, S. Reiffert, C. Rothe, M. Tesar, E. Thomassen, M. Cao, T. Dreier, D. Fischer, A. Hoss, L. Inge, A. Knappik, M. Marget, P. Pack, X. Q. Meng, R. Schier, P. Sohleemann, J. Winter, J. Wolle, T. Kretzschmar. 2001. High-throughput generation and engineering of recombinant human antibodies. *J Immunol Methods* 254: 67-84.
- Kreitman, R. J. 2001. Toxin-labeled monoclonal antibodies. *Curr Pharm Biotechnol* 2: 313-25.
- Kreitman, R. J., I. Margulies, M. Stetler-Stevenson, Q. C. Wang, D. J. FitzGerald, I. Pastan. 2000a. Cytotoxic activity of disulfide-stabilized recombinant immunotoxin RFB4(dsFv)-PE38 (BL22) toward fresh malignant cells from patients with B-cell leukemias. *Clin Cancer Res* 6: 1476-87.
- Kreitman, R. J., W. H. Wilson, K. Bergeron, M. Raggio, M. Stetler-Stevenson, D. J. FitzGerald, I. Pastan. 2001. Efficacy of the anti-CD22 recombinant immunotoxin BL22 in chemotherapy-resistant hairy-cell leukemia. *New Engl J Med* 345: 241-7.
- Kreitman, R. J., W. H. Wilson, J. D. White, M. Stetler-Stevenson, E. S. Jaffe, S. Giardina, T. A. Waldmann, I. Pastan. 2000b. Phase I trial of recombinant immunotoxin anti-Tac(Fv)-PE38 (LMB-2) in patients with hematologic malignancies. *J Clin Oncology* 18: 1622-36.
- Kuan, C. T. und I. Pastan. 1996a. Improved antitumor activity of a recombinant anti-Lewis(y) immunotoxin not requiring proteolytic activation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93: 974-8.
- Kuan, C. T. und I. Pastan. 1996b. Recombinant immunotoxin containing a disulfide-stabilized Fv directed at erbB2 that does not require proteolytic activation. *Biochemistry* 35: 2872-7.

- Kutemeier, G., C. Harloff, R. Mocikat. 1992. Rapid isolation of immunoglobulin variable genes from cell lysates of rat hybridomas by polymerase chain reaction. *Hybridoma* 11: 23-32.
- Kuzel, T. M. 2000. DAB(389)IL-2 (denileukin diftitox, ONTAK): review of clinical trials to date. *Clin Lymphoma* 1 Suppl 1: S33-6.
- Lauren, P. 1965. The two histological main types of gastric carcinoma: Diffuse and so-called intestinal-type carcinoma. *Acta Pathol. Microbiol. Scand.* 64: 31.
- Le, T. L., A. S. Yap, J. L. Stow. 1999. Recycling of E-cadherin: a potential mechanism for regulating cadherin dynamics. *J Cell Biol* 146: 219-32.
- Lecuit, M., S. Dramsi, C. Gottardi, M. Fedor-Chaiken, B. Gumbiner, P. Cossart. 1999. A single amino acid in E-cadherin responsible for host specificity towards the human pathogen *Listeria monocytogenes*. *Embo J* 18: 3956-63.
- Lin, C. C., Y. C. Shen, C. K. Chuang, S. K. Liao. 2001. Analysis of a murine anti-ganglioside GD2 monoclonal antibody expressing both IgG2a and IgG3 isotypes: monoclonality, apoptosis triggering, and activation of cellular cytotoxicity on human melanoma cells. *Adv Exp Med Biol* 491: 419-29.
- Lipponen, P., E. Saarelainen, H. Ji, S. Aaltomaa, K. Syrjanen. 1994. Expression of E-cadherin (E-CD) as related to other prognostic factors and survival in breast cancer. *J Pathol* 174: 101-9.
- Liu, Z., C. Panousis, F. E. Smyth, R. Murphy, V. Wirth, G. Cartwright, T. G. Johns, A. M. Scott. 2003. Generation of anti-idiotypic antibodies for application in clinical immunotherapy laboratory analyses. *Hybrid Hybridomics* 22: 219-28.
- Lo, B. K. 2004. Antibody humanization by CDR grafting. *Methods Mol Biol* 248: 135-59.
- Lorimer, I. A., C. J. Wikstrand, S. K. Batra, D. D. Bigner, I. Pastan. 1995. Immunotoxins that target an oncogenic mutant epidermal growth factor receptor expressed in human tumors. *Clin Cancer Res* 1: 859-64.
- Maeda, H., S. Matsushita, Y. Eda, K. Kimachi, S. Tokiyoshi, M. M. Bendig. 1991. Construction of reshaped human antibodies with HIV-neutralizing activity. *Hum Antibodies Hybridomas* 2: 124-34.
- Mansouri, A., N. Spurr, P. N. Goodfellow, R. Kemler. 1988. Characterization and chromosomal localization of the gene encoding the human cell adhesion molecule uvomorulin. *Differentiation* 38: 67-71.
- Martsev, S. P., A. P. Dubnovitsky, A. P. Vlasov, M. Hoshino, K. Hasegawa, H. Naiki, Y. Goto. 2002. Amyloid fibril formation of the mouse V(L) domain at acidic pH. *Biochemistry* 41: 3389-95.
- Mellstedt, H. 2003. Monoclonal antibodies in human cancer. *Drugs Today (Barc)* 39 Suppl C: 1-16.
- Mengaud, J., H. Ohayon, P. Gounon, Mege R.M., P. Cossart. 1996. E-cadherin is the receptor for internalin, a surface protein required for entry of *L. monocytogenes* into epithelial cells. *Cell* 84: 923-32.
- Moehring, J. M., N. M. Inocencio, B. J. Robertson, T. J. Moehring. 1993. Expression of mouse furin in a Chinese hamster cell resistant to *Pseudomonas* exotoxin A and viruses complements the genetic lesion. *J Biol Chem* 268: 2590-4.
- Montuori, N. und M. E. Sobel. 1996. The 67-kDa laminin receptor and tumor progression. *Curr Top Microbiol Immunol* 213 (Pt 1): 205-14.
- Moolten, F. L. und S. R. Cooperband. 1970. Selective destruction of target cells by diphtheria toxin conjugated to antibody directed against antigens on the cells. *Science* 169: 68-70.

- Morisaki, T., A. Uchiyama, D. Yuzuki, R. Essner, D. L. Morton, D. S. Hoon. 1994. Interleukin 4 regulates G1 cell cycle progression in gastric carcinoma cells. *Cancer Res* 54: 1113-8.
- Morris, R. E. und C. B. Saelinger. 1990. Visualization of intracellular trafficking of proteins. *Methods Enzymol* 184: 379-88.
- Multani, P. S., S. O'Day, L. M. Nadler, M. L. Grossbard. 1998. Phase II clinical trial of bolus infusion anti-B4 blocked ricin immunoconjugate in patients with relapsed B-cell non-Hodgkin's lymphoma. *Clin Cancer Res* 4: 2599-604.
- Nagahira, K., Y. Fukuda, Y. Oyama, T. Kurihara, T. Nasu, H. Kawashima, C. Noguchi, S. Oikawa, T. Nakanishi. 1999. Humanization of a mouse neutralizing monoclonal antibody against tumor necrosis factor-alpha (TNF-alpha). *J Immunol Methods* 222: 83-92.
- Nelson, W. J. und R. Nusse. 2004. Convergence of Wnt, beta-catenin, and cadherin pathways. *Science* 303: 1483-7.
- Noe, V., B. Fingleton, K. Jacobs, H. C. Crawford, S. Vermeulen, W. Steelant, E. Bruyneel, L. M. Matrisian, M. Mareel. 2001. Release of an invasion promoter E-cadherin fragment by matrilysin and stromelysin-1. *J Cell Sci* 114: 111-118.
- Noe, V., J. Willems, J. Vandekerckhove, F. V. Roy, E. Bruyneel, M. Mareel. 1999. Inhibition of adhesion and induction of epithelial cell invasion by HAV-containing E-cadherin-specific peptides. *J Cell Sci* 112: 127-35.
- Nollet, F., G. Berx, F. van Roy. 1999. The role of the E-cadherin/catenin adhesion complex in the development and progression of cancer. *Mol Cell Biol Res Commun* 2: 77-85.
- Ogata, M., V. K. Chaudhary, I. Pastan, D. J. Fitzgerald. 1990. Processing of Pseudomonas exotoxin by a cellular protease results in the generation of a 37,000-Da toxin fragment that is translocated to the cytosol. *J Biol Chem* 265: 20678-85.
- Ogata, M., C. M. Fryling, I. Pastan, D. J. Fitzgerald. 1992. Cell-mediated cleavage of Pseudomonas exotoxin between Arg279 and Gly280 generates the enzymatically active fragment which translocates to the cytosol. *J Biol Chem* 267: 25396-401.
- Orlandi, R., D. H. Gussow, P. T. Jones, G. Winter. 1989. Cloning immunoglobulin variable domains for expression by the polymerase chain reaction. *Proc Natl Acad Sci USA* 86: 3833-7.
- Otto, T., W. Birchmeier, U. Schmidt, A. Hinke, J. Schipper, H. Rubben, A. Raz. 1994. Inverse relation of E-cadherin and autocrine motility factor receptor expression as a prognostic factor in patients with bladder carcinomas. *Cancer Res* 54: 3120-3.
- Overduin, M., T. S. Harvey, S. Bagby, K. I. Tong, P. Yau, M. Takeichi, M. Ikura. 1995. Solution structure of the epithelial cadherin domain responsible for selective cell adhesion. *Science* 267: 386-9.
- Ozawa, M. und R. Kemler. 1990. Correct proteolytic cleavage is required for the cell adhesive function of uvomorulin. *J Cell Biol* 111: 1645-50.
- Pai, L. H., R. Wittes, A. Setser, M. C. Willingham, I. Pastan. 1996. Treatment of advanced solid tumors with immunotoxin LMB-1: an antibody linked to Pseudomonas exotoxin. *Nat Med* 2: 350-3.
- Palacios, F., J. K. Schweitzer, R. L. Boshans, C. D_Souza_Schorey. 2002. ARF6-GTP recruits Nm23-H1 to facilitate dynamin-mediated endocytosis during adherens junctions disassembly. *Nat Cell Biol* 4: 929-36.
- Pastan, I. 2003. Immunotoxins containing Pseudomonas exotoxin A: a short history. *Cancer Immunol Immunother* 52: 338-41.

- Paterson, A. D., R. G. Parton, C. Ferguson, J. L. Stow, A. S. Yap. 2003. Characterization of E-cadherin endocytosis in isolated MCF-7 and chinese hamster ovary cells: the initial fate of unbound E-cadherin. *J Biol Chem* 278: 21050-7.
- Plückthun, A. 1994. Recombinant Antibodies. Pages 201-236 in C. J. v. R. van Oss, M. H. V., ed. *Immunochemistry*. Marcel Dekker, Inc., New York.
- Puri, R. K., P. Leland, R. J. Kreitman, I. Pastan. 1994. Human neurological cancer cells express interleukin-4 (IL-4) receptors which are targets for the toxic effects of IL4-Pseudomonas exotoxin chimeric protein. *Int J Cancer* 58: 574-81.
- Puri, R. K., P. Leland, N. I. Obiri, S. R. Husain, R. J. Kreitman, G. P. Haas, I. Pastan, W. Debinski. 1996. Targeting of interleukin-13 receptor on human renal cell carcinoma cells by a recombinant chimeric protein composed of interleukin-13 and a truncated form of Pseudomonas exotoxin A (PE38QQR). *Blood* 87: 4333-9.
- Queen, C., W. P. Schneider, H. E. Selick, P. W. Payne, N. F. Landolfi, J. F. Duncan, N. M. Avdalovic, M. Levitt, R. P. Junghans, T. A. Waldmann. 1989. A humanized antibody that binds to the interleukin 2 receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 86: 10029-33.
- Reiter, Y., U. Brinkmann, S. H. Jung, B. Lee, P. G. Kasprzyk, C. R. King, I. Pastan. 1994a. Improved binding and antitumor activity of a recombinant anti-erbB2 immunotoxin by disulfide stabilization of the Fv fragment. *J Biol Chem* 269: 18327-31.
- Reiter, Y., U. Brinkmann, S. H. Jung, I. Pastan, B. Lee. 1995. Disulfide stabilization of antibody Fv: computer predictions and experimental evaluation. *Protein Eng* 8: 1323-31.
- Reiter, Y., U. Brinkmann, R. J. Kreitman, S. H. Jung, B. Lee, I. Pastan. 1994b. Stabilization of the Fv fragments in recombinant immunotoxins by disulfide bonds engineered into conserved framework regions. *Biochemistry* 33: 5451-9.
- Reiter, Y., U. Brinkmann, B. Lee, I. Pastan. 1996. Engineering antibody Fv fragments for cancer detection and therapy: disulfide-stabilized Fv fragments. *Nat Biotechnol* 14: 1239-45.
- Reiter, Y., U. Brinkmann, K. O. Webber, S. H. Jung, B. Lee, I. Pastan. 1994c. Engineering interchain disulfide bonds into conserved framework regions of Fv fragments: improved biochemical characteristics of recombinant immunotoxins containing disulfide-stabilized Fv. *Protein Eng* 7: 697-704.
- Reiter, Y. und I. Pastan. 1996. Antibody engineering of recombinant Fv immunotoxins for improved targeting of cancer: disulfide-stabilized Fv immunotoxins. *Clin Cancer Res* 2: 245-52.
- Reyes, A. A., R. Akesson, L. Brezina, G. J. Cole. 1990. Structural requirements for neural cell adhesion molecule-heparin interaction. *Cell Regulation* 1: 567-76.
- Richards, F. M., S. A. McKee, M. H. Rajpar, T. R. Cole, D. G. Evans, J. A. Jankowski, C. McKeown, D. S. Sanders, E. R. Maher. 1999. Germline E-cadherin gene (CDH1) mutations predispose to familial gastric cancer and colorectal cancer. *Hum Mol Genet* 8: 607-10.
- Riechmann, L., M. Clark, H. Waldmann, G. Winter. 1988. Reshaping human antibodies for therapy. *Nature* 332: 323-7.
- Rosivatz, E., I. Becker, K. Specht, E. Fricke, B. Lubber, R. Busch, H. Hofler, K. F. Becker. 2002. Differential expression of the epithelial-mesenchymal transition regulators snail, SIP1, and twist in gastric cancer. *Am J Pathol* 161: 1881-91.
- Rozemuller, H., P. S. Chowdhury, I. Pastan, R. J. Kreitman. 2001. Isolation of new anti-CD30 scFvs from DNA-immunized mice

- by phage display and biologic activity of recombinant immunotoxins produced by fusion with truncated pseudomonas exotoxin. *Int J Cancer* 92: 861-70.
- Ruberti, F., A. Cattaneo, A. Bradbury. 1994. The use of the RACE method to clone hybridoma cDNA when V region primers fail. *J Immunol Methods* 173: 33-9.
- Ruiz, P., D. Dunon, A. Sonnenberg, B. A. Imhof. 1993. Suppression of mouse melanoma metastasis by EA-1, a monoclonal antibody specific for alpha 6 integrins. *Cell Adhes Commun* 1: 67-81.
- Ryniers, F., C. Stove, M. Goethals, L. Brackenier, V. Noe, M. Bracke, J. Vandekerckhove, M. Mareel, und E. Bruyneel. 2002. Plasmin produces an E-cadherin fragment that stimulates cancer cell invasion. *Biol Chem* 383: 159-65.
- Sambrook, J., und D. W. Russell. 2001. *Molecular cloning : a laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.
- Sanger, F., S. Nicklen, und A. R. Coulson. 1977. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 74: 5463-7.
- Satow, Y., G.H. Cohen, E.A. Padlan, D.R. Davies. 1986. Phosphocholine binding immunoglobulin Fab McPC603. An X-ray diffraction study at 2.7 Å. *J Mol Biol*. 190: 593-604.
- Scudiero, D. A., R. H. Shoemaker, K. D. Paull, A. Monks, S. Tierney, T. H. Nofziger, M. J. Currens, D. Seniff, und M. R. Boyd. 1988. Evaluation of a soluble tetrazolium/formazan assay for cell growth and drug sensitivity in culture using human and other tumor cell lines. *Cancer Res* 48: 4827-33.
- Seetharam, S., V. K. Chaudhary, D. FitzGerald, und I. Pastan. 1991. Increased cytotoxic activity of Pseudomonas exotoxin and two chimeric toxins ending in KDEL. *J Biol Chem* 266: 17376-81.
- Shinohara, H., S. Morita, M. Kawai, A. Miyamoto, T. Sonoda, I. Pastan, N. Tanigawa. 2002. Expression of HER2 in human gastric cancer cells directly correlates with antitumor activity of a recombinant disulfide-stabilized anti-HER2 immunotoxin. *J Surg Res* 102: 169-77.
- Siegall, C. B., V. K. Chaudhary, D. J. FitzGerald, I. Pastan. 1989. Functional analysis of domains II, Ib, and III of Pseudomonas exotoxin. *J Biol Chem* 264: 14256-61.
- Skerra, A. und A. Pluckthun. 1988. Assembly of a functional immunoglobulin Fv fragment in Escherichia coli. *Science* 240: 1038-41.
- Statistisches Bundesamt. 1997-2000. Häufigste Todesursachen.
- Studier, F. W. und B. A. Moffatt. 1986. Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes. *J Mol Biol* 189: 113-30.
- Takeichi, M. 1991. Cadherin cell adhesion receptors as a morphogenetic regulator. *Science* 251: 1451-5.
- Takeichi, M., H. Inuzuka, K. Shimamura, T. Fujimori, A. Nagafuchi. 1990. Cadherin subclasses: differential expression and their roles in neural morphogenesis. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 55: 319-25.
- Taupiac, M. P., M. Bebien, M. Alami, B. Beaumelle. 1999. A deletion within the translocation domain of Pseudomonas exotoxin A enhances translocation efficiency and cytotoxicity concomitantly. *Mol Microbiol* 31: 1385-93.

- Tepass, U., K. Truong, D. Godt, M. Ikura, M. Peifer. 2000. Cadherins in embryonic and neural morphogenesis. *Nat Rev Mol Cell Biol* 1: 91-100.
- Tsutsumi, Y., M. Onda, S. Nagata, B. Lee, R. J. Kreitman, I. Pastan. 2000. Site-specific chemical modification with polyethylene glycol of recombinant immunotoxin anti-Tac(Fv)-PE38 (LMB-2) improves antitumor activity and reduces animal toxicity and immunogenicity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97: 8548-53.
- Umbas, R., W. B. Isaacs, P. P. Bringuier, H. E. Schaafsma, H. F. Karthaus, G. O. Oosterhof, F. M. Debruyne, J. A. Schalken. 1994. Decreased E-cadherin expression is associated with poor prognosis in patients with prostate cancer. *Cancer Res* 54: 3929-33.
- Verhoeyen, M., C. Milstein, G. Winter. 1988. Reshaping human antibodies: grafting an antilysozyme activity. *Science* 239: 1534-6.
- Vestweber, D. und R. Kemler. 1984. Rabbit antiserum against a purified surface glycoprotein decompacts mouse preimplantation embryos and reacts with specific adult tissues. *Exp Cell Res* 152: 169-78.
- Vestweber, D., C. Ocklind, A. Gossler, P. Odin, B. Obrink, R. Kemler. 1985. Comparison of two cell-adhesion molecules, uvomorulin and cell-CAM 105. *Exp Cell Res* 157: 451-61.
- Vet, J. A., F. M. Debruyne, J. A. Schalken. 1994. Molecular prognostic factors in bladder cancer. *World J Urol* 12: 84-8.
- Von Mehren, M., G. P. Adams, L. M. Weiner. 2003. Monoclonal antibody therapy for cancer. *Annu Rev Med* 54: 343-69.
- Wang, Q. C., L. H. Pai, W. Debinski, D. J. FitzGerald, I. Pastan. 1993. Polyethylene glycol-modified chimeric toxin composed of transforming growth factor alpha and Pseudomonas exotoxin. *Cancer Res* 53: 4588-94.
- Ward, E. S., D. Gussow, A. D. Griffiths, P. T. Jones, G. Winter. 1989. Binding activities of a repertoire of single immunoglobulin variable domains secreted from Escherichia coli. *Nature* 341: 544-6.
- Wawrzynczak, E. J., A. J. Cumber, R. V. Henry, J. May, D. R. Newell, G. D. Parnell, N. R. Worrell, J. A. Forrester. 1990. Pharmacokinetics in the rat of a panel of immunotoxins made with abrin A chain, ricin A chain, gelonin, and momordin. *Cancer Res* 50: 7519-26.
- Webber, K. O., Y. Reiter, U. Brinkmann, R. Kreitman, I. Pastan. 1995. Preparation and characterization of a disulfide-stabilized Fv fragment of the anti-Tac antibody: comparison with its single-chain analog. *Mol Immunol* 32: 249-58.
- Weiner, L. M. 1999. An overview of monoclonal antibody therapy of cancer. *Semin Oncol* 26: 41-50.
- Werner, M., K.-F. Becker, K. Böttcher, G. Keller, H. Höfler. 2002. Magenkarzinom in D. Ganten und K. Ruckpaul, eds. *Nicht-hereditäre Tumorerkrankungen*. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg.
- Wheelock, M. J., C. A. Buck, K. B. Bechtol, C. H. Damsky. 1987. Soluble 80-kd fragment of cell-CAM 120/80 disrupts cell-cell adhesion. *J Cell Biochem* 34: 187-202.
- White, C., R. Weaver, A. Grillo-Lopez. 201. Antibody-Targeted Immunotherapy for treatment of malignancy. *Annu Rev Med* 52: 125-145.
- Wikstrand, C. J., L. P. Hale, S. K. Batra, M. L. Hill, P. A. Humphrey, S. N. Kurpad, R. E. McLendon, D. Moscatello, C. N. Pegram, C. J. Reist. 1995. Monoclonal antibodies against EGFRvIII are tumor specific and react with breast and lung carcinomas and malignant gliomas. *Cancer Res* 55: 3140-8.

- Wiseman, G. A., C. A. White, R. B. Sparks, W. D. Erwin, D. A. Podoloff, D. Lamonica, N. L. Bartlett, J. A. Parker, W. L. Dunn, S. M. Spies, R. Belanger, T. E. Witzig, B. R. Leigh. Biodistribution and dosimetry results from a phase III prospectively randomized controlled trial of Zevalin radioimmunotherapy for low-grade, follicular, or transformed B-cell non-Hodgkin's lymphoma. *Crit Rev Oncol Hematol* 39: 181-94.
- Yagi, T. und M. Takeichi. 2000. Cadherin superfamily genes: functions, genomic organization, and neurologic diversity. *Genes Dev* 14: 1169-80.
- Yanagihara, K., A. Ito, T. Toge, M. Numoto. 1993. Antiproliferative effects of isoflavones on human cancer cell lines established from the gastrointestinal tract. *Cancer Res* 53: 5815-21.
- Yoshida, C. und M. Takeichi. 1982. Teratocarcinoma cell adhesion: identification of a cell-surface protein involved in calcium-dependent cell aggregation. *Cell* 28: 217-24.
- Zewe, M., S. M. Rybak, S. Dubel, J. F. Coy, M. Welschof, D. L. Newton, M. Little. 1997. Cloning and cytotoxicity of a human pancreatic RNase immunofusion. *Immunotechnology* 3: 127-36.

Danksagung

Mein erster Dank gilt Herrn Dr. Becker, dessen Vorarbeiten diese spannende und praxisorientierte Arbeit überhaupt erst möglich gemacht haben. Sein Einsatz für dieses Projekt ermöglichte mir barrierefreies Arbeiten und interessante Kooperationen mit Partnern im In- und Ausland.

Bei Herrn Prof. Dr. Höfler möchte ich mich für die außerordentlich guten Rahmenbedingungen am Institut für Allgemeine Pathologie und Pathologische Anatomie bedanken.

Sehr herzlich möchte ich mich bei Frau Hermannstätter bedanken, die mir in schwierigen Phasen des Projekts ausgezeichnete und motivierte Hilfestellung leistete.

Ich danke auch Frau Schott und Frau Oswald, die mir vor allem am Anfang der Arbeit mit Rat und Tat beiseite standen.

Frau Dr. Candidus und Frau Dr. Handschuh danke ich für die Überlassung der in der Arbeit verwendeten transfizierten Zelllinien und der Unterstützung während der initialen Phase des Projektes.

Bei allen Kollegen, insbesondere Frau Blöchinger, Frau Brunner, Frau Dr. Dudeck, Frau Dr. Fuchs, Frau Geist, Frau Göröcs, Frau Dr. Kisling, Herrn Laux, Frau Löwel, Frau Dr. Lubber, Frau Dr. Mazur, Frau Dr. Rosivatz und Frau Dr. Werenskiöld möchte ich mich für den Erfahrungsaustausch, die Hilfestellungen und wertvollen Diskussionen und nicht zuletzt auch für den Spaß, den wir hatten, bedanken.

Ich danke Herrn Dr. Bera und Herrn Dr. Pastan für die sehr freundliche Aufnahme im *Laboratory of Molecular Biology* am NIH in Bethesda. Ihre Erfahrungen im Bereich der rekombinanten Immuntoxine haben den Grundstein für die erfolgreiche Durchführung dieser Arbeit gelegt. Herrn Dr. Wang danke ich für die Koppelung des 6H8-PE38QQR Immuntoxins. Nicht namentlich danke ich allen Mitarbeitern des Instituts für die allgegenwärtige Unterstützung.

Herrn Dr. Koch möchte ich für die initiale Hilfestellung und die Bereitstellung der BIACORE am Institut für Experimentelle Onkologie des Klinikum rechts der Isar herzlich danken.

Ich danke all meinen Freunden und meiner Familie, die mich in allen Zeiten der Arbeit unterstützten und mir auf unterschiedlichste Weise halfen die Arbeit erfolgreich zu beenden.

Recht herzlich möchte ich mich bei Herrn Dr. Lang und den Mitarbeitern des Instituts für Medizinische Mikrobiologie bedanken, die durch sanften Druck und viel Unterstützung die Fertigstellung des Manuskriptes in die Wege leiteten.

Herrn Dr. Becker und Frau Dr. Gerlach möchte ich noch einen besonderen Dank aussprechen, da sie die kritische Durchsicht des Manuskriptes auf sich nahmen.

Veröffentlichungen

Dotzauer, A., U. Gebhardt, K. Bieback, U. Gottke, A. Kracke, **J. Mages**, S.M. Lemon, A. Vallbracht. 2000. Hepatitis A virus-specific immunoglobulin A mediates infection of hepatocytes with hepatitis A virus via the asialoglycoprotein receptor. *J Virol.* 74:10950-7.

Becker, K.F., E. Kremmer, M. Eulitz, S. Schulz, **J. Mages**, G. Handschuh, M.J. Wheelock, A.M. Cleton-Jansen, H. Hofler, I. Becker. 2002. Functional allelic loss detected at the protein level in archival human tumours using allele-specific E-cadherin monoclonal antibodies. *J Pathol.* 197:567-74.

Fuchs, M., P. Hutzler, I. Brunner, J. Schlegel, **J. Mages**, U. Reuning, S. Hapke, J. Duyster, S. Hirohashi, T. Genda, M. Sakamoto, F. Uberall, H. Hofler, K.F. Becker, B. Lubber. 2002. Motility enhancement by tumor-derived mutant E-cadherin is sensitive to treatment with epidermal growth factor receptor and phosphatidylinositol 3-kinase inhibitors. *Exp Cell Res.* 276:129-41.

Lang, R., A.L. Pauleau, E. Parganas, Y. Takahashi, **J. Mages**, J.N. Ihle, R. Rutschman, P.J. Murray. 2003. SOCS3 regulates the plasticity of gp130 signaling. *Nat Immunol.* 4:546-50.

Weighardt, H., G. Jusek, **J. Mages**, R. Lang, K. Hoebe, B. Beutler, B. Holzmann. 2004. Identification of a TLR4- and TRIF-dependent activation program of dendritic cells. *Eur J Immunol.* 34:558-64.

Mages, J.*, F. Schmitz*, A. Heit, R. Lang, H. Wagner. 2004. Transcriptional activation induced in macrophages by Toll-like receptor (TLR) ligands: from expression profiling to a model of TLR signaling. *Eur J Immunol.* 34:2863-73.

Chaneva, S., G. Schneider, D. Siegmund, H. Wajant, **J. Mages**, G. Hacker, 2004. Enhanced basal AP-1 activity and de-regulation of numerous genes in T cells transgenic for a dominant interfering mutant of FADD/MORT1. *Eur J Immunol.* 34:3006-3015.

Posterpreise

Mages, J., Handschuh, G., Candidus, S., Kremmer, E., Wang, Q.C., Pastan, I., Höfler, H., Becker, K.-F.: Mutations of E-Cadherin: A novel target for cancer specific immunotherapy, 5th International Symposium: Biological Therapy of Cancer - From Basic Research to Clinical Application, 1999, 2. Posterpreis, Wolfgang Wilmanns Foundation

Mages, J.*, F. Schmitz*, A. Heit, R., Lang, H., Wagner: Common and unique activation programs triggered by diverse TLR ligands in murine macrophages. International Symposium: Functional Genomics of Infectious Diseases and Inflammation, 2003, Tübingen. Affymetrix Posterpreis

* gleichwertige Autoren

Lebenslauf

JÖRG MAGES

ANSCHRIFT: ERHARD-AUER-STR. 3
80637 MÜNCHEN
EMAIL: MAGES@LRZ.TUM.DE

PERSÖNLICHE ANGABEN

Geburtsdatum 04.01.1971
Geburtsort München

SCHULBILDUNG

1981 bis 1990 Luitpold-Gymnasium München (Math.-Naturw. Zweig)
Abitur (Leistungskurse Chemie und Geschichte)

ZIVILDIENTST

Juni 91 bis August 92 Zivildienst bei der Stiftung Pfennigparade

STUDIUM

1992 bis 1998 Biologiestudium an der Universität Bremen
Hauptfach: Mikrobiologie/Virologie
1. Nebenfach: Zell- und Molekularbiologie sowie Genetik
2. Nebenfach: Biochemie
weitere Vertiefungen: Neurobiologie

1995 bis 1996 Projekt: Nachweis von gentechnischen Veränderungen in *Novel-Food*
Etablierung eines DNA-Extraktionsverfahrens und einer spezifischen PCR auf die Resistenzgene in gentechnisch veränderten Tomatenmark der Firma Sainsbury

August 1998 Diplomarbeit im Institut für Virologie
Thema: Aufnahmemechanismen und Dissemination von HAV-IgA-Immunkomplexen

AUSLANDSAUFENTHALT

April bis Juli 2000 Gast-Aufenthalt am National Institute of Health (Bethesda) in der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Dr. Ira Pastan.
Erlernen von Proteinaufreinigungsverfahren zur Herstellung von Immuntoxinen

ARBEIT

1999 bis 2004 Promotion am Institut für Molekulare Pathologie, TU-München und GSF-Neuherberg.
Thema: Rekombinante disulfidstabilisierte Immuntoxine gegen mutiertes E-Cadherin zur spezifischen Krebstherapie

2003 bis 2004 Wissenschaftlicher Angestellter am Institut für Medizinische Mikrobiologie, Klinikum rechts der Isar, TU-München