
Einfluss eines Carboanhydrase XII-spezifischen Antikörpers auf das Tumorwachstum in vitro und in vivo sowie Onkosomen-basierte Generierung neuer tumorreaktiver Antikörper

Gábor Gondi



München 2013

Einfluss eines Carboanhydrase XII-spezifischen Antikörpers auf das Tumorwachstum in vitro und in vivo sowie Onkosomen-basierte Generierung neuer tumorreaktiver Antikörper

Gábor Gondi

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades der Naturwissenschaften

an der Fakultät für Biologie

der Ludwig-Maximilians-Universität

München

vorgelegt von

Gábor Gondi

aus Kiskunfélegyháza in Ungarn

angefertigt am Helmholtz Zentrum für Gesundheit und Umwelt

München, den 27.05.13

Erstgutachter: PD. Dr. Josef Mautner

Zweitgutachter: Prof. Dr. Angelika Böttger

Tag der mündlichen Prüfung: 14.10.2013

Eidesstattliche Erklärung

Ich versichere hiermit ehrenwörtlich, dass die vorgelegte Dissertation von mir selbstständig und nur unter der Verwendung der angegebenen Quellen und Hilfsmittel ohne unerlaubte Hilfe angefertigt worden ist.

München, Mai 2013

.....

(Gábor Gondi)

INHALTSVERZEICHNIS

1	EINLEITUNG	9
1.1	<i>Krebs in Deutschland.....</i>	9
1.2	<i>Evolutionäre Dynamik der Karzinogenese.....</i>	11
1.2.1	Klonale Evolution und Ökosystem Krebs	11
1.2.2	Azidose und Überlebensvorteil durch membranständige Carboanhydrasen	14
1.2.3	Wichtige Komponenten der Tumor-assoziierten pH-Regulation	15
1.2.4	Die Rolle der Tumor-assoziierte Carboanhydrasen IX und XII	18
1.2.4.1	Carboanhydrase IX.....	20
1.2.4.2	Carboanhydrase XII.....	21
1.3	<i>Tumorexosomen: Eine Klasse von Mikrovesikeln</i>	22
1.4	<i>Bedeutung monoklonaler Antikörper für die klinische Onkologie</i>	24
1.5	<i>Ziele dieser Arbeit.....</i>	28
2	MATERIAL UND METHODEN	30
2.1	<i>Material</i>	30
2.1.1	Geräte	30
2.1.2	Verbrauchsmaterialien	31
2.1.3	Chemikalien	33
2.1.4	Zelllinien	34
2.1.5	Verwendeter Mausstamm	35
2.1.6	Primäre Antikörper und Sekundärkonjugate	35
2.1.7	Plasmide	36
2.1.8	Oligonukleotide	37
2.1.8.1	Primer für Klonierung der CA IX	37
2.1.8.2	Primer für Real-time-PCR.....	37
2.1.9	Dienstleistungen.....	37
2.1.10	Software (Computer-Programme).....	37
2.1.11	Puffer und Lösungen.....	38
2.2	<i>Methoden.....</i>	39
2.2.1	Molekularbiologische Methoden.....	39
2.2.1.1	Bakterienkultur	39
2.2.1.2	Klonierung und Restriktionsenzymverdau	40
2.2.1.3	Isolierung von zellulärer RNA	40
2.2.1.4	Quantitative Real-time RT-PCR.....	41
2.2.2	Zellkultur.....	42
2.2.2.1	Zellkulturbedingungen	42
2.2.2.2	Kryokonservierung von Zellen	42

2.2.2.3	Isolation von Onkosomen aus Zellkulturüberständen	43
2.2.2.4	Biotinylierung von Zellen	43
2.2.2.5	Transfektion, Selektion und Expansion hCA IX-exprimierender Zellen	44
2.2.2.6	Mycoplasmentest	45
2.2.2.7	MTT-Test von 2D-Kulturen	46
2.2.2.8	Sphäroid-Kulturen	46
2.2.3	Proteinbiochemische Methoden	47
2.2.3.1	Proteinextraktion aus Säugerzellen	47
2.2.3.2	Bestimmung der Proteinkonzentration mit BCA-Assay	47
2.2.3.3	Anreicherung von Membranfraktionen	47
2.2.3.4	Immunpräzipitation und Massenspektrometrie	48
2.2.3.5	SDS-Gelelektrophorese	49
2.2.3.6	Färbungen von Polyacrylamid-Gelen	50
2.2.3.7	Westernblot	50
2.2.3.8	Dot-Blot	51
2.2.3.9	Kopplung von Antikörpern mit Fluorochromen	51
2.2.4	Immunbiologische Methoden	52
2.2.4.1	Durchflusszytometrie	52
2.2.5	Tierversuchskundliche Methoden	52
2.2.5.1	Transplantation von Tumorzellen	53
2.2.5.2	Injektion der Therapie- und Kontrollantikörper	53
2.2.5.3	Biolumineszenz-basierte Bildgebung	53
2.2.5.4	Immunisierung von Ratten	54
2.2.5.5	Herstellung von Hybridom-Klonen	54
2.2.6	Statistik	55
3	ERGEBNISSE	56
3.1	Einfluss des 6A10-Antikörpers auf das Tumorwachstum in vitro	56
3.1.1	Verlangsamtes Wachstum kultivierter Tumorzellen bei Blockierung der CA XII und CA IX	58
3.1.2	Reduziertes Wachstum kultivierter Tumorzellen bei Blockierung der CA XII und CA IX im Sphäroid-Modell	61
3.1.3	Eine Real-Time-PCR-Analyse zeigt Herunterregulation von NBC2 als Antwort auf 6A10-Behandlung von Sphäroiden	64
3.2	Einfluss des 6A10-Antikörpers auf das Tumorwachstum in vivo	67
3.2.1	Etablierung solider Tumoren in NSG-Mäusen	67
3.2.2	Erster Tierversuch mit A549-Zellen zur Dosisfindung zeigt Behandlungserfolg durch regelmäßige Applikation des 6A10-Antikörpers	76
3.2.3	Tierversuch mit U87-Zellen zur Dosisfindung zeigte keinen Behandlungserfolg durch regelmäßige Applikation des 6A10-Antikörpers	78

3.2.4	Der Einsatz von A549-Zellen aus einer Einzellzellklonierung führt zu besonders starker 6A10-bedingter Wachstumsverzögerung	80
3.2.5	Die Kolokalisation der Signale zweier verschiedener optischer Bildgebungsverfahren verifiziert die Bindung des 6A10 an Tumorgewebe.....	84
3.2.6	Mithilfe von ex-vivo-Analysen konnten makroskopisch unauffällige Organe hochauflösend auf Metastasen untersucht werden.....	85
3.3	<i>Gewinnung und Charakterisierung Tumor-gerichteter monoklonaler Antikörper</i>	87
3.3.1	Screening und Auswahl geeigneter Hybridome mithilfe der reversen Immunisierungs-Methode.....	88
3.3.1.1	Identifizierung und Bestätigung Tumor-reaktiver Antikörper.....	88
3.3.1.2	Der Antikörper 13C8 erkennt das Antigen MelCAM (CD146).....	90
3.3.1.3	Der Antikörper 8F2 erkennt das Antigen Integrin $\alpha 3$	93
3.3.1.4	Der Antikörper 2A4 erkennt wahrscheinlich das Protein Integrin αV	95
3.3.1.5	Der Antikörper 3A10 erkennt wahrscheinlich das Protein Integrin $\beta 3$	96
3.3.1.6	Der Antikörper 12E12 erkennt das Antigen Protein 14-3-3 zeta/delta	97
3.3.1.7	Der Antikörper 23E12 erkennt das Antigen Hsp90.....	99
3.3.2	Generierung von vier Carboanhydrase IX-spezifischen Antikörpern mit der zielgerichteten Immunisierungs-Methode	102
4	<i>DISKUSSION</i>	105
4.1	<i>Carboanhydrasen, Mikroumgebung und evolutionäre Medizin</i>	105
4.2	<i>Die in vivo-Inhibierung der Carboanhydrase XII bietet Möglichkeiten, neue bildgebende Verfahren mit Therapieformen durch konjugierte Antikörper zu kombinieren</i>	111
4.3	<i>Zwei auf Onkosomen-basierte Immunisierungs-Methoden zur Generierung neuer Tumor-reaktiver monoklonaler Antikörper</i>	114
5	<i>ZUSAMMENFASSUNG</i>	118
	<i>SUMMARY</i>	120
6	<i>ANHANG</i>	122
7	<i>LITERATURVERZEICHNIS</i>	124
8	<i>ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS</i>	141
9	<i>LEBENS LAUF</i>	142
10	<i>DANKSAGUNG</i>	143

1 EINLEITUNG

1.1 Krebs in Deutschland

Jedes Jahr erkranken in Deutschland rund 460.000 Männer und Frauen mit einem durchschnittlichen Alter von 69 Jahren an Krebs. Jeder zweite Mann und fast jede zweite Frau muss damit rechnen, im Laufe des Lebens an Krebs zu erkranken (Robert-Koch-Institut et al. 2012); ähnliche Zahlen gelten für alle industrialisierten Länder (Siegel et al. 2012). Damit ist Krebs eine der häufigsten Todesursachen, wobei die meisten Patienten an den Folgen der Metastasen, seltener am Primärtumor sterben (Klein 2009, Stock and Schwab 2009, Loeb 2011). Die meisten Krebserkrankungen sind epithelialen Ursprungs, also Karzinome. Dabei handelt es sich wiederum in 70% der Fälle um Adenokarzinome, der Rest sind Plattenepithelkarzinome und kleinzellige Karzinome, wie z.B. der Lunge. Neben den genannten Karzinomen kommen auch Melanome, Leukämien und Lymphome im Bereich von jeweils etwa 3% relativ häufig vor (Abb 1.1). Seltener Krebsformen gehen beispielsweise vom Bindegewebe aus, wie Mesotheliome und verschiedene Sarkome, oder haben einen neurologischen Ursprung. Wie Abbildung 1.1B zeigt, sind deshalb die Karzinome die häufigsten krebssbedingten Todesursachen (Robert-Koch-Institut et al. 2012).

Von 1980 bis 2006 hat in Deutschland die Zahl der jährlich neu aufgetretenen Krebserkrankungen bei Frauen um 35 %, bei Männern um mehr als 80 % zugenommen. Diese hohe Zahl kommt hauptsächlich durch das zunehmende Durchschnittsalter der Bevölkerung in Deutschland zustande. Betrachtet man die altersstandardisierten Werte insbesondere jüngerer Jahrgänge, ergeben sich seit 1999 abnehmende krebssbedingte Sterberaten bei beiden Geschlechtern (Robert-Koch-Institut et al. 2012). Dennoch ist die klinische Prognose für Karzinompatienten nach wie vor nicht zufriedenstellend, so dass die Suche nach besseren Therapien einen hohen wissenschaftlichen und gesellschaftlichen Stellenwert besitzt.

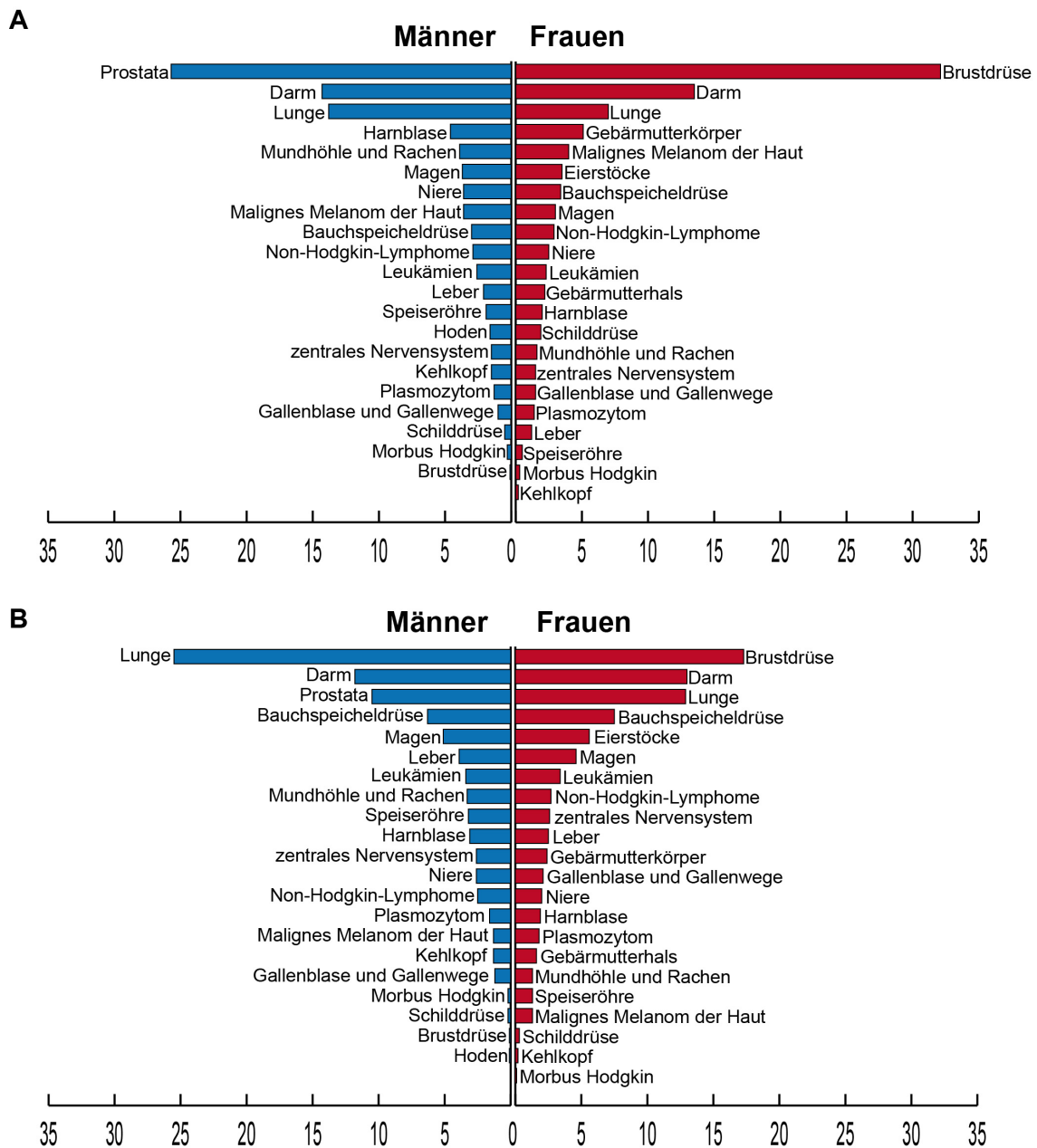


Abb 1.1 Krebs in Deutschland

(A) Die häufigsten Krebserkrankungen und (B) die häufigsten krebisbedingten Sterbefälle (je-
weils in Prozent aller Krebserkrankungen bzw. krebisbedingten Sterbefälle) in Deutschland.
Übernommen aus Krebs in Deutschland 2007/2008 (Robert-Koch-Institut, 2012).

1.2 Evolutionäre Dynamik der Karzinogenese

1.2.1 Klonale Evolution und Ökosystem Krebs

Krebs ist eine Erkrankung klonalen Ursprungs (Merlo et al. 2006). Jeder Tumor kann mit einem Ökosystem verglichen werden, das von physikalischen, physiologischen und metabolischen Faktoren beeinflusst wird. Dabei setzt sich das "Ökosystem Krebs" aus Tumorzellen, myo-epithelialen Zellen, Stromazellen, Tumor-assoziierten Fibroblasten und verschiedenen inflammatorischen Zellen wie Tumor-assoziierten Makrophagen zusammen (Pienta et al. 2008, Gillies et al. 2012). All diese Zellklassen bilden die lebendigen Komponenten dieses Ökosystems, die miteinander über lösliche und unlösliche Faktoren interagieren. Unlösliche Faktoren sind z.B. die Proteine der extrazellulären Matrix, lösliche sind unter anderen Sauerstoff, Metaboliten, Hormone, Chemokine und Cytokine. Gillies und Kollegen führten dazu eine treffende Metapher an, nach der man sich Tumoren als Kontinente vorstellen kann, die durch multiple zelluläre Spezies bevölkert werden, welche sich an regionale Variationen der selektiven Umwelteinflüsse anpassen (Gillies et al. 2012). Nowell und Cairns postulierten Mitte der siebziger Jahre des vergangenen Jahrhunderts, dass genomische Instabilität, welche mit der Generation und Selektion von Mutationen einhergeht, zu einer schrittweisen Karzinogenese beiträgt. Sie äußerten damit als Erste die Idee, dass Krebs auf somatischer Evolution beruht (Cairns 1975, Nowell 1976, Loeb 2011). Jahrzehnte später wurde allgemein akzeptiert, dass die Entstehung von Krebs als ein der Darwinschen Evolutionstheorie folgender Prozess beschrieben werden kann (Loeb 2011). Die Vererbbarkeit von Variationen, die den Erfolg der Reproduktion betreffen, sind im Prinzip in einer Population notwendig und ausreichend für die natürliche Auslese (Franklin and Lewontin 1970). Gerlinger und Swanton formulierten 40 Jahre später drei evolutionäre Grundprinzipien, nach denen die natürliche Selektion im Sinne der sogenannten somatischen Evolution stattfinden kann. Erstens müssen individuelle Variationen in der Population vorkommen, welche zweitens vererbbar sein müssen. Das dritte Prinzip ist die logische Folge daraus, nämlich dass Variationen zwischen Individuen zu differenziellem Überleben und Reproduktionserfolg (Fitness) führen (Gerlinger and Swanton 2010).

Im Falle von Krebs sind diese Variationen im Wesentlichen auf genetische Instabilität zurückzuführen, ohne die sich die Mutationsrate von normalen Zellen und Tumorzellen kaum unterscheidet (Jones et al. 2008). Sind einzelne Tumorzellpopulationen mit gleichem genetischen Ursprung weit voneinander entfernt im Gewebe verteilt, ist die Wahrscheinlichkeit einer divergenten Evolution hoch und die Wahrscheinlichkeit, dass der Tumor durch eine einzige systemische Therapie zu behandeln ist, gering (Maley et al. 2004).

Das Konzept der klonalen Evolution beinhaltet, dass ein Zellklon durch Anreicherung von somatischen Mutationen die Fähigkeit erwirbt unkontrolliert zu proliferieren (Stratton et al. 2009). Zu diesen Mutationen zählen Substitutionen einzelner Basen, Insertionen und Deletionen, Translokationen, strukturelle Veränderungen, abnormale Kopienzahl der Chromosomen (Aneuploidie), sowie epigenetische Veränderungen, wie z.B. Modifikationen des Methylierungsmusters von Cytosinen und Histonen (Laird 2005). Diese Veränderungen werden unter den Begriffen genetische und chromosomale Instabilität zusammengefasst.

Einige dieser Mutationen sind bereits in den Keimbahnzellen präsent und damit in allen somatischen Zellen vorhanden. Zusammen mit neu erworbenen Mutationen durch exogene DNA-schädigende Einflüsse kann ein neoplastischer Klon entstehen, der erfolgreich eine ökologische Nische besetzt. Diese Gründer-Zelle proliferiert nun unkontrolliert, was man auch als klonale Expansion bezeichnet (Pienta et al. 2008). Dieser sogenannte Gründereffekt ist neben dem Flaschenhalseffekt einer der wichtigsten direkten Auswirkungen einer stringenten Selektion, beispielsweise durch sich genotoxisch auswirkende Azidose oder eine Chemotherapie. Häufig sind diese selektiven Umwelteinflüsse so stark, dass nur eine kleine Tumorzellpopulationen sie überlebt und den Flaschenhals überwindet. Beide Effekte sind in der Evolution sowohl ganzer Organismen als auch somatischer Populationen sehr häufig und führen dazu, dass wenige Tumorzellen ihr gesamtes genetisches Repertoire durchsetzen und an ihre Tochterzellen vererben, die folglich die Gesamtpopulation dominieren und die Evolution des nun weniger heterogenen Tumors in eine neue Richtung lenken.

Nach aktueller Konvention werden Mutationen, welche das Überleben (die genetische Fitness) der Zellen positiv beeinflussen, als "*driver*"-Mutationen und solche, die keinen direkten Einfluss auf den Phänotypen haben als "*passenger*" oder "*hitch-hiker*"-Mutationen bezeichnet, weil sie durch die Begünstigung gewisser Klone durch "*driver*"-Mutationen mitexpandiert werden (Smith and Haigh 1974, Gillies et al. 2012). Diese Konvention kann aber irreführend sein, weil eine "*passenger*"-Mutation plötzlich an Bedeutung gewinnen und zu einer "*driver*"-Mutation werden kann. Dies spiegelt ein weiteres Grundprinzip der Evolution wider, die Diversifikation. Tumoren sind demnach per se heterogen. Die natürliche Selektion begünstigt die am besten angepassten Zellen, welche das "Tumor-Ökosystem" definieren (Gillies et al. 2012).

Ein wenig beachtetes Prinzip der natürlichen Auslese ist laut Gillies und Kollegen, dass die Natur nach dem Phänotyp, nicht aber nach dem Genotyp selektioniert, weil nur phänotypische Veränderungen von dem lokalen Selektionsdruck abhängig sind (Gillies et al. 2012). So können nahezu identische Phänotypen aus verschiedensten genetischen Mutationen entstehen (Loeb 1991, Gillies et al. 2008, Loeb 2011). Durch genetische

sche Veränderungen in wichtigen “*checkpoints*” der DNA-Reparatur-Mechanismen und Zellzykluskontrolle wird etwa ein Phänotyp induziert, der mit Hypoxie, Generierung von *reactive oxygen species* (ROS) und Azidose einhergeht. Laut Nishimura und Kollegen sind ROS und verwandte Moleküle wahrscheinlich die wichtigsten Agenzien, die endogene DNA-Schädigung verursachen (Nishimura and Watanabe 2006).

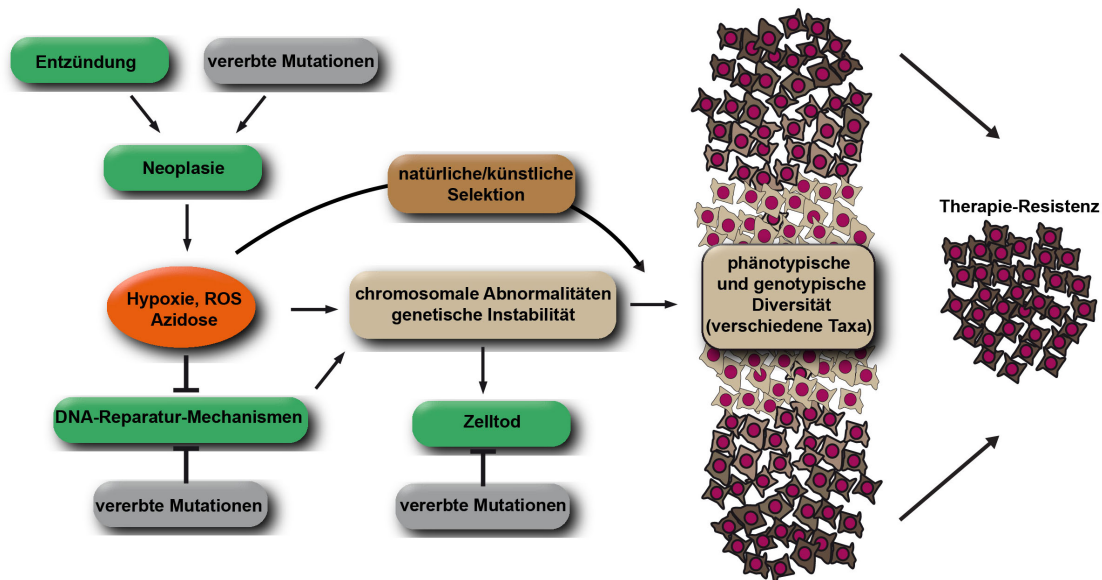


Abb. 1.2 Somatische Evolution

Die Kombination aus Entzündung, vererbter und neu erworbener Mutationen kann Neoplasien induzieren, welche ab einer gewissen Größe hypoxisch werden. Als Folge des veränderten Stoffwechsels entstehen Azidose und ROS (*reactive oxygen species*), welche DNA-Reparatur-Mechanismen hemmen können und damit direkt zu chromosomalen Aberrationen und genetischer Instabilität führen. Diese schädlichen Einflüsse führen normalerweise zum Zelltod. Durch Selektionsdruck, der von der lokalen Tumormikroumgebung (natürliche Selektion) ausgeht bzw. künstlicher Selektion durch Chemo- und Strahlentherapien, entstehen sowohl genotypische als auch damit verbundene phänotypische Varianten der entarteten Zellen. Trotz Therapie werden bei besonders hoher phänotypischer Diversität Therapie-resistente Klone auswachsen und sich ausbreiten. Von einem evolutionären Standpunkt aus stellen diese unterschiedliche Taxa dar, welche einen malignen Phänotyp annehmen. Modifiziert nach Greaves and Maley (2012).

Auf Einzelzellniveau entsteht genomische Instabilität durch Umweltstress. Die meisten Zellen sterben durch diesen ausgesprochen starken Selektionsdruck. Die “Gewinner” überleben und bilden aggressive Phänotypen aus. Die meisten auftretenden Tumoren sind mit chronischen Entzündungsreaktionen assoziiert (Grivnickov et al. 2010, Hanahan and Weinberg 2011), die Zytokin-induzierte Hyperplasie und ROS-vermittelten Zelltod auslösen. Wenn Hyperplasien zu Karzinomen auswachsen, werden sie irgendwann durch ihre Entfernung von den Blutgefäßen hypoxisch und ihr Stoffwechsel stellt sich auf Glykolyse um (Gatenby and Gillies 2004). Die Folge dieses veränderten Stoffwechsels ist Azidose (Chiche et al. 2010a), so dass im Zuge des Tumorwachstums der extrazelluläre pH in soliden Tumoren bis auf einen Wert von nur pH 5,8 sinken kann (van Sluis et al. 1999, Lindner and Raghavan 2009). Hypoxie, Azi-

dose und die daraus resultierende genomische Instabilität (Morita et al. 1992) üben einen starken Selektionsdruck auf Tumorzellen aus (Abbildung 1.2) (Gatenby and Gillies 2004, Gatenby and Gillies 2008).

1.2.2 Azidose und Überlebensvorteil durch membranständige Carboanhydrasen

Sauerstoffmangelversorgung (Hypoxie) ist ein in soliden Tumoren häufig auftretender Zustand, der dem ungeordneten, wuchernden Wachstum maligner Zellen und ihrer Entfernung zu den Blutgefäßen geschuldet ist. Folglich decken Tumorzellen einen Teil ihres Energiebedarfs durch Glykolyse, was zu einer Anreicherung saurer Metaboliten wie Laktat und CO_2 führt (Gatenby and Gillies 2004, Lindner and Raghavan 2009, Chiche et al. 2010a). Erhöhte Glykolyse-Raten werden allerdings nicht ausschließlich Hypoxie-bedingt induziert. So kontrolliert auch p53 die Glykolyse durch Regulation von TIGAR (*TP53-induced glycolysis regulator*) und SCO2 (*synthesis of cytochrome c oxidase*) (Madan et al. 2011). Ist p53 mutiert, was in ca. 50% der Tumoren der Fall ist (Madan et al. 2011), wird die Glykolyse selbst in der Nähe von Blutgefäßen nicht mehr inhibiert (Salminen and Kaarniranta 2010).

Die Energiegewinnung durch Glykolyse unter aeroben Bedingungen bezeichnet man nach ihrem Entdecker als „Warburg Effekt“ (Warburg 1956, Gatenby and Gillies 2004). Die entstehenden Produkte tragen entscheidend zur Ansäuerung des extrazellulären pH (pHe) bei. In Folge des Tumorwachstums entstehen ein Protonen-Gradient von den Blutgefäßen zu den nekrotischen Bereichen und ein entgegen gesetzter Sauerstoffgradient. Folglich steigt die Protonenkonzentration an, je weniger Sauerstoff den Zellen zur Verfügung steht (Chiche et al. 2010a). Unbestritten führt die zunehmende Azidose zu einer für den Patienten ungünstigen Prognose. Einer der Gründe hierfür ist die Degradierung der extrazellulären Matrix im Gewebe durch Säure-induzierte Matrix-Metalloproteinasen (MMPs) (Martinez-Zaguilan et al. 1996, Glunde et al. 2003). Dies ermöglicht invasives Wachstum und erhöht die Wahrscheinlichkeit der Metastasenbildung durch vereinfachtes „Entkommen“ einzelner Tumorzellen aus dem primären Tumorzellverband. Damit trägt Hypoxie entscheidend zu einem invasiv-wachsenden und metastasierenden Phänotyp bei (Bertout et al. 2008).

Durch den metabolischen Wechsel von der oxidativen Phosphorylierung zur Glykolyse, und der damit einhergehenden Azidose im extrazellulären Milieu, setzen sich in soliden Tumoren Zellen durch, die trotz extrazellulärer Azidose ihren intrazellulären pH (pHi) im leicht alkalischen Bereich von 7,2 - 7,5 (Lindner and Raghavan 2009) aufrechterhalten können; eine für das Überleben der Zellen essentielle Funktion. So hängt z.B. die Energiegewinnung entscheidend vom pHi ab, da zentrale Enzyme der Glykolyse wie

die Hexokinase und die Phosphofructokinase pH-sensitiv sind. Sie katalysieren den Transfer einer Phosphatgruppe von ATP auf Glucose bzw. Fructose-6-Phosphat und damit eine nukleophile Substitution, die bei niedrigem pH_i nicht stattfinden kann (Berg et al. 2003).

Stock und Schwab schlugen ein Modell vor, das die Abhängigkeit der Tumorzellen von einem sauren pH_e verdeutlicht. Demnach ist diese so groß, dass die der invasiven Region zugewandten Seite der Tumorzellen eine zelluläre Polarität aufweist. Diese entsteht, indem sich die Schlüsselproteine der pH-Regulation entlang eines intrazellulären pH-Gradienten sammeln. Unter diesen Proteinen befinden sich die CA IX, AE2, NBC, MCT4, NHE (Stock and Schwab 2009) und in vielen Fällen auch die CA XII, deren Funktion in den nächsten beiden Kapiteln erörtert wird.

1.2.3 Wichtige Komponenten der Tumor-assoziierten pH-Regulation

Charakteristische Merkmale der Tumormikroumgebung sind die Hypoxie-bedingte Azidose und die Fähigkeit maligner Zellen zu invasivem Wachstum, die Hochregulierung des glykolytischen Stoffwechsels und pH-regulierender Ionenkanäle und Transporter. Dieser Abschnitt fasst die wichtigsten pH-Regulationsmechanismen der Tumorzelle zusammen, die für die Aufrechterhaltung eines konstanten und leicht basischen pH_i essentiell sind. All diese Ionenaustauscher, Transporter-Proteine und Enzyme dienen letztendlich dazu, den intrazellulären pH-Wert zu erhöhen, im Gegenzug den extrazellulären pH zu senken und durch Co-Transport den Austausch von unterschiedlich geladenen Ionen zu ermöglichen, sodass sich die Netto-Ladung der Zelle nicht ändert. Abbildung 1.3. fasst die wichtigsten pH-Regulations-Mechanismen in Tumorzellen zusammen.

Der durch Hypoxie stabilisierte Transkriptionsfaktor HIF1 stimuliert z.B. die Glykolyse durch Hochregulierung des Glukose-Transporters GLUT1 und glykolytischer Enzyme wie der Aldolase A, der Lactatdehydrogenase A und der Phosphofructokinase (Semenza 2003). Die Folge der veränderten Energiegewinnung durch Glykolyse ist eine massive Produktion von Laktat. Pyruvat ist das Endprodukt der Glykolyse, bei der pro Molekül Glukose nur 2 Moleküle ATP entstehen. Dagegen entstehen durch oxidative Phosphorylierung aus einem Molekül Glukose 36 Moleküle ATP (Berg et al. 2003). Dieser reguläre Stoffwechselweg, der in den Mitochondrien stattfindet, ist in Tumorzellen allerdings, wie oben beschrieben, gehemmt.

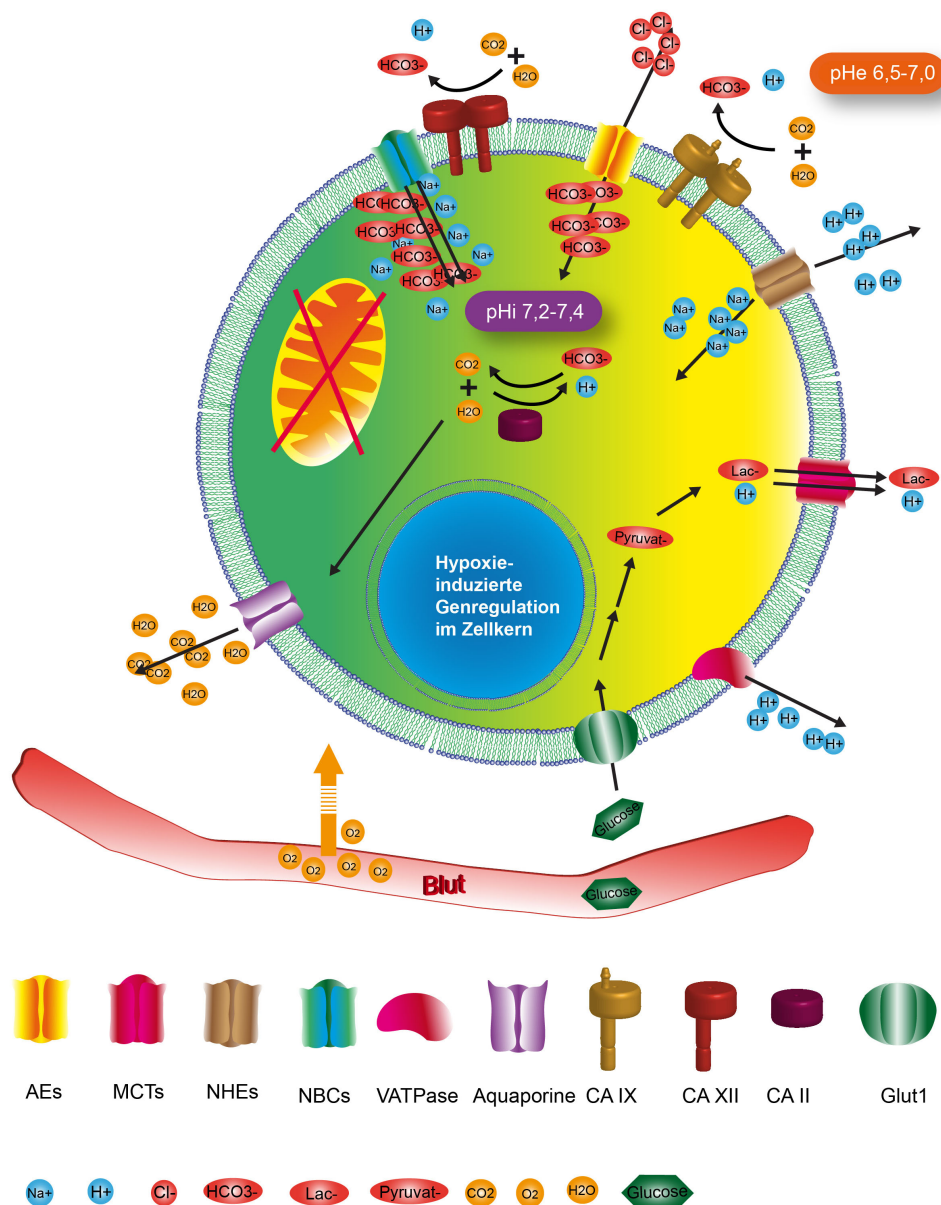


Abb. 1.3 pH-Regulationsmechanismen in Tumorzellen

Übersicht der wichtigsten pH-regulierenden Proteine, welche direkt oder indirekt den pH-Wert in der Tumorzelle beeinflussen und damit gleichzeitig auch den extrazellulären pH-Wert entscheidend verändern.

Durch den Pasteur-Effekt, der durch die Entfernung zu den nächsten Blutgefäßen (symbolisiert durch den orangefarbenen Pfeil) entsteht, wird verstärkt Glucose im Zuge der Glykolyse in Pyruvat abgebaut und von der Lactatdehydrogenase in Laktat umgewandelt. Der Glukose-Transporter Glut1 sorgt für den Import der Glucose aus der Umgebung. Monocarboxylat-Transportproteine sorgen für den Export von Laktat und Protonen. Na⁺/H⁺-Austauscher (NHEs) sind Kationenaustauscher, die Protonen exportieren und im Gegenzug Natriumionen importieren. Sie tragen direkt zur Senkung des extrazellulären pH-Wertes (pHe) bei. Die Tumor-assoziierten Carboanhydrasen IX und XII katalysieren die Hydrierung von Kohlendioxid, wodurch Protonen frei werden, die ebenfalls den pHe senken. Das dabei gebildete Bicarbonat wird von räumlich benachbarten Anionen-Austauschern (AEs) gegen Chloridionen ausgetauscht oder zusammen mit Natriumionen durch Na⁺/HCO₃⁻-Co-Transporter (NBCs) importiert, wo sie den stoffwechselbedingten sauren pHi erhöhen. Die ubiquitär exprimierte Carboanhydrase II dehydriert das Bicarbonat wieder, wodurch CO₂ und Wasser entstehen. CO₂ und Wasser können durch Aquaporine in beide Richtungen diffundieren. Des weiteren werden Protonen unter ATP-Verbrauch mittels der Protonen-Pumpe V-ATPase aktiv aus der Tumorzelle geschleust. Damit schaffen Tumorzellen ein überlebenswichtiges intrazelluläres Milieu und verändern das extrazelluläre Milieu zu ihrem Vorteil. Kationen sind blau, Anionen rot, neutrale Moleküle orange und Glukose grün dargestellt um zu veranschaulichen, dass mit der pH-Regulation auch die Potentialhomöostase erhalten wird.

Trotz der schlechten Energiebilanz nutzen Tumorzellen Glykolyse zur Energiegewinnung, weil sie dadurch einen Wachstumsvorteil gegenüber anderen Zellen besitzen, die bei zu geringer Sauerstoffzufuhr sterben (Gatenby and Gillies 2004).

Um sich durch ihren veränderten Stoffwechsel und der damit verbundenen übermäßigen Säureproduktion nicht selbst zu vergiften, müssen Tumorzellen effizient Säure exportieren. Dies gelingt durch die ubiquitäre Expression von Wachstumsfaktor-induzierten Kationenaustauschern (Wakabayashi et al. 1997, Counillon and Pouyssegur 2000), wie NHEs, die Natriumionen gegen Protonen austauschen (Rich et al. 2000, Reshkin et al. 2003, Cardone et al. 2005, Parks et al. 2011). Auch Monocarboxylat-Transporter (MCTs) spielen eine wichtige Rolle, indem sie Laktat und Protonen aus der Tumorzelle schleusen. Die zwei wichtigsten Proteine dieser Familie sind MCT1, welches ubiquitär in allen Geweben exprimiert ist, und MCT4, welches in stark glykolytischen Geweben, wie den Muskeln und in hypoxischen Tumoren gefunden wurde (Parks et al. 2011). MCTs können Laktat bidirektional transportieren und so, je nach Bedarf, für einen konstanten pH_i sorgen. Darüber hinaus können Zellen auch durch die Aktivität von ATP-abhängigen V-ATPasen aktiv überschüssige Protonen aus der Zelle transportieren (Martinez-Zaguilan et al. 1993).

Einige der wichtigsten pH_i -regulierenden Systeme sind die Bicarbonat-Transporter und -Austauscher. Sie sind eng mit tumorassoziierten, membranständigen Carboanhydrasen (CAs) gekoppelt, welche alkalisches Bicarbonat produzieren, das unmittelbar nach seiner Bildung durch diese Transporter importiert wird. So bilden diese Enzyme eine funktionelle Einheit, die es den Zellen ermöglicht, den toxischen Effekten der Azidose zu widerstehen (Chiche et al. 2010a, Parks et al. 2011). Schließlich werden die CA IX und CA XII in hypoxischen Regionen oft ko-exprimiert und tragen mit der extrazellulären Produktion von Bicarbonat entscheidend zur Ansäuerung des pH_e bei, während das von ihnen produzierte Bicarbonat von den eng mit ihnen assoziierten Bicarbonat-Transportern in die Zelle importiert wird um den pH_i zu erhöhen. Das importierte Bicarbonat wird durch die zytoplasmatische CA II erneut mit einem Proton zusammen zu Kohlendioxid und Wasser umgesetzt. Die zytoplasmatische CA II reagiert auf das Verhältnis von Protonen zu Bicarbonat und katalysiert die entsprechende Hin- bzw. Rückreaktion um den pH_i konstant zu halten (Chiche et al. 2010a). Dabei gelangen überschüssige CO_2 -Moleküle durch passive Diffusion und in besonders effizienter Weise über Aquaporine, wie z.B. Aqp1, in den extrazellulären Raum, wo sie erneut zur Bicarbonatbildung durch CAs beitragen können. Läuft dieser Prozess über einen längeren Zeitraum ungehindert ab, folgt daraus zwangsläufig ein weitgehend konstanter, leicht alkalischer pH_i und ein zunehmend sauer werdender pH_e (Stock and Schwab 2009, Parks et al. 2011).

Die zusätzlichen Hypoxie-induzierten pH-Regulationsmechanismen im Zusammenspiel mit den konstitutiv exprimierten Systemen führen alles in allem zu einer verbesserten Säureresistenz, durch die Tumorzellen in einer Mikroumgebung überleben können, in der normale Zellen sterben würden (Gatenby and Gillies, 2004; Gatenby et al., 2006; Fang et al., 2008). Weitere Konsequenzen dieses sauren und hypoxischen Mikroklimas sind z.B. die Beeinträchtigung der antitumoralen Immunantwort durch Hemmung der natürlichen Killerzellen (NK-Zellen) (Lardner 2001) und Anergisierung von zytolytischen T-Lymphozyten (Calcinotto et al. 2012). Außerdem wird Azidose mit multipler Medikamentenresistenz in Verbindung gebracht, weil viele schwach basische Arzneien neutralisiert werden und sich auf beiden Seiten der Membranen gemäß der Henderson-Hasselbach-Gleichung verteilen, wodurch sich schließlich mehr neutralisierte Drogen-Moleküle aufgrund des sauren extrazellulären pH-Wertes außerhalb der Membran befinden. Dies kann letztendlich die therapeutische Wirksamkeit solcher Arzneien beeinträchtigen (Sauvant et al. 2008, Wojtkowiak et al. 2011). Folglich wäre eine therapeutische Intervention der pH-Regulation ein effektiver Weg, um Tumorzellen zum Absterben zu bringen (Chiche et al. 2009, Harguindey et al. 2009, Neri and Supuran 2011, Parks et al. 2011).

Eine interessante und zugleich simple Idee für solch eine Therapie wurde erstmals von Robey und Kollegen umgesetzt. Sie konnten in einem Mausmodell zeigen, dass hohe Mengen Bicarbonat im Trinkwasser die Metastasierung von Brust- und Lungenkrebszellen eindrucksvoll unterdrückte. Darüber hinaus verlängerte sich die Überlebenszeit der Tiere signifikant. Die Autoren zeigten damit, dass durch die Erhöhung des pH-Wertes die Ausbreitung von Mikrometastasen verhindert wurde (Robey et al. 2009). Die Therapie schien aber keinerlei Wirkung auf das Wachstum der Primärtumoren zu haben. Um diese paradoxe Situation zu klären sind weitere Untersuchungen erforderlich.

Trotz guter Fortschritte im Verständnis der Tumor-assoziierten pHi-Regulation ist eine Therapie ohne lückenlose Aufklärung dieser Mechanismen nicht sinnvoll. Die meisten Daten der letzten Jahren deuten darauf hin, dass durch pHi-Deregulation zwar eine Reduktion der Proliferation, aber keine vollständige Tumoreliminierung erreicht wird, was womöglich am unvollständigen Verständnis des pHi-regulierenden Mechanismus liegt (Parks, Chiche et al. 2011).

1.2.4 Die Rolle der Tumor-assoziierte Carboanhydrasen IX und XII

Die Carboanhydrasen (CAs) sind Zink-Metallo-Enzyme, die die Dehydrierung von Bicarbonat zu CO₂ katalysieren. In Säugetieren kennt man 13 aktive und 3 inaktive Isozyme (Neri and Supuran 2011) (siehe auch Abbildung 1.4). Allen inaktiven CAs

(VIII, X, XI) fehlt einer der vier konservierten Histidinreste im aktiven Zentrum (Pastorekova et al. 2008). Die CAs IV, CA IX, CA XII und CA XIV sind Plasmamembran-assoziierte Ektoenzyme, während die CAs I, II, III, VII und XIII zytosolische und CA VA und CA VB mitochondriale Isozyme sind. Die CA VI wird sezerniert (Neri and Supuran 2011). In Tumoren katalysieren die CAs die Rückreaktion ($\text{CO}_2 + \text{H}_2\text{O} \leftrightarrow \text{HCO}_3^- + \text{H}^+$), also die Hydratisierung von CO_2 zu Kohlensäure, welche als instabiles Zwischenprodukt in ein Hydrogencarbonat-Ion (meist als Bicarbonat bezeichnet) und ein Proton zerfällt. Je alkalischer der pH-Wert, desto höher ist die Aktivität der Carboanhydrasen. Umgekehrt sinkt sie bei saurem pH, da das CO_2 nur durch das deprotonierte, an Zink gebundene Wassermolekül hydriert werden kann, welches bei niedrigem pH nicht so leicht entsteht (Berg et al. 2003).

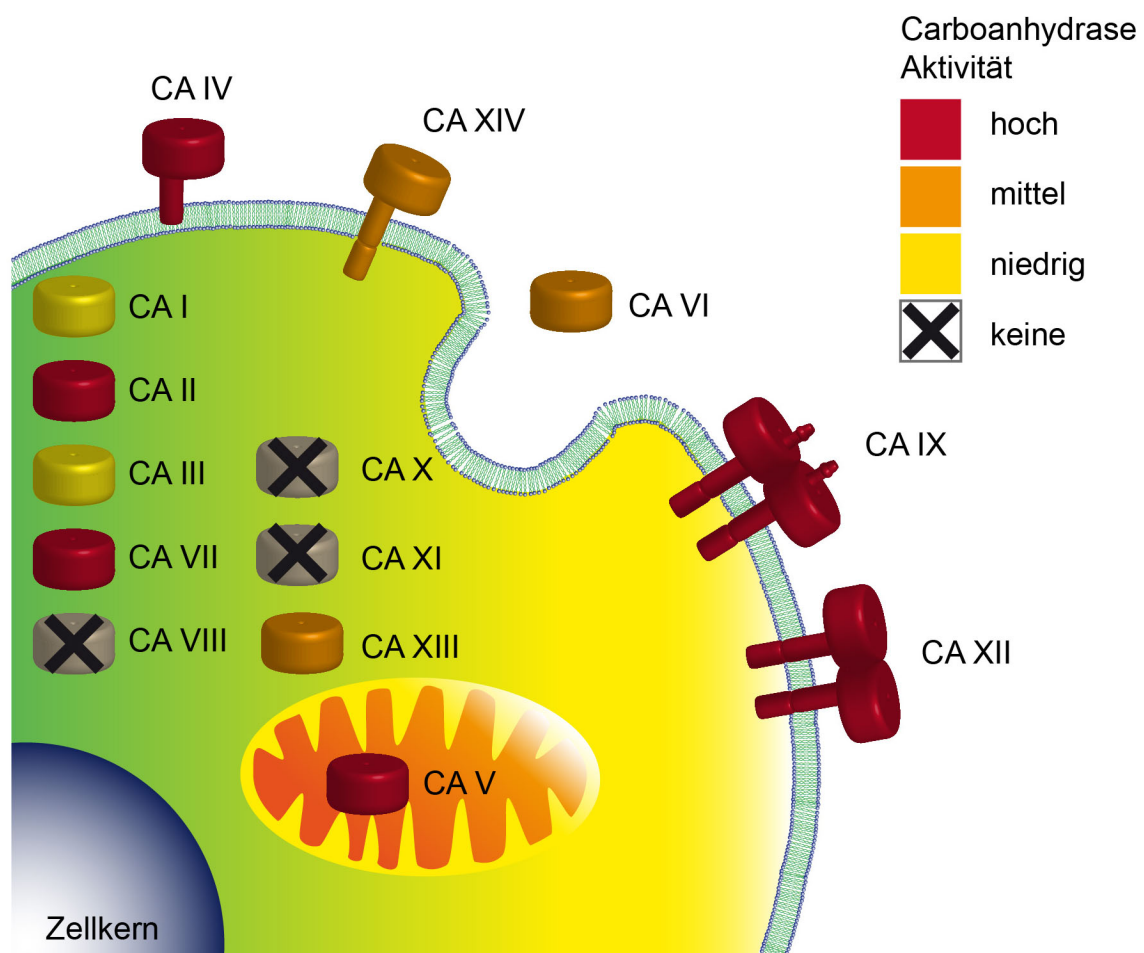


Abb. 1.4 Verschiedene Carboanhydrasen

Man kennt in Primaten 15 Carboanhydrasen (CA). Die zytosomatischen und mitochondrialen Isoformen (CA VA und CA VB sind als CA V dargestellt) bestehen nur aus der CA-Domäne. Die sekretierte CA VI besitzt eine kurze C-terminale Verlängerung. Die membran-assoziierten CAs haben einen Transmembran-Anker und, außer der CA IV, eine zytosolische Domäne. Die CA IX ist die einzige, die eine N-terminale Proteoglykan-Domäne besitzt, die Zell-Zell-Kontakte ermöglicht und für die erhöhte katalytische Aktivität bei saurem pH verantwortlich ist. Die Tumor-assoziierten transmembranen Ektoenzyme CA IX und XII liegen als einzige Carboanhydrasen als Dimere vor. Die relative enzymatische Aktivität der einzelnen Isoformen ist farbkodiert dargestellt. Die Carboanhydrasen (CA VIII, CA X, CA XI) sind akatalytisch. Modifiziert nach (Pastorekova and Zavada 2004).

1.2.4.1 Carboanhydrase IX

Die CA IX ist mit einem kcat/km-Wert von $1,5 \times 10^8$ /M/sec, zusammen mit der zytosolischen CA II, die Carboanhydrase mit der höchsten Aktivität (De Simone and Supuran 2010). Die hohe Aktivität ist mit der Präsenz einer Proteoglycan-Domäne (PG), die unter den Carboanhydrasen nur die CA IX besitzt, assoziiert (Hilvo et al. 2008). Diese Domäne sorgt zudem dafür, dass die CA IX auch bei niedrigerem pH noch gut funktioniert (Alterio et al. 2009), wie er in vielen soliden und hypoxischen Tumoren zu finden ist (Gatenby and Gillies 2004). Folglich wird die CA IX in vielen soliden Tumoren exprimiert (Swietach et al. 2008, Chiche et al. 2009). Die CA IX ist ein besonders interessantes Tumor-assoziiertes Antigen, da es nur in wenigen Normalgeweben vorkommt, (Alterio et al. 2009, Takacova et al. 2013). Zu diesen Normalgeweben gehören die Epithelien der Magenschleimhaut, der Gallengänge und des Dünndarms, sowie die Krypten des Zwölffingerdarms (Pastorekova et al. 1997, Saarnio et al. 1998, Ivanov et al. 2001). In vielen Tumoren wie z.B. Gehirntumoren (Jarvela et al. 2008), kolorektalen Karzinomen (Niemela et al. 2007), Magenkarzinomen (Chen et al. 2005), Bauchspeicheldrüsenkarzinomen (Juhász et al. 2003), Ovarialkarzinomen (Hynninen et al. 2006) und Mammakarzinomen (Bartosova et al. 2002) ist die CA IX dagegen hoch exprimiert.

Die hohe Expression und Enzymaktivität der CA IX tragen entscheidend zur pH-Regulation in Tumorzellen (Svastova et al. 2004, Pastorekova et al. 2008, Chiche et al. 2009) und damit zu Zellproliferation, Adhäsion und invasivem Wachstum bei (Swietach et al. 2008, Svastova et al. 2012). Im Einklang mit diesen Beobachtungen steht die in zahlreichen Veröffentlichungen beschriebene Ansäuerung des pH_e durch die CA IX-katalysierte Bildung von Protonen, die im extrazellulären Milieu verbleiben (Stock and Schwab 2009, Parks et al. 2011).

Die Überexpression der CA IX unter Hypoxie wird durch den Transkriptionsfaktor HIF (Wykoff et al. 2000) induziert, indem er an *HIF-responsive elements* (HRE) im Promotorbereich der CA IX bindet (Grabmaier et al. 2004, Lau et al. 2007). Dabei induziert HIF1 α , zusammen mit dem konstitutiv exprimierten HIF1 β , die Transkription von Genen mit HRE-Sequenzen, in manchen Fällen auch in Gegenwart von Sauerstoff (Semenza 2003, Pastorekova et al. 2007). In den meisten Fällen aber korreliert die CA IX-Expression mit der von HIF1 α (Chiche et al. 2009) und Hypoxie (Pastorekova et al. 2008). CA IX dient deshalb als guter Surrogat-Marker für Hypoxie (Ord et al. 2005) und besitzt einen hohen diagnostischen Wert (Pantuck et al. 2003, Potter and Harris 2004). Interessanterweise kann die Ektodomäne der CA IX auch im Serum von Tumorpatienten nachgewiesen werden. Die Höhe der Konzentration korreliert dabei direkt mit der schlechteren Überlebensrate der Patienten (Gigante et al. 2012). Generell ist die CA IX-Expression in soliden Tumoren mit einer schlechten Prognose assoziiert

(Giatromanolaki et al. 2001, Chen et al. 2005, Winum et al. 2005, Woelber et al. 2011, Gieling and Williams 2012).

1.2.4.2 Carboanhydrase XII

Die CA XII ist ein weiteres membranständiges Ektoenzym. Sie hat ein Molekulargewicht von 39 kDa (Tureci et al. 1998) und kommt vermutlich in zwei Isoformen vor, welche durch alternatives Spleißen entstehen. Die um Exon 9 verkürzte Form wurde allerdings erst einmal in diffusen Astrozytomen beschrieben (Haapasalo et al. 2008). Die CA XII bildet unter physiologischen Bedingungen Homodimere (Ulmasov et al. 2000, Whittington et al. 2001) und zählt mit einem km/kcat -Wert von $3,5 \times 10^7/\text{M/sec}$ ebenfalls zu den aktivsten Carboanhydrasen (De Simone and Supuran 2010). Damit liegt die Enzymaktivitäten relativ nahe an der Diffusionsgeschwindigkeit, die typischerweise bei 10^8 - $10^9/\text{M/sec}$ liegt. Das bedeutet, dass praktisch jede Begegnung zwischen Enzym und Substrat zu einem Enzymsubstrat-Komplex führt und damit die maximale Effizienz nur durch die Diffusionsgeschwindigkeit limitiert wird (Berg et al. 2003).

Auch die CA XII ist Hypoxie-assoziiert (Pastorekova et al. 2007). Das Enzym wird daher beispielsweise in Tumorzellen mit mutiertem von-Hippel-Lindau-Protein und damit stabilisiertem HIF-1 hoch exprimiert (Latif et al. 1993). Allerdings hat bisher keine Studie direkte Regulation der CA XII durch HIF1 belegt (Pastorekova et al. 2008, Thiry et al. 2008, Chiche et al. 2009). Klar gezeigt wurde dagegen eine CA XII-Induktion durch Östrogen in Osteosarkomzellen (Stossi et al. 2004) und Brustkrebszellen (Barnett et al. 2008). Eine Überexpression des Enzyms spielt auch bei verschiedenen Augenerkrankungen wie dem Glaukom eine wichtige Rolle (Liao et al. 2003). Ein CA XII-Defekt aufgrund von Punktmutationen ist mit der autosomal-rezessiven Erbkrankheit Hyponatriämie assoziiert, einer Elektrolyt-Störung, die mit stark verminderten Natrium-Ionen-Konzentrationen im Blut einhergeht (Muhammad et al. 2011).

CA XII-Expression ist in normalen Geweben zwar häufiger zu finden als CA IX, die Expressionshöhe ist aber meist deutlich geringer als in entsprechenden Tumoren. Per Northern Blot ließ sich CA XII-mRNA in der Niere, im Pankreas, im Kolon, in der Prostata, in den Eierstöcken, im Hoden, in der Lunge und im Gehirn nachweisen (Kivelä et al. 2000). Immunhistologische Untersuchungen ergaben ein positives Signal im Dickdarm, in der Gebärmutter Schleimhaut (Karhumaa et al. 2000), im Pankreas (Kivelä et al. 2000) und in den Nieren (Parkkila et al. 2000). Generell ist die CA XII aber deutlich schlechter untersucht als die CA IX, was u.a. daran liegt, dass lange keine CA XII-spezifischen monoklonalen Antikörper existierten. Erst 2012 publizierten Kobayashi und Kollegen einen neuen CA XII-spezifischen monoklonalen Antikörper, mit dem sie Seren analysierten und eine, im Vergleich zu gesunden Spendern, signifikant erhöhte

CA XII-Konzentration in Lungenkrebs-Patienten fanden (Kobayashi et al. 2012).

CA XII ist ein negativer prognostischer Marker bei astrozytischen Gliomen (Haapasalo et al. 2008) und hoch exprimiert in metastatischen Glioblastomen (Proescholdt et al. 2005), Ovarialkarziomen (Hynninen et al. 2006) und Plattenepithelkarzinomen (Kobayashi et al. 2012). CA XII wurde aber auch als Marker für eine günstige Prognose in Brustkrebs (Watson et al. 2003) und von Nicht-kleinzelligem Lungenkrebs beschrieben (Ilie et al. 2011). Oft wird die CA XII mit der CA IX ko-exprimiert, wie z.B. in Nierenzellkarzinomen (Parkkila et al. 2000) und Ovarialkarzinomen (Hynninen et al. 2006). Das direkte therapeutische Potential einer CA XII-Inhibition wurde erstmals aus einer Arbeit von Hsieh und Kollegen offensichtlich. Sie beobachteten eine Abnahme der Migration von MDA-MB-231 Brustkrebszellen in vitro und eine Wachstumsinhibition in vivo, die mit der Ausbildung weniger Metastasen verbunden war (Hsieh et al. 2010). Schon ein Jahr zuvor hatten Chiche und Kollegen gezeigt, dass der gleichzeitige *knockdown* der CA IX und der CA XII im Tiermodell zu einer dramatischen Tumorstillung von 85% führte, während die Inhibition der CA IX alleine nur eine Inhibition von 40% zur Folge hatte (Chiche et al. 2009). Kürzlich beschrieben Doyen und Kollegen ähnliche Effekte in Sphäroidkulturen in vitro und beobachteten auch eine 75%-ige Zunahme des Zelltodes. Darüber hinaus zeigten sie eine starke Wachstumsinhibition von Tumoren besonders in Kombination mit einer Radiotherapie (Doyen et al. 2012).

Die bisher in vitro und in vivo erhobenen Resultate zeigen, dass die CA IX und XII für ein optimales Tumorstillung wichtig sind. Dementsprechend gilt ihre spezifische Inhibition als attraktive Strategie zur Tumorstillung. Spezifische Hemmstoffe für CA IX und CA XII zu finden, ist eine große Herausforderung für die Forschung (D'Ambrosio et al. 2008, Thiry et al. 2008). Da chemische Substanzen noch zu unspezifisch sind, wären monoklonale Antikörper möglicherweise eine geeignete Form an spezifischen Inhibitoren (Stillebroer et al. 2010).

1.3 Tumorexosomen: Eine Klasse von Mikrovesikeln

Zellen mehrzelliger Organismen kommunizieren miteinander über kurze Peptide, Proteine, Nukleinsäuren, Lipide und andere kleine Moleküle, die an Rezeptoren auf der Oberfläche oder innerhalb von Empfängerzellen binden und dort eine physiologische Reaktion induzieren. In den letzten Jahren mehrten sich Befunde, dass viele dieser Moleküle nicht „frei“ zirkulieren, sondern stattdessen auf oder im Inneren von Mikrovesikeln verschiedenster Größe und Funktion zu finden sind. Solche Vesikel transportieren verschiedene Botenstoffe und sind daher in der Lage, anderen Zellen auch kom-

plexe Botschaften zu überbringen (Vlassov et al. 2012). Eines der bekanntesten Beispiele für solche Vesikel, die von praktisch allen Zellarten aktiv sekretiert werden, sind Exosomen. Exosomen sind kleine Vesikel mit einem Durchmesser von 40-100 nm (Bobrie et al. 2011), die bei Säugetieren und Invertebraten beschrieben wurden. Man findet sie in den meisten Körperflüssigkeiten wie Blut, Urin, Speichel, Samenflüssigkeit, Fruchtwasser, malignen Pleuraergüssen und Ascites-Flüssigkeit, Gelenkflüssigkeit und Muttermilch (Vlassov et al. 2012).

Exosomen knospen aus dem Golgi-Apparat in Endosomen hinein, wo sie so genannte „*multivesicular bodies*“ (MVB) bilden, die durch Fusion mit der Plasmamembran in das extrazelluläre Lumen freigesetzt werden können (Bobrie et al. 2011). Diese Entstehungsart unterscheidet sie von anderen Vesikelarten, wie beispielsweise „*shedding microvesicles*“, welche direkt aus der Plasmamembran knospen (Cocucci et al. 2009). Wegen ihres endosomalen Ursprungs tragen sie Proteine, die am Membrantransport und der Fusion von Zellmembranen beteiligt sind (GTPasen, Annexine, Flotilin), Tetraspanine (CD9, CD63, CD81, CD82), Hitzeschockproteine (Hsp70, Hsp90), und Proteine, die in der Biogenese der MVBs beteiligt sind, wie z.B. Alix und TSG101 (Mathivanan and Simpson 2009). Daneben sind auch Cholesterin, Ceramide und andere Sphingolipide und Phosphoglyceride in den Membranen zu finden (Subra et al. 2007, Trajkovic et al. 2008).

Exosomen bilden eine heterogene Gruppe von Botenvesikeln, die sowohl immunstimulatorische Wirkung haben können (z.B. durch Antigen-Präsentation zur Stimulierung naiver T-Zellen (Luketic et al. 2007)), als auch zu immunsuppressiven Mechanismen beitragen, wie z.B. der Senkung der Proliferationsrate von CD4⁺ und CD8⁺ T-Lymphozyten (Andreola et al. 2002, Clayton et al. 2007) und Natürlichen Killerzellen (NK) (Liu et al. 2006, Clayton et al. 2008). Sie können auch die Differenzierung von T-Lymphozyten zu regulatorischen T-Zellen bewirken (Szajnik et al. 2010).

Besonders in der Tumorimmunologie haben Exosomen in den letzten Jahren große Beachtung erlangt, da sie funktionelle Proteine und RNAs von einer Zelle zur anderen übertragen (Rechavi et al. 2009). Es wurden beispielsweise auch miRNAs im Inneren von zirkulierenden Exosomen in Seren von Tumorpatienten entdeckt, die repräsentativ für jene Tumoren waren, aus denen sie stammen. Man glaubt daher, Exosomen für die Früherkennung von Krebserkrankungen nutzen zu können (Chen et al. 2008, Mitchell et al. 2008).

Leider gibt es bisher keine einheitliche Konvention, wie Exosomen aufzureinigen sind. Die meisten Techniken basieren auf differenziellen Zentrifugations- und Ultrazentrifugationsschritten, die aber vermutlich nicht ausreichen, um Exosomen von anderen

Mikrovesikeln abzutrennen. In den meisten Fällen sollte man daher von Exosomen-angereicherten Präparationen sprechen, die durchaus auch andere Vesikel ähnlicher Größe bzw. Dichte enthalten. Da bei der Auswahl typischer exosomaler Marker relative Einigkeit herrscht, sollten für die Aufreinigung zusätzliche affinitätsspezifische Reinigungsschritte, z.B. auf exosomale Markerproteine wie CD63, TSG101 oder Hsp90, einbezogen werden (Thery et al. 2006, Chen et al. 2010, Vlassov et al. 2012). Von Tumorzellen isolierte Mikrovesikel werden gelegentlich auch als „Onkosomen“ bezeichnet, weil sie mRNAs, miRNAs und Proteine auf andere Zellen übertragen und dadurch zu deren Transformation beitragen können (Lee et al. 2011, D'Asti et al. 2012, Rak and Guha 2012). Trotz der häufig beschriebenen hohen Immunogenität und immunologischen Relevanz von Mikrovesikeln wurde bislang kein Artikel darüber publiziert, Onkosomen zur Immunisierung von Nagetieren und damit zur Generierung neuer Tumor-assoziierten monoklonaler Antikörper zu verwenden.

1.4 Bedeutung monoklonaler Antikörper für die klinische Onkologie

Tumor-spezifische monoklonale Antikörper gewinnen für die Medizin stetig an Bedeutung. Sowohl die Anzahl klinischer Studien mit tumorreaktiven Antikörpern, als auch die Zahl der Neuzulassungen hat im Laufe der letzten zwei Jahrzehnte deutlich zugenommen. Seit 1975 gibt es die Hybridomtechnologie zur Produktion von monoklonalen Antikörpern (Kohler and Milstein 1975), für deren Entdeckung Niels K. Jerne, Georges J.F. Köhler und César Milstein 1984 den Nobelpreis für Medizin erhielten. Anfangs wurden in der klinisch-therapeutischen Anwendung überwiegend murine Antikörper verwendet, welche sich allerdings oft als unwirksam erwiesen (Ober et al. 2001). Dies war im wesentlichen darauf zurückzuführen, dass die behandelten Patienten meist Antikörper gegen die fremden Maus-Proteine entwickelten (Shawler et al. 1985, Kuus-Reichel et al. 1994, Reichert et al. 2005) und dass deren Fc-Teile nur bedingt vom humanen Immunsystem erkannt wurden (Kipps et al. 1985). Heute kann man rekombinant chimärisierte oder humanisierte Antikörper herstellen, bei denen die Subklasse beliebig ausgewählt und post-translational modifiziert werden kann. Diese Antikörper sind nur noch zu einem Teil tierischen Ursprungs und daher weniger immunogen. So sind in humanisierten Antikörpern nur noch die hypervariablen Regionen (auch CDRs, *complementary determining regions* genannt) murinen Ursprungs. Gleichzeitig sind ihre Fc-Fragmente so gewählt, dass sie bei Antigen-Kontakt zu Komplementreaktionen bzw. zytotoxischer Wirkung des zellulären Immunsystems anregen. Sie entstehen mit Hilfe von transgenen Mäusen oder gehen aus Phagen-Display-Technologien hervor (Nelson et al. 2010) und gehören mittlerweile zu der Kategorie von therapeutischen

Antikörpern mit den meisten Neuzugängen in klinische Studien (Reichert 2010).

Tab1.1 Tumor-assoziierte Antigene, gegen die therapeutische monoklonale Antikörper klinisch eingesetzt werden

Antigen Kategorie	Beispiele von Antigenen	Antigen exprimierende Malignome
CD-Antigene	CD20 CD30 CD33 CD52	Non-Hodgkin-Lymphome Hodgkin-Lymphome Akute myeloische Leukämie (AML) Chronische lymphatische Leukämie (CLL)
Glykoproteine und Enzyme	EpCAM CEA gpA33 Mucine TAG-72 Carboanhydrase IX PSMA Folat-bindendes Protein	Epitheliale Tumoren (Brust-, Kolon-, Lungenkarzinom) Epitheliale Tumoren (Brust-, Kolon-, Lungenkarzinom) Kolonrektale Karzinome Epitheliale Tumoren (Brust-, Kolon-, Lungen-, Ovarialkarzinom) Epitheliale Tumoren (Brust-, Kolon-, Lungenkarzinom) Nierenzellkarzinom Prostatakarzinom Ovarialkarzinom
Glykolipide	Ganglioside	Neuroektodermale Tumoren, einige epitheliale Tumoren
Kohlenhydrate	Lewis-Y ²	Epitheliale Tumoren (Brust-, Kolon-, Lungen-, Prostatakarzinom)
Vaskuläre Zielantigene	VEGF VEGFR α V β 3 (CD51/CD61) α 5 β 1 (CD49e/CD29)	Tumor Gefäßsystem Aus Epithel hervorgegangene solide Tumoren Tumor Gefäßsystem Tumor Gefäßsystem
Wachstumsfaktoren	ErbB1/EGFR ErbB2/HER2 ErbB3 c-MET IGF1R EphA3 TRAIL-R1, TRAIL-R2 RANKL	Gliome, Lungen-, Brust-, Kolon-, Kopf-Hals-Karzinom) Brust-, Kolon-, Lungen-, Ovarial-, Prostatakarzinom Brust-, Kolon-, Lungen-, Ovarial-, Prostatakarzinom Epitheliale Tumoren (Brust-, Ovarial-, Lungenkarzinom) Lungen-, Brust-, Kopf-Hals-, Prostata-, Schilddrüsenkarzinome und Gliome Lungen-, Nieren-, Kolonkarzinome, Melanome, Gliome, hämatologische Krebsformen Solide Tumoren, (Kolon, Lunge, Pankreas) und hämatologische Krebsformen Prostatakrebs und Knochenmetastasen
Stromale und extrazelluläre Antigene	FAP Tenascin	Epitheliale Tumoren (Brust-, Kolon-, Lungen-, Kopf-Hals-, Pankreaskarzinome) Gliome, epitheliale Tumoren der Brust und der Prostata

CD, *cluster of differentiation*; CA IX, Carboanhydrase IX; CEA, Carcinoembryonales Antigen; EGFR, *epidermal growth factor receptor*; EpCAM, *epithelial cell adhesion molecule*; EPHA3, Ephrin-Rezeptor A3; FAP, Fibroblasten Aktivierungsprotein; gpA33, Glykoprotein A33; IGF1R, Insulin-ähnlicher Wachstumsfaktor-Rezeptor 1; Ley, Lewis Y-Antigen; PSMA, Prostata-spezifisches Membran-Antigen; RANKL, *receptor activator of nuclear factor- κ B ligand*; TAG-72, Tumor-assoziiertes Glykoprotein 72; TRAILR, *tumour necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand receptor*; VEGF, *vascular endothelial growth factor*; VEGFR, VEGF-Rezeptor. Modifiziert nach (Scott et al. 2012).

Für einige Krebsarten wie Brustkrebs (Baselga et al. 1998, Baselga 2001) (Trastuzumab), Non-Hodgkin-Lymphome (Maloney et al. 1997, Plosker and Figgitt 2003) (Rituximab), chronische lymphatische Leukämie (Ferrajoli et al. 2001, Demko et al. 2008)

(Alemtuzumab), Kolonkarzinom (Hurwitz 2004) (Bevazizumab) und (Giusti et al. 2007, Giusti et al. 2009) (Panitumumab), HNO-Karzinome (Bonner et al. 2006, Curran et al. 2007) (Cetuximab) wurden bereits vielversprechende therapeutische Antikörper entwickelt und zugelassen. Sie haben alle gemeinsam, dass sie tumorassoziierte Antigene (TAA) auf der Zelloberfläche von Tumorzellen erkennen, die dort stark überexprimiert werden, während sie in Normalgeweben nicht oder nur schwach exprimiert sind (Tab.1.1). Damit bilden TAAs spezifische Angriffspunkte auf der Oberfläche von Tumorzellen, die durch diese Antikörper für das Immunsystem markiert („opsonisiert“) werden und durch Effektorfunktionen wie ADCC (*antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity*), überwiegend durch NK-Zellen, CDC (*complement-dependent cell-mediated cytotoxicity*) oder ADCP (*antibody-dependent cellular phagocytosis*), überwiegend durch Makrophagen, eliminiert werden können (Desjarlais and Lazar 2011). Diese Prinzipien gelten je nach Fc-Teil der Antikörper (Scott et al. 2012). Außerdem können diese Effektorfunktionen durch verschiedene Modifizierungen des Fc-Teils, wie z.B. Fucosylierungen, Afucosylierungen und Modifikationen des Peptid-Rückgrats weiter verstärkt werden (Desjarlais and Lazar 2011, Nimmerjahn and Ravetch 2012). Tumorantigene, gegen die es bereits monoklonale Antikörper gibt, sind in Tabelle 1.2 aufgelistet.

Außerdem wird auch an zahlreichen Antikörper-Konjugaten geforscht, von denen viele bereits klinische Anwendung gefunden haben (Tab 1.2). Es gibt Antikörper gekoppelt mit radioaktiven Isotopen wie ^{131}I od oder ^{90}Y ttrium, oder internalisierende Antikörper, die ihre zytotoxische Ladung mit in die Zielzelle nehmen um dort den Zelltod auszulösen (Kirkwood et al. 2012), wie es z.B. im Falle eines in den USA für die Behandlung von akuter myeloischer Leukämie zugelassenen anti-CD33-Antikörpers ist, an den Calicheamicin-Toxin konjugiert ist (Pollard et al. 2012) (siehe auch Tab.1.2).

Tab1.2 Liste aktuell zugelassener monoklonaler Antikörper in der Onkologie und deren Wirkmechanismen

Antikörper	Zielstruktur	FDA-Zulassung für Indikation	Zulassung in Europa	Wirkmechanismus
Unkonjugierte Antikörper; solide Tumoren				
Trastuzumab (Herceptin; Genentech): Humanisiertes IgG1	ERBB2	ERBB2-positiver Brustkrebs, als Monotherapie oder in Kombination mit Chemotherapie als adjuvante oder palliative Behandlung. ERBB2-positives Magen- und Adenokarzinom (AEG) in Kombination mit Cisplatin und Capecitabin oder 5-Fluorouracil.	ähnlich	Inhibierung des ERBB2-Signalweges und ADCC
Bevacizumab (Avastin; Genentech/Roche): Humanisierter IgG1	VEGF	Therapeutikum erster und zweiter Wahl für metastasierenden Darmkrebs zusammen mit 5-Fluorouracil-basierter Chemotherapie; Therapie erster Wahl für NSCLC in Kombination mit Carboplatin und Paclitaxel für jene, die noch keine Chemotherapie erhalten haben. Für Patienten mit Glioblastom, deren Tumor nach Ersttherapie fortgeschritten ist. Zur Behandlung von Nierenkrebs in Kombination mit IFNα.	ähnlich	Inhibierung des VEGF-abhängigen Signalweges
Cetuximab (Erbix; Bristol-Meyers Squibb): Chimäres human-murines IgG1	EGFR	Für die Ersttherapie von lokal fortgeschrittenem SCCHN kombiniert mit Strahlentherapie. Als Monotherapie für Patienten mit SCCHN, deren Platin-basierte Therapie nicht angeschlagen hat. Palliative Behandlung metastasierter, EGFR-positiver kolorektaler Tumoren.	ähnlich	Inhibierung des EGFR-Signalweges und ADCC
Panitumab (Vectibix; Amgen): humanes IgG2	EGFR	Als Monotherapie für die Behandlung von vorbehandelten, EGFR-exprimierenden, metastasierter kolorektalen Tumoren.	ähnlich	Inhibierung des EGFR-Signalweges
Ipilimumab (Yervoy; Bristol-Meyers Squibb): IgG1	CTLA4	Für die Behandlung von inoperablem oder metastasiertem Melanom.	ähnlich	Inhibierung des CTLA4-Signalweges
Unkonjugierte Antikörper; hämatologische Krebserkrankungen				
Rituximab (Mabthera; Roche): chimäres human-murines IgG1	CD20	Für die Behandlung von CD20-positiven B-Zell NHL und CLL und für Erhaltungstherapie von unbehandeltem, follikulärem, CD20-positivem NHL.	ähnlich	ADCC, direkte Induktion der Apoptose und CDC
Alemtuzumab (Campath; Genzyme): humanisiertes IgG1	CD52	Als Monotherapie bei chronischer lymphatischer (B-Zell) Leukämie.	ähnlich	direkte Induktion der Apoptose und CDC
Ofatumumab (Arzerra; Genmab): humanes IgG1	CD20	Für Behandlung von Patienten mit CLL, die nicht auf Fludarabin und Alemtuzumab ansprechen.	ähnlich	ADCC und CDC
Konjugierte Antikörper; hämatologische Krebserkrankungen				
Gemtuzumab ozogamicin (Mylotarg; Wyeth): humanisiertes IgG4	CD33	Für die Behandlung von Patienten mit CD33-positiver AML im ersten Rezidiv (zurückgezogen in 2010).	In der EU nicht zugelassen	Zytotoxisches Wirkstoffkonjugat, Calicheamicin-Toxin
Brentuximab vedotin (Adcertis; Seattle Genetics): chimäres IgG1	CD30	Für die Behandlung von rezidivierendem oder refraktärem Hodgkin-Lymphom und systemischen anaplastischen Lymphom.	In der EU nicht zugelassen	Zytotoxisches Wirkstoffkonjugat, Auristatin-Toxin
Ibiritumab tiuxetan (Zevalin; IDEC Pharmaceuticals): murines ⁹⁰ Y-konjugiertes IgG1	CD20	Behandlung von rezidierten oder refraktären, gut differenzierten oder follikulären B-Zell-NHL.	ähnlich	⁹⁰ Y-Radioisotop
Tositumomab (Bexxar; GlaxoSmithKline): murines ¹³¹ I-konjugiertes IgG2	CD20	Behandlung von Patienten mit CD20 Antigen-exprimierenden rezidierten oder refraktären, gut differenzierten, follikulären oder transformierten NHL.	Orphan Status Medikament (für seltene Erkrankungen) in 2003 in der EU	¹³¹ I-Radioisotop, ADCC und direkte Induktion der Apoptose

ADCC, *antibody-dependent cellular cytotoxicity*; CDC, *complement-dependent cytotoxicity*; CLL, chronische lymphatische Leukämie; AML, akute myeloische Leukämie; CTLA4, *cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4*; EGFR, *epidermal growth factor receptor*; FDA, *US Food and Drug Administration*; IgG, Immunoglobulin G; IFNα; Interferon-α; NHL, Non-Hodgkin-Lymphom; NSCLC, *non-small-cell lung cancer*; SCCHN, *squamous cell carcinoma of the head and neck*; VEGF, *vascular endothelial growth factor*; AEG, Adenokarzinome am ösophagogastralen Übergang. Modifiziert nach (Scott et al. 2012).

Prodrugs, die an Antikörper gekoppelt sind und ihre Wirkung erst selektiv im Tumormi-

lieu entfalten, erscheinen für die Behandlung von minimalen Resterkrankungen bei Krebs besonders attraktiv. So werden Drogen wie LEG-3 (Wu et al. 2006) spezifisch von Tumor-assoziierten Proteasen gespalten und dadurch zu ihrer zytotoxischen Form aktiviert. Da auch das Vorkommen von ROS als Konsequenz von Azidose für das hypoxische Milieu solider Tumoren typisch ist, wurden auch ROS-induzierte (z.B. Amino-Ferrocene) (Hagen et al. 2012) bzw. Hypoxie-induzierte Prodrugs entwickelt und mit Erfolg in Tiermodellen getestet. Zu diesen zählen natürliche und synthetische Quinone, Nitroaromate, N-Oxide, und Metall-Komplexe (Chen and Hu 2009, Nagasawa 2011).

Doch es gibt auch viele Tumorantigene, für deren Targetierung es noch keine spezifischen Inhibitoren oder geeignete monoklonale Antikörper gibt. Zu diesen Tumorantigenen gehört die CA XII. Auch die CA IX-spezifischen Antikörper, die derzeit für verschiedene klinische Anwendungen getestet werden, sind nicht optimal, da sie die Enzymaktivität nicht hemmen. Vermutlich deshalb musste eine klinische Studie zur Therapie des klarzelligen Nierenzellkarzinoms mit dem CA IX-spezifischen Antikörper RENCAREX® wegen mangelnder Wirkung vorzeitig abgebrochen werden.

Um so wichtiger ist es Antikörper zu entwickeln, welche zusätzlich zu den bereits erwähnten immunologischen Funktionen, weitere besondere Fähigkeiten besitzen. Im speziellen Falle enzymatischer Zielstrukturen ist dies die Blockierung der Enzymaktivität, sofern diese zum Krankheitsprozess beiträgt. Diese besondere Eigenschaft besitzt der anti-CA XII-Antikörper Klon 6A10, der in dieser vorliegenden Arbeit verwendet wurde (Battke et al. 2011).

1.5 Ziele dieser Arbeit

Therapeutische Strategien, die die pHi-Regulation aus dem Gleichgewicht bringen, sollten dazu führen, dass Tumorzellen sich selektiv durch ihre eigene Glykolysebedingte Azidifizierung selbst vergiften. Die Blockierung der Tumor-assoziierten Carboanhydrase XII ist hierfür ein lohnendes Ziel, das bislang aber nicht verwirklicht werden konnte, da kein spezifischer Inhibitor existierte. Im Rahmen von Vorarbeiten meiner Arbeitsgruppe entstand aus einer Immunisierung einer Ratte mit Tumorexosomen der CA XII-spezifische monoklonale Antikörper 6A10, der die Carboanhydrase XII erkennt und ihre enzymatische Aktivität hocheffizient und spezifisch blockiert (Tab1.3). Im Rahmen dieser sollte die Auswirkung einer CA XII-Inhibierung mit diesem Antikörper untersucht werden. 6A10 sollte zunächst in zweidimensionaler Zellkultur, in dreidimensionalen Tumorzell-Sphäroiden und später in einem in-vivo-Xenotransplantations-Modell auf seine Tauglichkeit als potenzieller therapeutischer und diagnostischer Antikörper untersucht werden.

Tab. 1.3 Inhibitionskonstanten aller humaner Carboanhydrasen mit 6A10

Alle rekombinanten Carboanhydrasen wurden auf inhibitorische Wirkung des 6A10-Antikörpers in vitro im zellfreien System getestet. Durch Zugabe von CO₂ zu minimal gepuffertem Medium wurde die Abnahme des pH-Wertes gemessen. Dies ist auf die Bildung von Protonen durch die Enzymaktivität der Carboanhydrasen zurückzuführen. Diese Daten entstanden in Zusammenarbeit mit Prof. Dr. Claudiu Supuran (Universität Florenz, Italien).

Isoform	Subzelluläre Lokalisation	Ki (nM)	
		6A10	Acetazolamid
hCA I	Zytosol	>10000	250
hCA II	Zytosol	>10000	12
hCA III	Zytosol	>10000	>10000
hCA IV	membrangebunden	>10000	74
hCA VA	Mitochondrium	>10000	63
hCA VB	Mitochondrium	>10000	54
hCA VI	sekretiert	520	11
hCA VII	Zytosol	540	2,5
hCA IX	Transmembran	640	25
hCA XII	Transmembran	3,1	5,7
mCA XIII	Zytosol	720	17
hCA XIV	Transmembran	650	41
mCA XV	membrangebunden	>10000	72

CA= Carboanhydrase; h = human; m= murin.

Des weiteren wurden Onkosomen aus Tumorzelllinien zur Generierung weiterer Tumor-spezifischer monoklonaler Antikörper durch Immunisierung von Ratten verwendet und daraus resultierende Antikörper näher charakterisiert. Die dieser Immunisierungsstrategie zugrunde liegende Idee ist, dass die Proteine in Onkosomen zusammen mit ihren natürlichen posttranslationalen Modifikationen (z.B. Glykosylierungen), in ihrer nativen Form als Membran- oder Transmembranproteine vorliegen. Gegenüber konventionellen und Hoch-Durchsatz-Immunisierungsstrategien, in denen mit Peptiden, gereinigten Antigenen oder künstlichen Antigenen immunisiert wird, könnten Antigene auf Onkosomen vermehrt zur Generierung strukturspezifischer Antikörper führen. Diese von den Antikörpern erkannten Antigene sollten mithilfe massenspektrometrischer Untersuchungen identifiziert, durch weitere individuelle Experimente bestätigt und näher validiert werden. Um zu untersuchen, ob sich Onkosomen auch als Träger von spezifischen Proteinen und als Mittel zur Generierung spezifischer Antikörper eignen, wurde der Versuch unternommen mit Hilfe von rekombinanten Onkosomen CA IX-spezifische Antikörper zu generieren.

2 MATERIAL UND METHODEN

2.1 Material

2.1.1 Geräte

Produkt	Bezugsquelle
Agarosegelkammer	PeqLab, Erlangen
Bakterienschüttler	Innova 44, Eppendorf, Hamburg
Brutschrank CO2-AUTO-ZERO	Heraeus, Hanau
Durchflusszytometer FACS Calibur	BD Biosciences, Heidelberg
Durchflusszytometer (Sortierungen) FACS Aria III	BD Biosciences, Heidelberg
Durchflusszytometer LSR Fortessa	BD Biosciences, Heidelberg
Durchflusszytometer LSR II	BD Biosciences, Heidelberg
Eismaschine AF 200	Scotsman, Vernon Hills, USA
Elektroporations-Gerät GenePulser II	BioRad, München
ELISA-Reader EL-800	BioTek Instruments, Winooski, USA
Filmentwicklermaschine CP100	AGFA, Mortsel, Belgium
Feinwaage	BIO-TEK, Bad Friedrichshall
Fluoreszenzmikroskop Axiovert 10	Zeiss, Jena
Gas-Anästhesie-System XGI-8	Caliper Xenogen
Geltrockner	BioRad, München
Heiz-/Rührplatte Thermo Scientific	Waltham, USA
Heizblöcke	Eppendorf AG, Hamburg
Hypoxie-Brutschrank	Binder, Tuttlingen
In-vivo-Bildgebungs-System IVIS Lumina II	Perkin-Elmer(Caliper), Waltham, USA
Inkubationsschüttler innova 4400	New Brunswick Scientific, Edison, USA
Kühlpumpe RTE-101 (zur Kühlung großer SDS-Gele)	Neslab, Frankfurt am Main
Light Cycler LC480 II	Roche, Basel, Schweiz
Luminometer für Mikoplaten, Orion II	Berthold Detection Systems, USA
Mehrkanalpipette	Dunn Labortechnik, Asbach
Midi Gelapparatur SE 600	Hoefer, Amersham, Freiburg
Mikroskop Axiovert 25 Zeiss	Zeiss, Jena
Mikrowelle Compact Microwave Oven	Lloyds

Mini Gelapparatur MightySmall	Hoefer, Amersham, Freiburg
Nanodrop ND-1000 Spektrophotometer	PEQLAB, Erlangen
Neubauer-Zählkammer	Paul Marienfeld, Lauda-Königshofen
Odyssey Infrarot-Bildgebungssystem	LI-COR Biosciences, Bad Homburg
PCR-Cycler Mastercycler	Eppendorf, Hamburg
pH-Meter	WTW, Weilheim
Pipetboy	Integra Biosciences, Fernwald
Pipetten	Gilson, Limburg-Offheim
Reinstwassersystem	Aquintus MembraPure, Bodenheim
Schüttler horizontal HS basic	IKA, Staufen
Sterilbank	BDK, Sonnenbühl-Genkingen
Taumelrollermischer TRM 50	IDL, Nidderau
Thermomixer compact	Eppendorf, Hamburg
Tischzentrifuge Centrifuge 5415 R	Eppendorf, Hamburg
Tischzentrifuge PICO 21 centrifuge	Heraeus, Hanau
Transferkammer Trans-Blot SD Semi Dry Transfer Cell	BioRad, München
Ultrazentrifuge TL-100	Beckman Coulter, Krefeld
Vertikalinkubationsrad	NeoLab, Heidelberg
Vortex Mixer 7-2020	NeoLab, Heidelberg
Wasserbad	Memmert, Schwabach
Zentrifuge 5415R (Kühlzentr.)	Eppendorf, Hamburg
Zentrifuge Avanti J-26 XP	Beckman Coulter, Krefeld
Zentrifuge Multifuge 3 L-R	Heraeus, Hanau
Zentrifuge Rotana 46RSC	Hettich, Tuttlingen

2.1.2 Verbrauchsmaterialien

Produkt	Bezugsquelle
0,20 µm Filter	Sartorius, Göttingen
96-Well-Rundbodenplatten	Nunc, Wiesbaden
Blotting-Papier	Whatman, Richmond, USA
Cellophane sheets	Carl Roth, Karlsruhe
Centricon Plus-70	Millipore, Darmstadt

Dialysemambran 14 kDa Porengröße	Carl Roth, Karlsruhe
Einmal-Kanülen	Dispomed, Gelnhausen
Einweg Pasteur-Pipetten	Carl Roth, Karlsruhe
Einwegspritzen 5 und 10 ml BD Discardit II	B.Braun, Melsungen
F/AIR canister für Anästhesie	Bickford, New York, USA
FACS-Röhrchen	BD Falcon, Heidelberg
Filter-Aufsatz 500 ml 0,22 µm	Hartenstein, Würzburg
Flachbodenplatten (6-/12-/24-/96-Well)	BD Falcon, Heidelberg
Gewindeflaschen Braunglas	Carl Roth, Karlsruhe
Insulinspritze, 0,3 ml U100 (30G)	BD Microfine, Heidelberg
Kryoröhrchen	Nunc, Wiesbaden
Kulturschalen alle Größen	BD Falcon, Heidelberg
Küvette für Elektroporation	BioRad, München
MF75 Filtereinheiten 0,2 µm Nylon	Hartenstein, Würzburg
Neoject 100gauge etc. für Membranfraktionen	Sartorius Stedim Minisart
Nitrozellulose Membran Hybond ECL	GE Healthcare, Freiburg
PCR-Reaktionsgefäße	Abgene, Hamburg
Petri-Schalen (für Spheroide und Bakterien)	Carl Roth, Karlsruhe
Pipetten (2 ml/5 ml/10 ml/25 ml)	Greiner Bio-One, Kremsmünster, Österreich
Pipettenspitzen TowerPack (0,1-10 µl/10-200 µl/100-1000 µl)	Gilson International, Limburg-Offheim
Präzisions-Deckgläser	Carl Roth, Karlsruhe
qPCR 96 Loch-Platten für LC480	PeqLab, Erlangen
Reaktionsgefäß, (1,5/2 ml)	Eppendorf, Hamburg
Röhrchen (15 ml/50 ml)	BD Falcon, Heidelberg
Röntgen-Filme Medical X-Ray screen film blue sensitive	CEA, Hamburg
Spritzen, 50 ml (Infuject)	Dispomed, Gelnhausen
Sterilfilter (0,22 µm/0,45 µm)	Millipore, Schwalbach
UZ-tubes Microfuge tubes 1,5 ml	Beckman Coulter, Brea, USA
Zellkulturflaschen	Nunc, Wiesbaden
Zellschaber	Hartenstein, Würzburg
Zellsiebe Cell strainer 70 µm und 100 µm	BD Falcon, Heidelberg

2.1.3 Chemikalien

Allgemeine Reagenzien	Bezugsquelle
Agarose	Biozym, Hess. Oldendorf
Ampicillin-Natriumsalz	Carl Roth, Karlsruhe
ATP	Roche, Mannheim
Complete, Mini, Protease Inhibitor	Roche, Mannheim
DAPI (4',6-Diamidino-2-phenylindol)	Roth, Karlsruhe
Dimethyl Pimelimidate-dihydrochlorid	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Ethanolamin-hydrochlorid	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
EZ-LINK NHS-PEG4-biotin, no-weigh	Pierce, Rockford, USA
EZ-LINK Sulfo-NHS-SS-biotin, no-weigh	Pierce, Rockford, USA
Formaldehydlösung 37%	Merck, Darmstadt
Igepal Ca-630	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
IRDye® 800CW NHS Ester	LI-COR Biosciences, Bad Homburg
Luminol	AppliChem, Darmstadt
Luria Broth Base	GIBCO Invitrogen, Karlsruhe
Mes hydrate	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Metafectene	Biontex, Planegg
MTT (Thiazolylblau)	Carl Roth, Karlsruhe
N-Lauroylsarcosine sodium salt solution 30%	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Natriumcarbonat wasserfrei	Merck, Darmstadt
Paracumarsäure	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Protein G Sepharose 4 Fast Flow	GE Healthcare
Roti-Block	Carl Roth, Karlsruhe
Roti-Histofix 4% säurefrei	Carl Roth, Karlsruhe
Select Agar	GIBCO Invitrogen, Karlsruhe
Silbernitrat	Carl Roth, Karlsruhe
TRIZOL LS Reagent	Invitrogen, Karlsruhe
Trypanblau	Biochrom AG, Berlin
Tween 20	Carl Roth, Karlsruhe
Wasser für PCR	B.Braun, Melsungen
Wasserstoffperoxid 30%	Carl Roth, Karlsruhe
Xylol	Sigma-Aldrich, Taufkirchen

Reagenzien der Zellkultur	Bezugsquelle
Ciprofloxacin	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
DMEM-Pulver – high glucose (D5648)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Fötale Kälberserum	PAA Laboratories, Österreich
G418-Sulfat (Geneticin)	AppliChem, Darmstadt
OptiMEM	GIBCO Invitrogen, Karlsruhe
Penicillin/Streptomycin	GIBCO Invitrogen, Karlsruhe
RPMI 1640	GIBCO Invitrogen, Karlsruhe
Trypsin/ 0,5% EDTA	GIBCO Invitrogen, Karlsruhe

Reagenzien für Tierversuche	Bezugsquelle
Coelenterazin S053	Synchem, Felsberg
Glucose-Lösung	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Hanks' balanced salt solution	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
HCL 1 N	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Hepes Puffer 1 M	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Isofluran	CP-Pharma, Burgdorf
Methanol ROTISOLV, HPLC ultra gradient grade	Carl Roth, Karlsruhe
Tissue-Tek OCT Einbettmedium Isotone	Sakura, Zoeterwoude, NL
Kochsalz-Lösung 0,9 %	B.Braun, Melsungen

Größenstandards	Bezugsquelle
GeneRuler 100 bp DNA Ladder	Fermentas, St. Leon-Rot
GeneRuler DNA ladder mix	Fermentas, St. Leon-Rot
Protein Marker IV und VI	PeqLab, Erlangen
Protein Marker Prestained	Fermentas, St. Leon-Rot

Kits und Enzyme	Bezugsquelle
BCA-Assay-Kit	Pierce, Rockford, USA
Endofree Plasmid Mini/MAXI-Kit	Qiagen, Hilden
QIAshredder	Qiagen, Hilden
NucleoSpin DNA-Gelextraktions-Kit	Macherey Nagel, Düren
MycoAlert™ mycoplasma detection kit	LONZA, Walkersville, USA
RNeasy MinElute Cleanup-Kit	Qiagen, Hilden
RNeasy Mini RNA-Isolationskit	Qiagen, Hilden
T4 DNA-Ligase	MBI Fermentas, St. Leon-Rot
DNase I amplification grade	Invitrogen, Karlsruhe
Shrimp alkaline phosphatase	Promega, Madison, USA
Asp718	Roche, Mannheim
Apal	MBI Fermentas, St. Leon-Rot
BamH1	New England Biolabs, Frankfurt
BglII	New England Biolabs, Frankfurt
HindIII	New England Biolabs, Frankfurt
NdeI	New England Biolabs, Frankfurt
XhoI	New England Biolabs, Frankfurt

2.1.4 Zelllinien

Die meisten der verwendeten Zelllinien waren bereits Bestandteil der Sammlung der Arbeitsgruppe oder wurden von anderen Arbeitsgruppen zur Verfügung gestellt. Zelllinien, die im Rahmen dieser Arbeit hergestellt wurden, sind mit einem Stern gekennzeichnet. Zellen, die von Dr. Alan McIntyre (University of Oxford) bezogen wurden, sind mit zwei Sternen, Zellen von Prof. Judy Johnson (Institut für Immunologie, LMU) mit drei Sternen markiert.

Bezeichnung	Herkunft
A375	Melanom
A549	Lungenkarzinom
A549/GFP/fLUC*	Lungenkarzinom
A549/GFP/gLUC*	Lungenkarzinom
BT474	Mammakarzinom
BT474/GFP/fLUC*	Mammakarzinom
D458	Medulloblastom
FaDu	Hypopharynxkarzinom
HEK 293	Immortalisierte Nierenzellen
HEK 293/CA IX*	HEK293-Zellen mit CA IX stabil transfiziert
HT29 EV**	Kolonkarzinom stabil mit einem Kontrollvektor transfiziert
HT29 shCa9**	Kolonkarzinom stabil mit einem shRNA gegen CA IX transfiziert
Kato III	Magenkrebs
Mel624.38	Melanom
Mel888 Muc18Tr6***	Melanom
Mel888 NeoTR4***	Melanom
Met-5A	Mesotheliom
MSTO-211H	Mesotheliom
NCI-2454	Mesotheliom
PCI 1	Hypopharynxkarzinom
RBL1 (Ratte)	Basophile Leukämie
RBL/CA IX*	RBL mit hCA IX stabil transfiziert
RCC26	Nierenkarzinom
Sr1Mel	Melanom
SK MEL23	Melanom
SKBR3	Mammakarzinom
SKBR3/GFP/fLUC*	Mammakarzinom
U251	Glioblastom
U373	Glioblastom
U87	Glioblastom
U87/GFP/fLUC*	Glioblastom
U87/GFP/gLUC*	Glioblastom
Wi38	Fibroblasten

2.1.5 Verwendeter Mausstamm

Für die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Tierversuche wurden NSG-Mäuse (NOD-scid IL2R $\gamma^{-/-}$) verwendet, die zusätzlich zu fehlenden T- und B-Zellen eine Dysfunktionalität der γ -Kette des IL2-Rezeptors und somit verminderte NK-Aktivität zeigen (Ito et al. 2002).

2.1.6 Primäre Antikörper und Sekundärkonjugate

Die meisten der verwendeten monoklonalen Primärantikörper gingen im Rahmen dieses Projekts aus den Immunisierungen mit Onkosomen hervor und wurden von Dr.

Elisabeth Kremmer (HMGU/Institut für Molekulare Immunologie) für uns produziert. Sie sind in der folgenden Tabelle mit einem Stern markiert. Alle weiteren von Frau Kremmer produzierten Antikörper sind nicht weiter gekennzeichnet. Sekundär-Antikörper und andere Konjugate wurden von den jeweils in der Tabelle angegebenen Herstellern bezogen.

Bezeichnung	Herkunft	Spezies/Isotyp
6A10	E.Kremmer (HMGU)	Ratte/IgG2a
6G9	E.Kremmer (HMGU)	Ratte/IgG2a
8G7	E.Kremmer (HMGU)	Ratte/IgG2a
7A11*	E.Kremmer (HMGU)	Ratte/IgG2b
13D1*	E.Kremmer (HMGU)	Ratte/IgG2a
22F2*	E.Kremmer (HMGU)	Ratte/IgG2a
15A7*	E.Kremmer (HMGU)	Ratte/IgG2a
2A4*	E.Kremmer (HMGU)	Ratte/IgG2a
8F2*	E.Kremmer (HMGU)	Ratte/IgG2a
3A10*	E.Kremmer (HMGU)	Ratte/IgG2a
12E12*	E.Kremmer (HMGU)	Ratte/IgG1
13C8*	E.Kremmer (HMGU)	Ratte/IgG2a
23E12*	E.Kremmer (HMGU)	Ratte/IgG2a
15F8*	E.Kremmer (HMGU)	Ratte/IgG2a
8C2*	E.Kremmer (HMGU)	Ratte/IgG2b
16E7*	E.Kremmer (HMGU)	Ratte/IgG2c
24H1*	E.Kremmer (HMGU)	Ratte/IgG2c
α-14-3-3ζ	Biolegend, San Diego, USA	Kaninchen (poly.)
α-CA IX (M75)	Prof. S. Pastorekova, Slovak Academy of Sciences, Bratislava	Maus/IgG1
α-CD49c	Biolegend, San Diego, USA	Maus/IgG1
α-CA IX (MSC8)	Prof. Dr. Christoph Renner, Universitätsklinik Zürich	Humanisiert/IgG1
α-CD61-APC	Biolegend, San Diego, USA	Maus/IgG1
Streptavidin Dy-Light 800	Vector Laboratories, Burlingame, USA	
HRP-AVIDIN D	Vector Laboratories, Burlingame, USA	
Anti-Ratte-cy5 bzw. FITC	Dianova, Hamburg	Ziege
Anti-Maus-cy5 bzw. FITC	Dianova, Hamburg	Ziege
Anti-Mouse IgG(H&L) DyLight 800	Rockland, Gilbertsville, USA	Ziege

2.1.7 *Plasmide*

Plasmid	Bezugsquelle
pcDNA3.1(+)	Invitrogen, Karlsruhe
pcDNA3.1- hCA IX	wurde im Rahmen dieser Arbeit kloniert
pSG5C-Ca9	Prof. S. Pastorekova, Slovak Academy of Sciences, Bratislava

2.1.8 Oligonukleotide

2.1.8.1 Primer für Klonierung der CA IX

	Vorwärtsprimer	Rückwärtsprimer
CA IX	ATG GCT CCC CTG TGC CCC AG	CTA GGC TCC AGT CTC GGC TAC CTC

2.1.8.2 Primer für Real-time-PCR

Sequenzen, die mit einem Stern markiert sind, stammten aus der Publikation von Valente und Kollegen (Valente et al. 2009). Alle weiteren Primer wurden aus den publizierten Gensequenzen mittels ProbeFinder 2.47 (Roche) generiert.

Transkript	Sequenz 5'→3'	Amplifikationsprodukt (bp)	
	Vorwärtsprimer	Rückwärtsprimer	
AE1	tcttcaggaacgtggagctt	cctcatcaaagggtgccttg	63
AE2	tcctctctggaagtggaga	tagcccttttcgctgtcg	110
ACTB	attggcaatgagcgggtc	cgtggatgccacaggact	79
CA IX	cctttgccagagttgacgag	gcaactgctcataggcactg	105
CA XII	gtttctcctgaccaacaatgg	cgtggcactgtagcgagac	91
GAPDH	ccccggttctataaattgagc	cacctccccatggtgtct	127
HIF1a	ttttcaagcagtaggaattgga	gtgatgtagtagctgcatgatcg	66
HMBS*	cacgatcccagactctgct	tactggcacactgcagcctc	81
HPRT*	tgaggatttgaaaggggtgt	gagcacacagaggggtctaaa	118
MCT1	ttgtggaatgctgtcctgtc	acatgtcattgagccgacct	60
MCT4	gggaagggtccaaccttacact	ccatcacaacacattcacca	91
NHE1	tcttcaccgtctttgtgcag	atggagcgcttcgtctctt	88
NBC1	tcatggaccaacaaattacagc	cacccaaaagagatccaagtg	92
NBC2	agaagcagcgctgaaagg	ggggagaggccaaaatacc	77
TBP*	gagctgtgatgtgaagtttcc	tctgggtttgatcattctgtag	117

2.1.9 Dienstleistungen

Service-Einheiten	Leitung/Firma
Monoklonale Antikörper	Dr. Elisabeth Kremmer (HMGU)
PCR-Primersynthesen	Metabion GmbH
Sequenzierungen	GATC Biotech AG
Zentrallabor für Proteinanalytik	Prof. Dr. Axel Imhof (LMU München)

2.1.10 Software (Computer-Programme)

Verwendung	Programm/Bezugsquelle
Sequenz-Analyse und Vektorkarten	MacVector 11.0.4, MacVector Inc., Cary, USA
Bildbearbeitung	Photoshop CS5 Version 12.0, Adobe, San Jose, USA Illustrator CS5 Version 15.0, Adobe, San Jose, USA
Real-Time-PCR-Analyse	LightCycler480 Software SP3, Roche,

	Basel, Schweiz
Bibliographie	EndNote X6, Thomson Reuters, USA
Auswertung der Durchflusszytometrie	FlowJo 9, Tree Star, Ashland, USA
Textverarbeitung	Excel 2008 für Mac, Microsoft, Seattle, USA, Word 2011 Version 14.0 für Mac, Microsoft Seattle, USA
Messung und Auswertung der in-vivo-Bildgebung	Living Image 4.2, Caliper, Hopkinton, USA
Primerdesign-Programm	ProbeFinder 2.47, Roche, Basel, Schweiz
Photometrische Messung und Analyse	KC4, BioTek, Winooski, USA
Mycoplasmentest	Simplicity 4.02, Berthold, Pforzheim
Statistische Auswertung	Prism 5.0d, Graph PAD Software, La Jolla, USA

2.1.11 Puffer und Lösungen

Puffer/Lösung	Zusammensetzung
Coomassie-Färbelösung	0,05 % Coomassie Brilliant Blau, 50 % Methanol, 10 % Eisessig, 40 % H ₂ O
Coomassie-Entfärbelösung	50 % Methanol, 10 % Eisessig, 40 % H ₂ O
Imprägnierlösung (Silberfärbung)	100 ml desionisiertes Wasser, 50 µl Na-Thiosulfat-Lösung (2,15 g in 5 ml H ₂ O), 70 µl 37 % Formaldehyd-Lösung (Merck)
Färbelösung (Silberfärbung)	100 ml Wasser, 0,2 g Silbernitrat (für 15x 15 cm-Gele 0,4 g), 70 µl Formaldehyd-Lösung
Entwicklerlösung (Silberfärbung)	100 ml Wasser, 6 g Na ₂ CO ₃ (wasserfrei), 2 µl Na-Thiosulfatlösung (2 g in 5 ml Wasser), 50 µl Formaldehyd-Lösung 37%
Fixierlösung (Silberfärbung)	50 %Methanol 12 %Eisessig 48 % Wasser
Einfriermedium	50 % FKS, 40 %, Vollmedium 10 %, DMSO
LB-Medium	1 % Trypton 0,5 % Hefeextrakt 0,5 % NaCl
LB-Agarplatten	1l LB-Medium 15 g Bacto-Agar
Ampicillin (Amp)-Stammlösung	100 mg/ml in H ₂ O, sterilfiltriert Aufbewahrung bei -20°C
TAE-Laufpuffer	1 mM EDTA, 20 mM Essigsäure, 40 mM Tris
FACS-Puffer	PBS, 2 % FKS
RIPA-Lysepuffer für Proteine	150 mM NaCl, 50 mM Tris/HCl (pH 7,4), 1 % Igepal, 0,5 % Natriumdesoxycholat
TBS(10x)	24,2 g Tris, 80 g NaCl, H ₂ O ad 1 L
10x SDS-Laufpuffer	30,2 g/L, Tris 145 g/L, Glycin 0,4 % SDS
TBST	TBS(1x) in Wasser, 1 %Tween
Carbonatpuffer zur Kopplung von Fluorochromen an Antikörper	7,57 g NaHCO ₃ in 900 ml Wasser (0,1 M) 2,12 g in 200 ml Na ₂ CO ₃ (0,1 M) zum Einstellen von pH 9,3 am pH-Meter: 900 ml NaHCO ₃ Puffer + ca. 160 ml Na ₂ CO ₃

	Sterilfiltriert 0,2 µm
Blotpuffer	30,3 g/L Tris, 144 g/L Glycin, 0,4% (v/v) SDS
Hypotonischer Puffer	5 mM Tris/HCl (pH 7,4), 25 mM NaF, 5 mM MgCl ₂ , 1 mM EGTA
PBS	8 g/L NaCl, 0,2 g/L KCl, 1,44 g/L Na ₂ HPO ₄ , 0,24 g/L KH ₂ PO ₄ pH 7,4 mit HCl
PBS+	PBS, 1% N-Lauroylsarcosin, 0,1% SDS
HBG-Puffer	12,5 ml 20 % Glucose, 1ml 1M Hepes, pH 7,1 ad 50 ml H ₂ O (sterile Fertiglösungen hoher Reinheit, HPLC)
Coelenterazin-Stock-Lösung (in-vivo)	10 mg Coelenterazin in 900 µl Methanol (reinst.), 120 µl 1 N HCl
Trypanblau-Lösung	0,2 % Trypanblau (Merck); 0,1 % Natriumazid (Merck) in PBS
ECL-Lösung	Stock-Lösungen: 80 mM p-Coumarsäure in DMSO, 250 mM Luminol in DMSO ECL1: 0,1 M Tris/HCL (pH 8,8), 0,2 mM p-Coumarsäure, 1,25 mM Luminol ECL2: 3 % H ₂ O ₂ ECL1+ECL2 (333:1)
SDS-Probenpuffer (3x)	65 mM Tris/HCl pH 6,8, 10 % (v/v) Glycerin, 2,3 % (w/v) SDS, 5 % (v/v) β-Mercaptoethanol, Spatelspitze Bromphenolblau

2.2 Methoden

2.2.1 Molekularbiologische Methoden

2.2.1.1 Bakterienkultur

E. coli Bakterien (Stamm DH5α) dienen als Suspensionskultur in LB-Medium zur Vermehrung von Plasmid-DNA. Dazu wurden einzelne Klone von Agar-Platten gepickt. Zur Selektion auf Resistenzen wurde ein Antibiotikum (meist Ampicillin in der Konzentration 100 µg/ml) zugegeben.

Zum Zwecke der Langzeit-Aufbewahrung wurden Bakterien aus der gesättigten Wachstumsphase mit 50 % Glycerin versetzt und bei –80°C eingefroren und aufbewahrt.

Die Transformation chemisch-kompetenter Bakterien mit Plasmid-DNA erfolgte mittels der Hitzeschock-Methode (Hanahan 1983). Zur Transformation wurden 100 µl *E. coli* DH5α auf Eis aufgetaut und mit 1 µl Plasmid oder Ligationsansatz vermischt, 10 min auf Eis inkubiert und einem zweiminütigen Hitzeschock bei 42°C ausgesetzt. Nach zwei weiteren Minuten auf Eis wurde 1 ml LB-Medium zugegeben und für 45 min bei 37°C und 300 UPM auf einem Heizblock geschüttelt. Die Bakterien wurden für 30 sek

bei 10000 UPM sedimentiert, der Überstand abgenommen und in ca. 10 µl verbleibendem LB-Medium resuspendiert. Auf LB-amp-Platten wurden die transformierten Bakterien schließlich ausgestrichen und über Nacht bei 37°C inkubiert.

Am nächsten Tag konnten einzelne Klone gepickt werden und deren Plasmid-DNA mit dem EndoFree Plasmid Mini- bzw. Maxi Kit (Quiagen) isoliert werden.

2.2.1.2 Klonierung und Restriktionsenzymverdau

Ziel der Klonierung war es ein Konstrukt zu generieren, das die humane Carboanhydrase IX, welche bereits als cDNA in einem Plasmid vorlag, in ein Expressionsplasmid umzuklonieren. Die Wahl fiel auf den Expressionsvektor pcDNA3.1, der den starken „*immediate early*“-Promotor des Cytomegalievirus (CMV) trägt und einen eukaryotischen Selektionsmarker (Neomycin-Resistenz) besitzt. Mithilfe des fertigen Plasmids sollten später stabil transfizierte Zelllinien generiert werden.

Als erstes wurde das CA IX-Insert mittels der Restriktionsenzyme *Asp718* und *BamH1* aus dem pSG5C-Vektor ausgeschnitten. Der Empfängervektor pcDNA3.1 wurde mit den Enzymen *Asp718* und *BglII* geschnitten und mit SAP (*shrimp alkaline phosphatase*) dephosphoryliert. Alle Restriktionsenzyme wurden so ausgewählt, dass sie nur einmal im jeweiligen Vektor schneiden konnten. Nach Ausschneiden und Aufreinigung aus einem 2 %-igen Agarose-Gel mit NucleoSpin Extract II Kit (Machery-Nagel) und nach einem Testverdau wurde der linearisierte Empfängervektor mit dem Insert mittels der T4-Ligase (Pierce) gemäß Herstellerangaben in einem Volumen von 10 µl bei RT für 1 h ligiert. Das molare Verhältnis von Vektor zu Insert betrug dabei 1:4. Die Transformation wurde mit 1 µl Plasmid aus der Ligation (ca. 15 ng) gemäß Kapitel 2.1.1 durchgeführt. Analytische Plasmidpräparationen wurden mit EndoFree Plasmid Mini Kit (Qiagen) durchgeführt.

Die Klonierung wurde durch Restriktionsverdau einiger Klone überprüft. Dabei wurde das hineinklonierte Insert durch weiter außen in der *multiple cloning site* spaltende Enzyme (*HindIII* und *XhoI*) wieder herausgeschnitten. Eine Sequenzierung des Plasmids durch die Firma GATC Biotech führte anschließend zur Bestätigung des korrekten Einbaus des Inserts.

2.2.1.3 Isolierung von zellulärer RNA

Die Isolierung von RNA aus verschiedenen humanen Tumorzelllinien erfolgte mit dem RNeasy Mini kit (Qiagen). Zum Lyse-Puffer wurde β-Mercaptoethanol zur Inhibition von RNAsen hinzugefügt. Zusätzlich wurden QIAshredder Säulen von Qiagen bezogen und gemäß Herstellerangaben verwendet. Anschließend wurde ein DNase I-Verdau wie vom Hersteller (Invitrogen) angegeben in einem Volumen von 20 µl durchgeführt. Da-

bei wurden 2 µl DNase I zu 2 µg RNA gegeben. Die RNA wurde durch das Hinzufügen der verschiedenen Reagenzien stark verdünnt. Nachfolgend wurde mittels des RNeasy MinElute Cleanup-Kits die RNA von den Enzymen und Salzen gereinigt und gleichzeitig aufkonzentriert. Dies führt zu einer bis zu 20-fach höheren RNA-Konzentration. Dieses Verfahren eignete sich besonders gut zur Gewinnung von konzentrierter, qualitativ hochwertiger RNA aus einer geringen Zahl an Zellen.

2.2.1.4 Quantitative Real-time RT-PCR

Zur Expressionsanalyse ausgewählter Transkripte wurde die Real-time RT-PCR angewandt. Dazu wurden zunächst 2 µg gereinigte zelluläre RNA in 20 µl Gesamtvolumen mittels reverser Transkriptase (Superscript III von Invitrogen) in cDNA umgeschrieben. Durch die Wahl von Oligo-dT-Primern wurde spezifisch nur die mRNAs in cDNA umgeschrieben. Diese Reaktion wurde mit Oligo-dT-Primern für 50 min bei 50°C durchgeführt. Nach Inaktivierung der Enzyme bei 85°C und Abkühlen auf Eis wurde die fertige cDNA 1:4 mit Reinstwasser verdünnt, um eventuelle Auswirkungen der verwendeten Reagenzien auf die darauf folgende Real-Time-PCR (kurz: qPCR) zu minimieren. Aus dieser Verdünnung konnten Verdünnungsreihen der cDNA über vier log₁₀-Stufen generiert werden, welche zur Ermittlung der Primereffizienzen dienten. Die in dieser Arbeit verwendeten Primersequenzen wurden mittels ProbeLibrary-Software von Roche generiert und von der Firma Metabion (Martinsried) synthetisiert. Sie wurden zunächst auf ihre Bindung und Bindungseffizienz getestet. Hierzu wurden aus dem verdünnten cDNA-Stock 2 µl zu 8 µl Mastermix, bestehend aus dem jeweiligen Primerpaar, 2x Sybr-Green-Mix (Roche) und Reinstwasser (B.Braun), zu 10 µl Endvolumen pro Reaktion vermischt und die qPCR wie folgt durchgeführt:

qPCR-Programm mit 45 Zyklen:

1. 95°C 10 min, Denaturierung
2. 95°C 10 sec, zyklische Denaturierung
3. 62°C 10 sec, zyklische Fluoreszenz-Messung
4. 72°C 15 sec, zyklische Elongation
5. 95°C, 5 sec, zyklische Denaturierung
6. 72°C 10 min, finale Elongation
7. 60-97°C, steigende Temperatur zur Bestimmung der Schmelzkurve
8. 30 min, Abkühlen auf 4°C

2.2.2 Zellkultur

2.2.2.1 Zellkulturbedingungen

Alle Zellen wurden, wenn nicht anders angegeben, in einem Inkubator bei 37°C unter einer Atmosphäre von 5 % CO₂ und 95 % Luftfeuchtigkeit gehalten. Dies entspricht einem atmosphärischen Sauerstoffgehalt von 21 %. Diese Bedingungen werden im Rahmen dieser Arbeit als Standard oder normoxische Kulturbedingungen definiert. Alternativ dazu wurden Zellen für die Dauer eines Versuchs auch in einem Brutschrank inkubiert, bei dem durch zusätzliche Zuführung von Stickstoff der Sauerstoffgehalt reguliert werden kann. Im Rahmen dieser Arbeit wurde ein besonders stringenter Gehalt von 0,2 % Sauerstoff als Hypoxie definiert.

Alle primären Zellen und Zelllinien wurden in RPMI 1640 oder DMEM, jeweils mit 10 % Kälberserum, 100 µg/ml Streptomycin und Penicillin kultiviert. Diese Zusätze werden hier als Standardzusätze definiert. Abweichend davon wurden auch Medien mit 5 % und 7,5 % Kälberserum verwendet um das Wachstum der Zellen zu verlangsamen.

Ferner wurden verschiedene Medien aus DMEM-Pulver selbst wie folgt hergestellt. Zunächst wurde DMEM-Pulver (high glucose, D5648) unter sterilen Bedingungen in Wasser gelöst. Dieses Pulver besitzt alle für das Wachstum notwendigen Komponenten, außer einem Puffersystem. Im Rahmen dieser Arbeit wurden Bicarbonat (1 mM, 10 mM, 30 mM und 44 mM); Hepes, Mes oder eine Kombination aus Hepes und Mes als Puffer hinzugefügt und das Medium dann mit NaOH auf einen pH-Wert von 7,4 eingestellt, was dem pH-Wert gängiger Kulturmedien entspricht. Für bestimmte Experimente wurden Medien mit davon abweichenden pH-Werten hergestellt. Anschließend wurde das so hergestellte Medium mittels einer Vakuumpumpe und einem 0,2 µm-Filteraufsatz für Schottflaschen sterilfiltriert.

Stabil transfizierte Hek293-Ca IX-Zellen wurden zur Aufrechterhaltung des pcDNA3.1-CalX-Plasmides mit 1 mg/ml G418, stabil transfizierte RBL-CalX-Zellen wurden mit 0,8 mg/ml G418 kultiviert.

2.2.2.2 Kryokonservierung von Zellen

Zellen in der exponentiellen Wachstumsphase wurden abzentrifugiert und in 4°C kaltem Einfriermedium resuspendiert. 1-1,5 ml diese Suspension wurde in Kryoröhrchen (1,8 ml) mit Innengewinde (Nunc) gefüllt und in einer Styroporbox für 1-10 Tage bei -80°C eingefroren. Anschließend wurden die Röhrchen in flüssigem Stickstoff gelagert. Zum Auftauen wurde der Inhalt der Kryoröhrchen schnell zum Schmelzen gebracht und sofort in 30-40 ml PBS resuspendiert, um das toxische DMSO zu verdünnen. Nach einer 10-minütigen Zentrifugation bei 1200 UPM wurde das Zellpellet in geeignetem

Vollmedium resuspendiert und in Zellkulturflaschen ausgesät.

2.2.2.3 Isolation von Onkosomen aus Zellkulturüberständen

Jede hier untersuchte Tumor-Zelllinie produzierte spontan Mikrovesikel (MV). Um diese zu isolieren, wurden adhärente Zellen in großen Zellkulturflaschen in 25 ml RPMI 1640 Vollmedium kultiviert, bis sie ca. 80% Konfluenz erreicht hatten. Die Zellen wurden dann drei Mal mit PBS gewaschen, um das FCS zu entfernen, und für zwei weitere Tage in Medium ohne FCS kultiviert. Der FCS-freie Inkubationszeitraum wurde so gewählt, dass die Zellen frische MVs in ausreichender Menge produzieren konnten, aber nicht aufgrund von Nährstoffmangel abstarben. Nach Ablauf von 48 h wurde der Zellkulturüberstand abgenommen, und bei 1200 UPM abzentrifugiert, um enthaltene Zellen abzutrennen. Der nun zellfreie Überstand wurde durch Filter mit 0,2 µm Porengröße filtriert, wodurch auch größere Zellfragmente und MVs abgetrennt wurden. Das Filtrat wurde mit Centricon-70-Zentrifugationsfiltern (Millipore) gemäß Herstellerangaben auf ein Volumen von ca. 300 µl eingengt, mit sterilem PBS auf 1,2 ml aufgefüllt und mit der Tischultrazentrifuge TL-100 bei 40.000 UPM und 4°C für 90 min zentrifugiert. Das Pellet wurde mit PBS gewaschen und erneut 90 min zentrifugiert. Das Pellet wurde durch Pipettieren von der Gefäßwand gelöst und 1 h im 4°C-Kühlraum bei 800 UPM auf einem Schüttler aufgelöst. Durch anschließende Protein-Bestimmung mittels BCA-Test konnte die gewonnen MV-Menge grob abgeschätzt werden. Zur Bestätigung des vesikulären Proteingehalts wurden Dot-Blots zum Nachweis von bekannten exosomalen Marker-Proteinen (TSG101, CD63) durchgeführt. So gewonnene MV wurden für Immunisierungen verwendet.

2.2.2.4 Biotinylierung von Zellen

Die Biotinylierung von Zelloberflächenproteinen wurde mittels NHS-PEG4-Biotin bzw. Sulfo-NHS-SS-Biotin (Pierce, Rockford, USA) durchgeführt. Beide Biotin-Succinimidyl-Ester-Konjugate sind wasserlöslich. Sie können daher nicht durch Membranen diffundieren, wodurch prinzipiell nur Oberflächenproteine kovalent über eine Peptidbindung mit Biotin gekoppelt wurden. Dies erfolgt durch Hydrolyse des NHS-Esters in neutral bis basisch gepufferter Lösung und anschließendem nukleophilen Angriff der freien Amino-Gruppe von primären Aminen. Bevorzugt funktioniert dieses Prinzip für die Aminosäure Lysin, die als einzige ein primäres Amin besitzt (abgesehen von N-terminalen Aminen), das zur Bildung einer Peptidbindung mit dem Biotin zur Verfügung steht.

Die Zellen wurden in PBS gewaschen und mit einem Zellschaber abgekratzt. Je $2,5 \times 10^7$ Zellen/ml wurden im Anschluss 3 x mit kaltem PBS gewaschen und mit einer frischen 20 mM Lösung von NHS-PEG4-Biotin für 30 min bei RT inkubiert, sodass eine Endkonzentration von 2 mM Biotinylierungsreagenz in der Zellsuspension entstand. Es

folgte ein Waschschriff mit 100 mM Glycin oder 50 mM Tris (pH 8), um nicht-reagiertes Biotinylierungsreagenz durch Überschuss dieser primären Amine aus der Lösung zu entfernen. Durch zwei weitere Waschschriffe mit PBS wurde das Reagenz vollständig herausverdünnt. Die nun biotinylierten Zellen wurden mit RIPA-Puffer lysiert und nach Bestimmung der Proteinkonzentration in darauf folgenden Immunpräzipitationen eingesetzt. Die Biotinylierung mit dem Sulfo-NHS-SS-Reagenz wurde mit leicht abweichendem Protokoll ebenfalls gemäß Herstellerangaben durchgeführt und führte zu vergleichbar guten Ergebnissen.

2.2.2.5 Transfektion, Selektion und Expansion hCA IX-exprimierender Zellen

1×10^7 RBL-Zellen wurden mittels Elektroporation mit dem hCA IX-Expressionsplasmid transfiziert. Zur Kontrolle der Transfektionseffizienz wurde parallel eine Elektroporation mit einem GFP-exprimierenden Plasmid durchgeführt.

Zunächst wurden die Zellen bei 1500 rpm abzentrifugiert, in 30 ml RPMI ohne FCS gewaschen und erneut abzentrifugiert. Anschließend wurden die Zellen in je 10 ml OPTIMEM aufgenommen und erneut 5 min abzentrifugiert. Sie wurden nun in je 300 μ l OPTIMEM resuspendiert und in Küvetten (BioRad) überführt. Je 20 μ g Plasmid einer Konzentration von 1 μ g/ μ l wurden hinzu pipettiert und mit einer Pipettenspitze vermischt. Die Elektroporation wurde in einem GenePulser II (BioRad) bei 230 V und 975 μ F durchgeführt. Unmittelbar nach erfolgter Elektroporation wurde 1 ml FCS zu den Zellen hinzugefügt und der Ansatz ohne Verzögerung in eine mit 5 ml RPMI Vollmedium befüllte, kleine Zellkulturflasche überführt. Am nächsten Tag wurden die Zellen abzentrifugiert und in 5 ml frischem Medium aufgenommen. Zu diesem Zeitpunkt wurde die Selektion mit 0,3 mg/ml G418 begonnen und innerhalb von zwei Wochen auf 0,8 mg/ml erhöht. Die Transfektionseffizienz wurde durchflusszytometrisch anhand des GFP-tragenden Kontrollplasmids und der Expression der humanen CA IX bestimmt. Die CA IX-transfizierten Zellen wurden unter Beibehaltung der angegebenen Endkonzentration an G418 zwei weitere Wochen selektioniert und schließlich soweit expandiert, dass eine stringente Zell-Sortierung am FACS Aria III möglich war, wodurch die Anreicherung von CA IX-exprimierenden Zellen deutlich beschleunigt werden konnte.

Die Transfektion adhärenter HEK293-Zellen fand in einer 6-Lochplatte statt. Dazu wurden je 100 μ l Medium ohne FCS in zwei 1,5 ml Eppendorf-Gefäße (A und B) gefüllt. In Gefäß A wurde 1 μ g Plasmid-DNA pipettiert, in Gefäß B 6 μ l Metafectene (Biontex). Die beiden Inhalte A und B wurden gemischt und für 20 min bei RT inkubiert. Durch langsames Auftropfen wurde der Transfektionsansatz auf den ca. 60-70 % konfluenten Zellen verteilt. Nach 6 h Inkubation bei 37°C wurde das Medium abgezogen und durch 2 ml frisches Vollmedium ersetzt. Auch diese Art der Transfektion wurde zur Kontrolle

parallel mit einem für GFP-kodierenden Plasmid durchgeführt. Es wurden 3 Transfektionsansätze für die anschließende Bestimmung der G418-Konzentration, die für die Selektion benötigt wurde, angesetzt. Hier waren die Anfangskonzentrationen 0,3 mg/ml, 0,5 mg/ml und 1 mg/ml. Wie oben beschrieben, wurde auch hier über einen mehrwöchigen Zeitraum mit G418 selektioniert und dabei die G418-Konzentration von 0,3 mg/ml über 0,5 mg/ml und 0,8 mg/ml auf 1 mg/ml erhöht. Trotz guter Transfektionseffizienz und Selektion wurden auch hier die Zellen sortiert, um eine besonders stark exprimierende Subpopulation zu erhalten, die keine CA IX-negativen Zellen mehr enthalten sollte. Bei beiden Transfektionstypen wurde in regelmäßigen Zeitabständen der Selektions- bzw. Sortierungserfolg durchflusszytometrisch kontrolliert.

2.2.2.6 Mycoplasmentest

Mycoplasmen sind die kleinsten und einfachsten Prokaryoten, die häufig über lange Zeitspannen unentdeckt die Zellkultur kontaminieren können. Dies kann unter anderem Folgen für das Wachstum der Zellen durch Konkurrenz um Nährstoffe haben. Ferner können Mycoplasmen das Genexpressionsmuster von Zellen beeinträchtigen und im Falle einer Verwendung kontaminierter Zellen in Tierversuchen die Gesundheit insbesondere stark immunsupprimierter Tiere beeinträchtigen. Deshalb wurden Zelllinien regelmäßig mittels des MycoAlert™-Kit auf die Präsenz von Mycoplasmen hin getestet. Dieser biochemische Test misst den ATP-Gehalt im Überstand der Zellkultur vor und nach Zugabe des Substrates. Sind keine von Mycoplasmen stammenden Enzyme im Überstand enthalten, ist der zweite Messwert nicht höher als der erste. Im Falle einer Kontamination wird der ATP-Gehalt deutlich höher. ATP im Überstand kann nur durch Enzyme submikroskopischer Mycoplasmen aus ADP gebildet werden. Dieses ATP reagiert Luziferase-katalysiert mit dem im Assay-Puffer vorhandenen Luziferin, wodurch Licht entsteht, dessen Intensität in linearer Beziehung zum ATP-Gehalt steht.

Dazu wurden Zellkulturüberstände von konfluenten Zellen abgenommen, bei 1000 x g abzentrifugiert und 25 µl davon direkt in eine sterile, weiße 96-Lochplatte für Lumineszenzmessungen (Costar) pipettiert. Zusätzlich wurde bei jedem Test frisch geöffnetes steriles Zellkulturmedium als Negativ-Kontrolle und Überstand einer zuvor aliquotierten und bekanntermaßen Mycoplasmen-kontaminierten Zelllinie als Positivkontrolle mitgeführt. Zu dem Zellkulturüberstand wurden 25 µl MycoAlert-Reagenz gegeben, für 5 min bei RT inkubiert und an einem Luminometer (Orion II) für 1 Sekunde (integriert) gemessen. Anschließend wurden 25 µl MycoAlert Substrat hinzupipettiert und für 10 min bei RT inkubiert. Es folgte die zweite Messung. Um zu berechnen, ob die Probe kontaminiert war, wurde der Quotient aus erster und zweiter Messung gebildet. Laut Herstellerangaben waren dabei die Proben positiv, wenn der daraus resultierende Zahlenwert den Wert 1 überschritt bzw. bei Unterschreitung negativ. Werte, die nahe bei 1

lagen, wurden als potenziell geringfügig kontaminiert angesehen und prophylaktisch mit 10 µg/ml Kulturmedium Ciprofloxacin behandelt. Ein erneuter Test wurde frühestens 6 Wochen nach Beendigung der Antibiotika-Behandlung und ständiger Kultur durchgeführt, um den Erfolg der Behandlung zu bestimmen.

2.2.2.7 MTT-Test von 2D-Kulturen

Der MTT-Test erlaubt Rückschlüsse auf die Vitalität und Proliferationsrate einer Zellpopulation (Mosmann, 1983). In lebenden Zellen wird MTT (3- (4,5-Dimethylthiazol-2-yl) -2,5-diphenyltetrazoliumbromid) durch mitochondriale Dehydrogenasen zu violetter Formazan reduziert. Dieser Farbumschlag kann photometrisch gemessen und quantifiziert werden.

Hierzu wurde zu 100 µl Zellen in einer 96-Lochplatte dasselbe Volumen einer MTT-Lösung (0,5 mg/ml in PBS) gegeben und für 3 h bei 37°C weiterkultiviert. Dann wurden die Zellen durch Zugabe von je 100 µl 10%-igem SDS über Nacht lysiert und gleichzeitig das Formazan gelöst. Die Messung des homogen gefärbten Lysats erfolgte bei 595 nm am Photometer. Die Messwerte wurden in Excel importiert und ausgewertet.

2.2.2.8 Sphäroid-Kulturen

Sphäroide wurden als hängende Tropfen kultiviert und ihre Proliferationsrate mittels MTT-Test analysiert. Analog zu 2.7.1 wurden verschiedene Antikörper in unterschiedliche Medien aufgenommen und unmittelbar vor Bildung der Sphäroide mit den Zellen im gleichen Medium vermischt. Aus diesem Mastermix wurden 6-8 Replikate als Sphäroide an die Unterseite des Deckels einer Petrischale pipettiert. Das Auftragsvolumen betrug 25 µl, da geringere Volumina zu beschleunigter Austrocknung und höhere Volumina zum Verlaufen der Tropfen führten. Ein Volumen von 25 µl führte zu einem stabilen Tropfen, der sich aufgrund der besonders hydrophoben Oberfläche dieser Bakterien-Petrischalen (verglichen mit Zellkulturschalen) bildete und auch relativ resistent gegen bewegungsbedingte Erschütterungen durch die routinemäßige Handhabung war. In den Boden der Schale wurden 20 ml PBS gegeben, um ein Austrocknen der Sphäroide zu verhindern.

Nach 3 Tagen Inkubation wurden je 2 µl der MTT-Stocklösung direkt in den Tropfen „injiziert“ und für 3h bei 37°C weiter inkubiert. Danach wurden die gut sichtbaren, violett gefärbten Sphäroide vorsichtig mit einer Pipette in eine 96-Loch Flachbodenplatte überführt, in die zuvor 100 µl 10 %-iges SDS vorgelegt worden war, und 2 Tage lysiert. Die Messung und Auswertung erfolgte analog zu 2.1.1.

2.2.3 Proteinbiochemische Methoden

2.2.3.1 Proteinextraktion aus Säugerzellen

Die Zellen wurden geerntet und mit PBS gewaschen. Zur Lyse wurde pro 1×10^6 Zellen 50 μ l RIPA-Lysepuffer verwendet und für 40 min auf Eis inkubiert. Zellfragmente wurden in einer Kühlzentrifuge bei $14.000 \times g$ für 15 min abzentrifugiert. Der proteinhaltige Überstand wurde abgenommen und ggf. bei -80°C gelagert.

2.2.3.2 Bestimmung der Proteinkonzentration mit BCA-Assay

Die Proteinkonzentration von Lysaten, Onkosomenpräparationen und Antikörpern wurde mit dem BCA-Assay gemäß Herstellerangaben (Pierce) bestimmt. Die Proteinkonzentration wurde anhand einer Eichkurve aus mehreren BSA-Konzentrationen (25–1500 ng/ml) errechnet. Durch 30 min Inkubation der Proteinlösungen bei 37°C fand ein Farbumschlag statt, der bei 562 nm in einem Plattenphotometer (BioTek Instruments) gemessen wurde. Der Farbumschlag beruht auf der Biuret-Reaktion, bei der Cu^{2+} zu Cu^{1+} reduziert wird und durch Chelat-Komplex-Bildung mit Bicinchoninsäure die violette Färbung hervorruft. Höher konzentrierte Proteingemische wurden zuvor entsprechend verdünnt, um die Messung im linearen Bereich der Standardkurve durchführen zu können.

2.2.3.3 Anreicherung von Membranfraktionen

1×10^8 zuvor biotinylierte Zellen pro Zelllinie wurden für die Anreicherung von Membranfraktionen verwendet. Alle Zentrifugationsschritte wurden bei 4°C durchgeführt. Die Zellsuspension wurde 2x mit PBS gewaschen und die Zellen in 200–300 μ l hypotonem Puffer resuspendiert. Diese Zellsuspension wurde zum Quellen für 20 min auf Eis inkubiert. Die Zellen wurden mittels wiederholtem Aufziehen und Ausspritzen in einer 1ml-Spritze mit zunächst einer größeren Kanüle (26G) aufgeschlossen und anschließend mit einer kleineren Kanüle (30G) homogenisiert. Zwischendurch wurde mittels Trypanblaufärbung der Gehalt an noch intakten Zellen bestimmt. Die Prozedur wurde so oft wiederholt, bis über 90 % der Zellen zerstört und homogenisiert waren. Zellfragmente wurde bei $1000 \times g$ abzentrifugiert, während Membranen inklusive Membranproteinen in Lösung blieben. Es folgte die subzelluläre Fraktionierung des Gemisches. Zuerst wurden schwere Membranfraktionen und Organellen, z.B. Mitochondrien, Golgi usw. durch 30-minütige Zentrifugation bei $16500 \times g$ in einer Tischultrazentrifuge (Beckman-Coulter TL-100) pelletiert. Die im Überstand verbliebenen Zytosol- und Membranfraktionen wurde durch 60 min Ultrazentrifugation bei $100.000 \times g$ getrennt. Der Überstand wurde vorsichtig abgenommen und frischer hypotoner Puffer zum Waschen verwendet. Dies erfolgte bei $100.000 \times g$ für 30 min. Nach der 30-minütigen Waschprozedur wurde das erhaltene Pellet in einer geeigneten Menge RIPA-

Lysepuffer aufgenommen und analog Kapitel 2.2.3 geschüttelt und resuspendiert.

2.2.3.4 Immunpräzipitation und Massenspektrometrie

Mittels Immunpräzipitation wurden im Rahmen dieser Arbeit unbekannte Antigene aus dem Gesamtlysate oder aus Membranfraktionen verschiedener Tumor-Zelllinien von anderen Antigenen getrennt und isoliert. Anschließend wurde eine SDS-Gelelektrophorese mit dem Präzipitat durchgeführt und die in einem Parallelansatz durch Westernblot bestätigte Bande mit der Klinge eines Skalpell (Feather, no.15) so eng wie möglich ausgeschnitten. Anschließend wurde Reinstwasser hinzugegeben, so dass das Gelstück komplett benetzt war und direkt zur massenspektrometrischen Untersuchung in das Labor für Proteinanalytik der LMU geschickt.

Um freie Antikörper im Präzipitat zu vermeiden, wurden die Antikörper mit zunächst unbekannter Spezifität durch Zugabe von Dimethylpimelimidat (DMP) kovalent an Protein-G-Sepharose gebunden. Das Präzipitat konnte später durch Zugabe eines reduzierenden und denaturierenden SDS-Probenpuffers in Kombination mit 95°C Hitzeeinwirkung von den Antikörpern und der Sepharose getrennt werden.

Im Vergleich zu Protein A eignete sich Protein G besonders gut für die Bindung der Ratten-Antikörper vom Isotyp IgG1, IgG2a und IgG2b, welche aus Immunisierungen hervorgegangen waren und in dieser Arbeit charakterisiert wurden. Für jeden Antikörper unbekannter Spezifität wurde jeweils auch ein Antikörper des gleichen Isotyps mit irrelevanter Spezifität (meist anti-GST) gekoppelt und mitgeführt.

Zunächst wurde je 1 ml 50%-ige Suspension an Sepharose-Beads in 20 % Ethanol dreimal mit PBS gewaschen und mit 10 ml Hybridom-Überstand 1 h in 15 ml Spitzboden-Röhrchen am Über-Kopf-Schüttler bei RT inkubiert, zweimal mit 0,2 M Natriumborat (pH 9) gewaschen und erneut in 10 ml Natriumborat aufgenommen. Durch Zugabe von 52 mg frisch abgewogenem DMP und Inkubation für weitere 30 Minuten bei RT wurden die Fc-Fragmente der Antikörper kovalent an die *beads* gebunden. Nach Abzentrifugation wurden die Kopplungsreaktion durch eine zweistündige Inkubation mit 0,2 M Ethanolamin (pH 8) bei RT gestoppt. Im Anschluss wurden die gekoppelten *beads* zweimal in 10 ml PBS gewaschen, mit 1 ml PBS aus den 15 ml Röhrchen in ein Eppendorf-Gefäß überführt, erneut zentrifugiert und in 500 µl PBS resuspendiert. Diese Suspension war über mehrere Monate im Kühlschrank stabil. Aliquots davon wurden für die Immunpräzipitation (IP) verwendet.

Als Kontrolle für den Erfolg der kovalenten Kopplung der Antikörper an die Sepharose wurden im Schritt unmittelbar vor und nach Zugabe von DMP 200 µl vom Überstand der Suspension abgenommen, in 3-fach SDS-Probenpuffer aufgenommen, 5 min bei

95°C erhitzt und auf ein SDS-Gel geladen. Vor der Kopplung lösen sich die Antikörper aufgrund schwacher Bindungen von den *beads* und zerfallen aufgrund der reduzierenden Bedingungen des Probenpuffers in leichte und schwere Ketten. Diese sind im Coomassie-gefärbten Gel leicht als Proteinbanden von ca. 60 kD und 30 kD sichtbar. Durch die kovalente Bindung an die *beads* und die kovalente Vernetzung der leichten und schweren Kette durch DMP lösen sich die quervernetzten Antikörper nicht mehr von den *beads*, weshalb im Coomassie-Gel keine Bande sichtbar war. Fiel diese Kontrolle zufriedenstellend aus, wurden die *beads* für Immunpräzipitationen (IP) eingesetzt.

Vor jeder IP wurden die Zelllysate mit ungekoppelter Sepharose G für 1 h bei 4°C auf dem Über-Kopf-Schüttler vorinkubiert, um so unspezifisch an die Sepharose bindende Proteine zu entfernen. Dann wurden 1-2 mg Proteinlysate pro 25 µl gekoppelte *beads* resuspendiert. Es wurde darauf geachtet bei mehreren parallel durchgeführten IPs das Volumen der Lysate ggf. durch Verdünnung mit RIPA zu vereinheitlichen. Die Inkubation mit dem vorinkubierten Lysaten wurde bei 4°C über Nacht durchgeführt. Im Anschluss wurden die *beads* abzentrifugiert und 5x unter besonders stringenten Bedingungen wie folgt gewaschen: 2x mit RIPA, 2x mit PBS+ (PBS, 1% N-Lauroylsarcosin, 0,1% SDS) und 1x mit PBS. Hierdurch wurden Ko-Immunpräzipitate stark reduziert bis ganz ausgeschlossen. Nach einer erneuten Zentrifugation wurden die *beads* in 25 µl 3x-SDS-Proben-Puffer resuspendiert, erhitzt und 5-7 µl für Silber-Färbungen und Westernblots auf SDS-Gele aufgetragen. Nach Bestätigung einer einzelnen Bande im Silbergel und Westernblot, die nicht in der Isotyp-Spur zu sehen war, wurde die IP erneut mit größeren Volumina für präparative Zwecke durchgeführt. Die Proben wurden entweder auf ein Mini-Gel 8 x 8 cm oder auf ein Midi-Gel 15 x 15 cm aufgetragen und die durch Westernblot bestätigte Bande ausgeschnitten. Diese Bande wurde im Anschluss zur massenspektrometrischen Analyse verschickt.

2.2.3.5 SDS-Gelelektrophorese

Proteingemische wurden elektrophoretisch in einem SDS-Polyacrylamid-Gel (PAA) und dem Tris/Glycin-Puffersystem gemäß Lämmli (Laemmli 1970) aufgetrennt. Die Bindung der meisten Proteine an SDS bildet negativ geladene Protein-SDS-Komplexe, die sich durch das dadurch entstandene konstante Ladungs-Masse-Verhältnis und dem Molekularsiebeffekt der Polyacrylamid-Matrix gemäß ihres Molekulargewichts auftrennen lassen. Für geringe Proteinmengen wurde standardmäßig das „mighty small system“ mit 0,75 mm dicken Abstandshaltern verwendet, für präparative Zwecke das „SE 600 System“ (Hoefer) mit 1,5 mm dicken Abstandshaltern und 16 cm Glasplattenlänge. Die Gelelektrophorese erfolgte für die kleinen Gele bei 90 V für ca. 3 h, für große Gele bei 40 V unter Kühlung für ca. 22 h. Ein Größenstandard für Proteine wurde bei jeder Elektrophorese mitgeführt. Alle Proben wurden zuvor in 3x SDS-Probenpuffer für 5 min

bei 95°C erhitzt. Die Gele variierten in ihrem Polyacrylamidgehalt zwischen 10 und 13 %.

2.2.3.6 Färbungen von Polyacrylamid-Gelen

Nach erfolgter SDS-Gelelektrophorese wurden die Gele mit Coomassie-Lösung gleichzeitig gefärbt und fixiert. Durch Schwenken und mehrfaches Austauschen der Entfärbelösung wurden die aufgetrennten Proteinbanden sichtbar gemacht.

Die Silberfärbung wurde verwendet, wenn eine besonders hohe Empfindlichkeit zur analytischen Auswertung mit geringen Proteinmengen gefragt war. Bei der Silberfärbung werden Ag^+ -Ionenkomplexe, die sich mit verschiedenen Aminosäureresten der Proteine bilden, durch alkalisches Formaldehyd zu metallischem Ag reduziert.

Im Anschluss an die Gelelektrophorese wurde das Gel für 1 h bei RT oder 24 h bei 4°C in Fixierlösung und danach 20 min in 50 % Ethanol und weitere 20 min in 30 % Ethanol geschüttelt. Anschließend wurden die Gele 2 min in Imprägnierlösung inkubiert, gefolgt von 3 kurzen Waschschritten mit Wasser. Dann wurde 20 min mit Färbelösung gefärbt und überschüssiges Silbernitrat durch kurzes zweimaliges Waschen mit H_2O entfernt. Sofort nach Abgießen des Wassers wurde das Gel in Entwicklerlösung geschwenkt bis Proteinbanden sichtbar wurden. Schließlich wurde die Entwicklerlösung abgegossen und die Färbereaktion durch 1 min Schwenken in Fixierlösung beendet. Das fertig gefärbte Gel wurde zum Schluss zweimal kurz in Wasser gewaschen und zwischen angefeuchteter Cellophan-Folie auf einem Whatman-Karton für 2 h bei 80°C auf einem Gel-trockner (Bio-Rad) mit angeschlossener Vakuumpumpe luftblasenfrei getrocknet.

2.2.3.7 Westernblot

In PAA-Gelen elektrophoretisch aufgetrennte Proteine wurden mit Standardverfahren auf eine Nitrozellulose-Membran (Hybond ECL, GE Healthcare) übertragen. Dabei dienten mit Blotpuffer getränkte Whatman-Papiere auf beiden Seiten der Membran als Ionenreservoir für einen „semi-dry Western Blot“ (Biorad). Durch Anlegen eines elektrischen Feldes wurden die Proteine aus dem Gel auf die Nitrozellulose-Membran transferiert und immobilisiert. Es wurde bei 11 V und 300 mA für 80-100 min geblottet.

Die Membran wurde danach mindestens für 1 h bei RT oder bei 4°C über Nacht mit 5 % Milchpulver in TBST-Puffer oder Roti-Block®-Konzentrat in TBST inkubiert, um unspezifische Bindungen zu blockieren. Nach 5-maligem Waschen in TBST-Puffer wurde die Membran mit dem Erstantikörper für 3 h bei RT oder über Nacht bei 4°C inkubiert. Handelte es sich bei den Proben um IPs aus biotinyliertem Ausgangsmaterial, wurde nur mit einem HRP-Avidin D-Konjugat oder mit Streptavidin-800-Konjugat (Vector Laboratories) für 1 h bei RT inkubiert. Nach 5-maligem Waschen mit TBST

wurden die Banden mit ECL-Lösung durch Exponierung auf einem Röntgenfilm (CEA) entwickelt bzw. mit dem Odyssey System (LI-COR) sichtbar gemacht. Dieses Infrarot- und Nahinfrarot-Bildgebungssystem kann die Emissionswellenlängen 680 nm und 800 nm simultan detektieren.

Handelte es sich um einen Standard-Westernblot, folgte im Anschluss an die Inkubation mit dem Erstantikörper die Inkubation mit einem geeigneten Spezies-spezifischen Sekundärantikörper, der entweder mit HRP, oder für das Odyssey-System mit einem Fluoreszenz-Farbstoff konjugiert war. Die Entwicklung erfolgte analog zum oben beschriebenen Prozess.

2.2.3.8 Dot-Blot

Native Proteingemische und Onkosomen (1-3 µg Protein) wurden ohne Elektrophorese direkt auf eine Nitrozellulose-Membran aufgetropft. Nach dem Trocknen wurde die Membran mit 5 % Milch in TBST geblockt und, wie unter 2.3.7 beschrieben, gefärbt und entwickelt.

2.2.3.9 Kopplung von Antikörpern mit Fluorochromen

Um die Bindung des 6A10-Antikörpers an Tumorzellen in vivo zu zeigen, wurde er mit dem Infrarot-Farbstoff 800CW (LI-COR) konjugiert. Wie in Kapitel 2.2.4 handelt es sich auch hier um eine NHS-Ester-Verbindung. Die Farbstoff-Succinimidyl-Ester-Konjugate reagieren am besten im alkalischen pH-Bereich mit primären Aminen. Zu diesem Zwecke wurde der gereinigte 6A10-Antikörper mit PBS auf eine Konzentration von 1 mg/ml eingestellt und pro 1 ml dieser Antikörperlösung 100 µl 1 M Phosphatpuffer (K_2HPO_4 , pH 9) hinzugefügt. 0,1 mg 800CW-Farbstoff-Konjugat wurden in 25 µl Reinstwasser aufgelöst, 15 µl des gelösten Farbstoffs wurde sofort zu dem umgepufferten 6A10-Antikörper hinzupipettiert, kurz vermischt und für 2 h lichtgeschützt bei RT inkubiert. Nicht-reagierter Farbstoff wurde in zwei Stufen von den 800CW-konjugierten Antikörpern getrennt. Zunächst wurde der gesamte Ansatz auf eine zuvor mit PBS äquilibrierte Entsalzungssäule (Zeba desalt spin column 5 ml, Pierce) gemäß Herstellerangaben aufgetragen. Nachdem der Markierungsansatz vollständig eingesogen war, wurde 100 µl Reinstwasser dazupipettiert. Das sich in einem 15 ml-Spitzboden-Röhrchen befindliche Säulchen wurde 2 min bei 1000 x g zentrifugiert. Der von freiem Farbstoff deutlich abgereicherte Durchfluss wurde in ein 1,5 ml Gewindefläschchen aus Braunglas überführt und zur weiteren Abreicherung des freien Farbstoffes einer Mikro-Dialyse-Prozedur wie folgt unterzogen. Mithilfe eines O-Rings wurde eine Dialysemembran über das Gewindefläschchen gespannt und mit weiteren O-Ringen befestigt. Durch Abtupfen an einem sauberen Küchentuch wurde die Dichtigkeit der Membran kontrolliert. Das Röhrchen wurde mit der Membran nach unten in einen Styropor-Schwimmer

gesteckt und bei RT dreimal innerhalb von 24 h gegen je 2 L PBS dialysiert. Die im Fläschchen verbliebene Lösung war danach weitgehend frei von Farbstoff-Aggregaten oder freiem Farbstoff.

2.2.4 Immunbiologische Methoden

2.2.4.1 Durchflusszytometrie

Die Expression von Oberflächenantigenen in Einzellzellsuspensionen wurde mittels Durchflusszytometrie untersucht. Zur Färbung wurden etwa 2×10^5 Zellen eingesetzt und, wenn nicht anders angegeben, ca. 3×10^4 lebende Zellen gemessen. Die 20-minütige Inkubation mit Fluorochrom-markiertem oder unmarkierten Antikörper fand in einem Volumen von 50 μ l PBS/2 % FCS auf Eis statt. Bei deutlich mehr zu färbenden Zellen wurde das Färbenvolumen entsprechend erhöht. Im Falle von unmarkierten Antikörpern wurden die Zellen nach einem Waschschrift mit einem Fluorochromgekoppelten Sekundärantikörper weitere 20 min auf Eis inkubiert. Nach einem weiteren Waschschrift wurden die Zellen in 200 μ l PBS/2 % FKS resuspendiert und am FACSCalibur (BD) analysiert. Alle Zentrifugationsschritte erfolgten für 5 min bei RT und 1000 x g.

Vor jeder Analyse am FACS LSR II, Fortessa bzw. Sortierung am Aria III wurden die Zellen unmittelbar vor Beginn der Durchflusszytometrie durch einen 70 μ m-Zellsieb vereinzelt und anschließend mit Propidiumiodid (500 ng pro ml Zellsuspension) gefärbt, um tote Zellen zu identifizieren. Die Daten wurden mit der Flowjo 9 Software ausgewertet.

Durchflusszytometrische Arbeiten am LSR II, LSR Fortessa und am ARIA III-Zellsorter wurden zusammen mit Dr. Josef Mysliwietz durchgeführt.

2.2.5 Tierversuchskundliche Methoden

Immunsupprimierte Mäuse wurden in einem speziellen pathogenfreien Bereich artgerecht nach §8 Ab. 1 des Tierschutzgesetzes (Stand 10/09) der Regierung von Oberbayern gehalten. Die Haltung erfolgte in vollklimatisierten Räumen mit Temperatur- und Feuchte-Regelung, eigener Luftversorgung, geregelter 12 Stunden Tag-Nachtrhythmus, sowie regelmäßiger Umsetzung und ad libitum Fütterung und Tränkung der 3-4 Tiere pro Käfig (IVC).

Bei Versuchsbeginn hatten die Mäuse ein durchschnittliches Alter von 32 Tagen und ein Gewicht von etwa 23 g. Zeigten Mäuse in Ausnahmefällen früher als der Rest der Gruppe Symptome, die den Abbruchkriterien entsprachen, wurden sie durch Tötung aus dem Versuch genommen. Generell wurde der Versuch beendet, sobald die ersten

Mäuse Symptome zeigten, die einen Abbruch des Versuches nahelegten (siehe Tab. 3.1).

2.2.5.1 Transplantation von Tumorzellen

Um Tumoren im Bauchraum zu etablieren, wurde für zwei Lentivirus-transduzierte Zelllinien, die die Gaussia-Luziferase exprimierten (A549/GFP/gLuc und U87/GFP/gLuc), verschiedene Zellzahlen zunächst in HBSS-Puffer (Sigma) gewaschen und anschließend in physiologischer Kochsalzlösung (B. Braun) aufgenommen, sodass jeweils 300 µl Zellsuspension pro Maus i.p. gespritzt werden konnten. Dazu wurden von beiden Zelllinien eine größere Menge "Master-Mix" angefertigt. Zwischen der Beladung jeder einzelnen Spritze wurde der Mix mehrfach geschüttelt. So wurde gewährleistet, dass alle Tiere eines Versuches nahezu identische Tumorzellzahlen erhielten. Zur Injektion wurden 1 ml Spritzen mit aufsetzbarer 26G-Kanüle (B. Braun) verwendet.

Unmittelbar vor Versuchsbeginn wurden die zu transplantierenden Zellen auf Mycoplasmen getestet. Um die Gesundheit der Tiere nicht zu gefährden und um Infektionen im SPF-Bereich zu vermeiden, wurden nur Mycoplasmen-negative Zellen in die Versuche eingesetzt.

2.2.5.2 Injektion der Therapie- und Kontrollantikörper

Nach erfolgter Injektion der Tumorzellen in das Peritoneum wurde den Tieren im Anschluss die erste Dosis des 6A10- bzw. Isotyp-Antikörpers in einem Volumen von je 200 µl intraperitoneal verabreicht. Diese Injektionen wurden ab Versuchsbeginn wöchentlich immer am selben Wochentag zur selben Zeit bis zum Ende der Versuchsreihe mit Erreichen der Abbruchkriterien durchgeführt. Zur Injektion wurde eine 1-ml Spritze mit aufsetzbarer 26G-Kanüle verwendet. Die Spritzen wurden für die Injektion verschiedener Antikörper gewechselt.

2.2.5.3 Biolumineszenz-basierte Bildgebung

Die Tumorlast der Mäuse wurde in der Regel einmal wöchentlich durch eine Biolumineszenz-basierte Bildgebung bestimmt. Aliquotiertes, in Methanol gelöstes Coelenterazin (100 µg pro Maus), das als Substrat für die Gaussia-Luziferase diente, wurde unmittelbar vor der Messung mit 200 µl HBG-Puffer in einer 30G Insulinspritze gemischt und damit luftblasenfrei intravenös (i.v.) in eine der lateralen Schwanzvenen injiziert. Hierzu wurde die Maus zunächst in einer Isofluran-haltigen Atmosphäre anästhesiert und im Inneren der Messkammer des IVIS II Systems (Caliper) an einer schwarzen Plexiglasscheibe mithilfe von Haushaltsgummi-Schlaufen befestigt. Direkt nach erfolgter Injektion wurde die Kammer geschlossen und dadurch automatisch die Messung ausgelöst. So wurde sichergestellt, dass alle Mäuse etwa zum selben Zeitpunkt nach

Injektion gemessen wurden. Alle Messungen wurden sorgfältig protokolliert und mit der Living Image Software (Caliper) analysiert und quantifiziert.

Dazu wurde ein Messbereich (*region of interest* oder kurz ROI) in Mausform auf jede Maus gelegt. Diese Form wurde für alle Mäuse beibehalten, sodass immer die selbe Messfläche abgedeckt war. Dadurch, dass die Mäuse in möglichst identischer Position fixiert wurden, hat sich diese Art der Messung für die Quantifizierung bewährt. Die Anzahl der Photonen, die pro Sekunde auf den Detektor der CCD-Kamera trafen, wurden schließlich quantifiziert. Da das Licht in einem kegelförmigen Raumwinkel (Steradian, sr) ausgehend von der im Gewebe liegenden Strahlungsquelle (=Luziferase-exprimierender Tumor) ausgestrahlt wird, wurde diese physikalische Eigenschaft zusammen mit der Oberfläche der durch die ROI eingegrenzte zweidimensionale Fläche einberechnet. Die so normalisierte Messgröße wird als *radiance* bezeichnet und in der Einheit Photonen/sec/cm²/sr angegeben. Mit der Prism 5 Software (GraphPad) wurden die Messwerte in Kurvenform geplottet und statistisch ausgewertet.

2.2.5.4 Immunisierung von Ratten

Je eine LOU/C-Ratte wurde mit 10 µg Exosomen aus A549, SK-Mel 23, MSTO 211H, SR1Mel oder RBL-CA IX unter Zugabe von „Inkomplete Freud's Adjuvant“ immunisiert. Nach 9 Wochen wurde mit 10 µg Exosomen und CPG 2006 als Adjuvans zum zweiten Mal immunisiert.

2.2.5.5 Herstellung von Hybridom-Klonen

Mit Hilfe der Hybridomtechnik gemäß Köhler und Kollegen (Kohler and Milstein 1975) entstehen aus einem Zellklon große Mengen monoklonaler Antikörper. Nachdem die immunisierten Ratten Antikörper gegen verschiedene onkosomale Antigene gebildet hatten, wurden die B-Lymphozyten aus der Milz isoliert und mit einer Myelomzelllinie mittels Zugabe von Polyethylenglykol (PEG) zu einem Antikörper-sezernierenden und potenziell unsterblichen Hybridom fusioniert. Diese Mischung aus Hybridomzellen wurde schließlich durch limitierende Verdünnung kloniert, sodass klonale Hybridome entstanden. Der Isotyp der sezernierten Antikörper wurde mit spezifischen ELISAs identifiziert und solche Hybridome, die Antikörper vom IgG-Typ produzierten, wurden weiter untersucht. Diese Untersuchungen umfassten zunächst durchflusszytometrische Bindungsstudien an verschiedene Zelllinien und primären Zellen wie PBMCs. Die große Zahl der Hybridome konnte durch diese Verfahrensweise reduziert werden. Klone, die diese Kriterien erfüllten, wurden expandiert und weiter charakterisiert.

2.2.6 Statistik

Grundsätzlich wurden mindestens 3 biologische Replikate bei den Analysen untersucht. Die Kalkulation der statistischen Signifikanzwerte wurde mit dem Programm Prism 5 (GraphPad) als zweiseitiger T-Test mit 95%-Konfidenzintervall ermittelt. Parallel zu jedem Versuch wurden Kontrollen durchgeführt, die als Referenz dienten. Statistische Signifikanz wurde in Form von p-Werten ausgedrückt. Dabei wurden ein Stern für einen p-Wert $\leq 0,05$, zwei Sterne für $p < 0,01$, drei Sterne für $p < 0,001$ und vier Sterne für $p < 0,0001$ vergeben. Nicht-signifikante Werte und Tendenzen wurden zur Vereinfachung nicht gekennzeichnet. Fehlerbalken wurden, wenn in den Ergebnis-Legenden nicht anders angegeben, immer angezeigt. Andere statistische Tests wurden in der jeweiligen Legende aufgeführt und nach dem selben Prinzip auf ihre Signifikanz bewertet.

3 ERGEBNISSE

3.1 Einfluss des 6A10-Antikörpers auf das Tumorwachstum in vitro

Da der Carboanhydrase XII-spezifische Antikörper 6A10 das Enzym im zellfreien System spezifisch und effizient inhibiert (Battke et al. 2011), stellte sich die Frage, ob dies auch für natives Enzym in Zellmembranen gilt. Die Carboanhydrase hydriert in effizienter Weise CO_2 . Die folgenden Untersuchungen wurden von der Hypothese getrieben, dass die typischen Zellkulturmedien zuviel Bicarbonat enthalten, um CA XII-Effekte messen zu können. RPMI und DMEM enthalten in der Regel 44 mM Bicarbonat, so dass darin kultivierte Zellen wahrscheinlich unabhängig von der Aktivität der CA XII sind. Deshalb wurde zunächst untersucht, unter welchen pH- und Pufferbedingungen Tumorzellen noch proliferieren, wenn das CO_2 -Bicarbonatsystem durch ein künstliches Puffersystem wie HEPES oder MES ersetzt wurde oder alternativ die Bicarbonatkonzentration titriert wird. Dabei zeigte sich, dass A549-, U87- und U251-Zellen in Medium, das nur mit 1 mM Bicarbonat gepuffert war, nicht wuchsen, aber 10 mM Bicarbonat gut tolerierten (Daten nicht gezeigt).

Die Verwendung von minimal Bicarbonat-gepuffertem Medium sollte eine Untersuchung der inhibitorischen Wirkung des 6A10-Antikörpers in der Zellkultur ermöglichen, da eine geringere Konzentration an Bicarbonat durch das Tumorwachstum und die damit verbundene Säureproduktion schneller neutralisiert werden sollte, und daher die Zellen eine Abhängigkeit von der Bicarbonat-Produktion der Carboanhydrase XII zeigen sollten. Als Vorbedingung wurde auch der Einfluss des extrazellulären AnfangspH-Wertes auf die Proliferationsrate mittels MTT-Tests analysiert.

A549-, U87- und U251-Zellen zeigten bei Inkubation in Medium, das mit 30 mM MES oder HEPES gepuffert worden war, ein zwar etwas verlangsamtes, aber beständiges und stabiles Wachstum, so dass sie sich für kurz- und mittelfristige Inkubationen eigneten.

Nach drei Tagen Inkubation zeigte sich, dass A549 (Abb. 3.1) und U87-Zellen (Daten nicht gezeigt) erst ab einem anfänglichen pH-Wert von 6,5 leicht proliferierten, niedrigere pH-Werte tolerierten die Zelllinien nicht. Ein ebenso niedriger Anstieg wurde bei dem nächst höheren pH-Wert von 6,8 gefunden. Bei pH 7,3-7,4 war die Proliferationsrate am höchsten. Dies ist auch der pH-Wert, der in kommerziellen Medien normalerweise eingestellt ist.

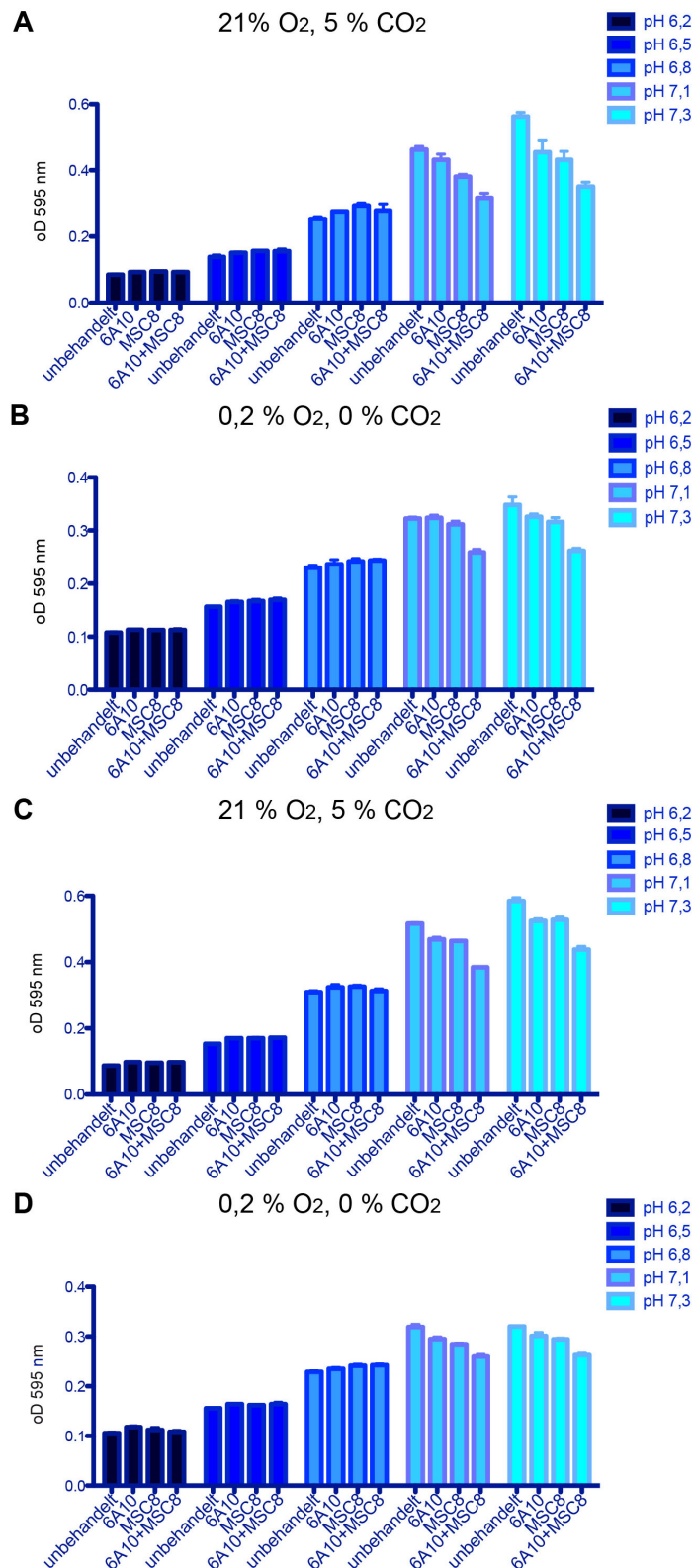


Abb. 3.1 MTT-Test von A549 2D-Kulturen bei unterschiedlichen Säurebedingungen

Zunächst wurden inhibitorische Antikörper, die gegen CA XII (Klon 6A10) oder CA IX (Klon MSC8) gerichtet waren, bzw. der Kombination aus beiden Antikörpern, mit Bicarbonat-freiem DMEM (30 mM MES-Puffer) vermischt und darin A549-Lungenkarzinomzellen resuspendiert, sodass sich eine Endkonzentration von 10 µg/ml (**A**, **B**) bzw. 25 µg/ml (**C**, **D**) Antikörper ergaben. Als Kontrolle dienten Zellsuspensionen ohne Antikörper-Zusatz.

Triplikate wurden über 3 Tage bei normalen Sauerstoff- und Kohlendioxidpartialdrücken (**A**, **C**) bzw. bei hypoxischen Bedingungen mit vollständiger Abwesenheit von exogenem CO₂ (**B**, **D**) in 96-Lochplatten inkubiert. Zellvitalität und Proliferation wurde mittels MTT-Test bestimmt.

Sowohl in minimal gepuffertem Medium (10 mM Bicarbonat), als auch Bicarbonat-freien Medien mit dem jeweils üblichen Anfangs-pH-Wert von 7,4, erwiesen sich die untersuchten Zellen sowohl bei Normoxie (21 % O₂ in der Atmosphäre) als auch bei Hypoxie (0,2 % O₂) als lebensfähig und geeignet, um den Einfluss der CA XII zu untersuchen. Ein potenzieller Einfluss des Bicarbonat-freien Mediums auf die Expression der CA IX bzw. XII konnte bisher nicht festgestellt werden, wie in Abb.3.3 für HT29-Zellen exemplarisch dargestellt.

3.1.1 Verlangsamtes Wachstum kultivierter Tumorzellen bei Blockierung der CA XII und CA IX

Bei Inkubation von A549-Zellen mit 6A10 unter Hypoxie und auch unter Normoxie konnte ein leichter Rückgang der Proliferationsrate festgestellt werden (Abb. 3.1). Dieser Effekt wurde ebenfalls durch Zugabe des MSC8-Antikörpers (Murri-Plesko et al. 2011) in vergleichbarer Stärke erreicht; den stärksten Effekt erreichten beide Antikörper gemeinsam. MSC8 ist der erste inhibitorische Antikörper gegen die humane CA IX (freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Prof. Dr. Christoph Renner, Universitäts-Spital Zürich). Dieser Effekt wurde erst ab einem pH-Wert von 7,1 deutlich, unter niedrigeren Anfangs-pH-Werten wurden keine Unterschiede gemessen (Abb. 3.1). Eine Wachstumsinhibition durch MSC8 unter Normoxie war überraschend, da CA IX in A549-Zellen bei Normoxie nicht nachweisbar exprimiert wird. Leider war nicht bekannt, ob MSC8 absolut CA IX-spezifisch ist oder auch andere membranständige CA inhibieren kann. Wie eingangs erwähnt, ist allerdings bekannt, dass die CA IX bei dicht kultivierten Zellen exprimiert werden kann. Dies könnte auch bei den gewählten Kulturbedingungen der Fall gewesen sein, da diese Zellen eine Generationszeit von nur ca. 24 h haben, und die gewählte Inkubationszeit 3 Tage betrug. Obwohl es auch Beispiele für Zelllinien gab, die die CA IX auch bei Normoxie exprimierten (z.B. Glioblastomzelllinien U87-, U251-, U373-Zellen oder PCI-1 Hypopharynxkarzinom), wurde das Enzym in den meisten Zelllinien erst bei Sauerstoffmangel induziert (Abb. 3.2).

Um die Folgen einer CA XII-Inhibierung weiter zu untersuchen, verwendeten wir auch HT29 Kolonkarzinomzellen, welche mit shRNAs gegen die CA IX stabil transfiziert waren (freundlicherweise von Dr. Alan McIntyre, University of Oxford, zur Verfügung gestellt). Diese Zellen (HT29-shCA IX) zeigten einen effizienten *knockdown* der CA IX bei Hypoxie (Abb. 3.3). Als Vergleich dienten HT29-Zellen, die mit einem Kontrollvektor transfiziert worden waren (HT29-EV). Diese Zelllinien wurden mit 6A10, FO151 oder beiden Molekülen über drei Tage bei Hypoxie inkubiert. FO151 ist ein neuartiger Carboanhydrase-Inhibitor, welcher bevorzugt die CA XII blockieren soll (freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Prof. Dr. Claudiu Supuran, Florenz, Italien). Als Kontrolle

wurden ein IgG2a-Isotypantikörper bzw. das Lösungsmittel von FO151 (DMSO) eingesetzt. Bei diesen Versuchen zeigte sich eine wachstumsinhibierende Wirkung von FO151 auf HT29-shCA IX-Zellen (Abb. 3.3).

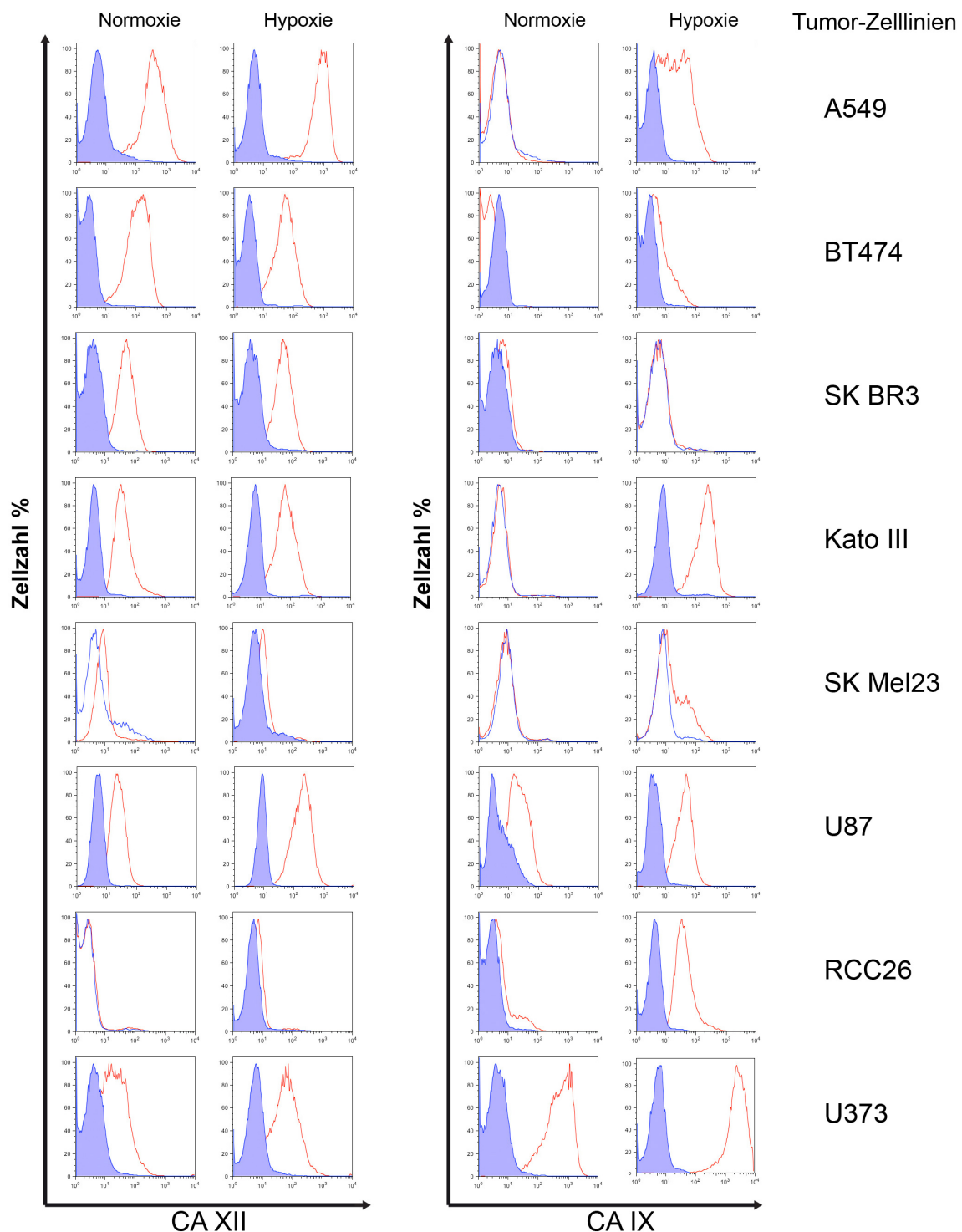


Abb. 3.2 Expressionsprofile der CA IX und CA XII in verschiedenen Zelllinien bei Normoxie und Hypoxie

Durchflusszytometrische Analysen verschiedener Zelllinien wurden nach 2-3 Tagen Inkubation unter 21 % bzw. 0,2 % O_2 durchgeführt. Blaue Histogramme stellen die jeweiligen Isotyp-Kontrollen, rote Histogramme die CA XII bzw. CA IX-Färbungen dar.

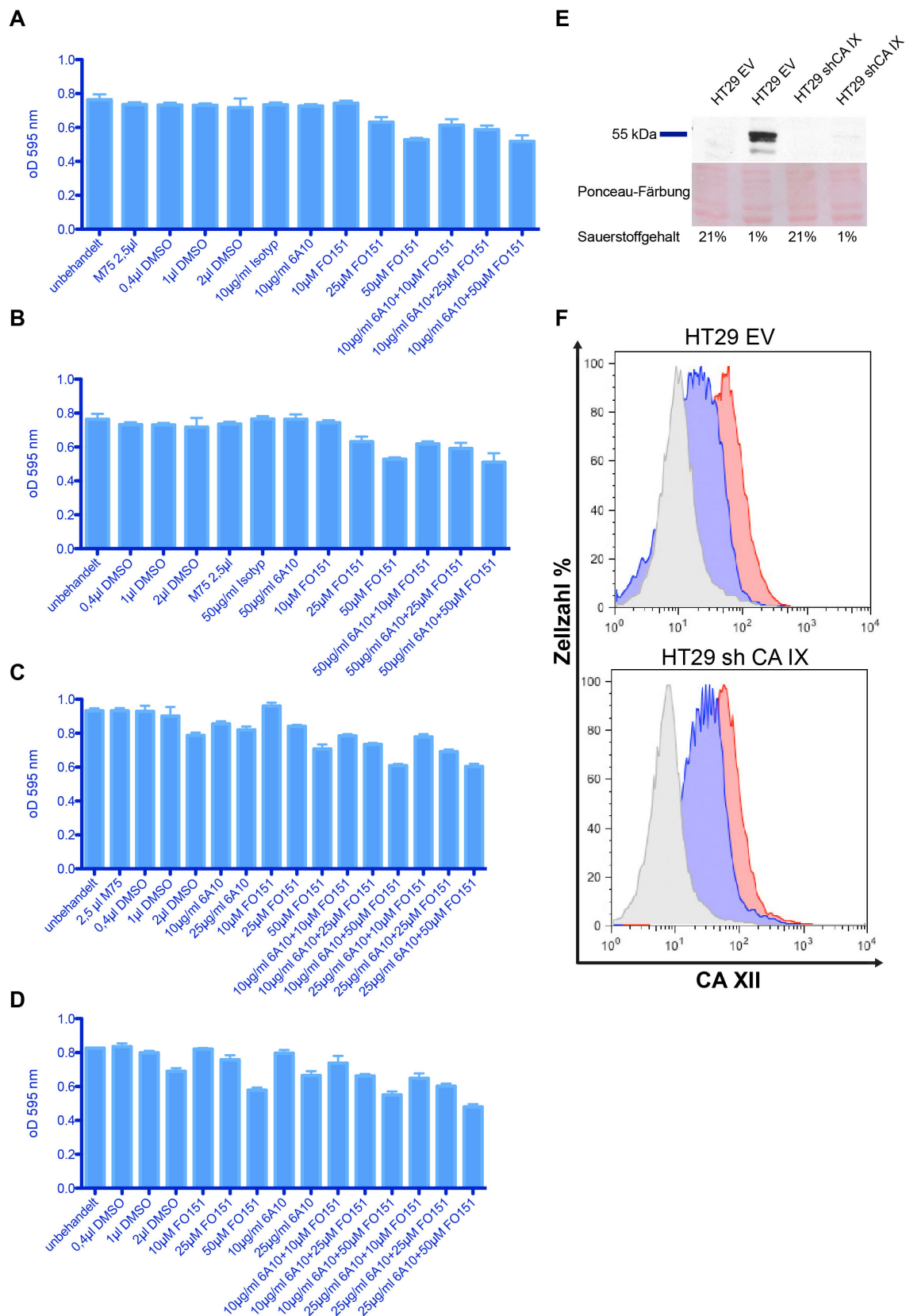


Abb. 3.3 Die Verwendung von Bicarbonat-freiem Medium ermöglicht Carboanhydrase XII-spezifischen Inhibitoren das Wachstum von Tumorzellen in 2D-Kultur zu hemmen

(A, B) A549-Zellen wurden in Bicarbonat-freiem DMEM (30 mM MES-Puffer) über 2 Tage bei hypoxischen Bedingungen (0,2 % O₂) in 96-Lochplatten wahlweise mit 10 µg/ml 6A10-Antikörper (A) bzw. 50 µg/ml (B) oder einem chemischen Carboanhydrase-Inhibitor (aus dem Labor von Prof. Dr. Supuran, Florenz, Italien) bzw. deren Kombination inkubiert. Dieser Hemmstoff (FO151) lag in DMSO gelöst vor. Als Kontrolle wurde DMSO in entsprechend gleichen Volumina eingesetzt. Als weitere Kontrolle wurde ein CA IX-spezifischer Antikörper (M75) aus

dem Labor von Prof. S. Pastorekova, Slovak Academy of Sciences, Bratislava) verwendet, der zwar an CA IX bindet, jedoch bekanntermaßen keine inhibierende Wirkung aufweist. Zellvitalität und Proliferation wurde mittels MTT-Test bestimmt.

(C, D) Es wurden HT29-Zellen, die mit einem Kontrollvektor (HT29 EV) **(C)** oder einem für shRNAs gegen die CA IX kodierenden Plasmid transfiziert waren (HT29 sh CA IX) **(D)**, analog zu oben genannten Kulturbedingungen über 3 Tage bei Hypoxie inkubiert.

Wie auch in A549-Zellen, wird in HT29-Zellen die CA IX (Masse: ca. 55 kDa), deren Enzymaktivität für die der CA XII kompensieren könnte, nur unter hypoxischen Bedingungen (hier 1 % O₂) exprimiert. **(E)** Dies konnte mittels eines Westernblots für die Leervektor-exprimierenden HT29-Zellen (HT29 EV) bestätigt werden, sowie der effiziente *knockdown* durch gegen CA IX gerichtete shRNAs (HT29 shCA IX). **(F)** Eine mögliche Hochregulation der CA XII aufgrund des knockdowns der koexprimierten CA IX konnte anhand der gezeigten durchflusszytometrischen Untersuchung beider HT29-Populationen ausgeschlossen werden. Das jeweils graue Histogramm zeigt die Isotyp-Kontrolle, das blaue die CA XII-Expression bei Normoxie (21 % O₂) und das rote die CA XII-Expression bei Hypoxie (1 % O₂).

Durch die gleichzeitige Zugabe von FO151 und 6A10 ließ sich die Wachstumsinhibition noch steigern. Bei den parallel mitgeführten, identisch behandelten HT29-EV-Zellen wurde eine deutlich weniger ausgeprägte Inhibierung beobachtet, was wahrscheinlich mit der Expression der CA IX in diesen Zellen zusammenhängt (Abb. 3.3).

3.1.2 Reduziertes Wachstum kultivierter Tumorzellen bei Blockierung der CA XII und CA IX im Sphäroid-Modell

Durch die weltweit einzigartige Möglichkeit mit dem 6A10-Antikörper spezifisch nur die CA XII zu inhibieren, ohne dabei andere CAs zu beeinflussen, wurden die oben beschriebenen Ergebnisse in 2D-Kulturen gewonnen. Durch Anwendung dreidimensionaler Sphäroid-Modelle (Abb. 3.4), welche die reale Situation in soliden Tumorzellverbänden *in vivo* deutlich besser simulieren, wurden noch stärkere Effekte als die in 2D-Kulturen gemessenen Trends erwartet, da sich die physiologisch relevanten Sauerstoff- und pH-Gradienten in dreidimensional wachsenden Zellen auf viel natürlichere Weise ausbilden, als bei dauerhaft gleichmäßig perfundierten 2D-Kulturen.

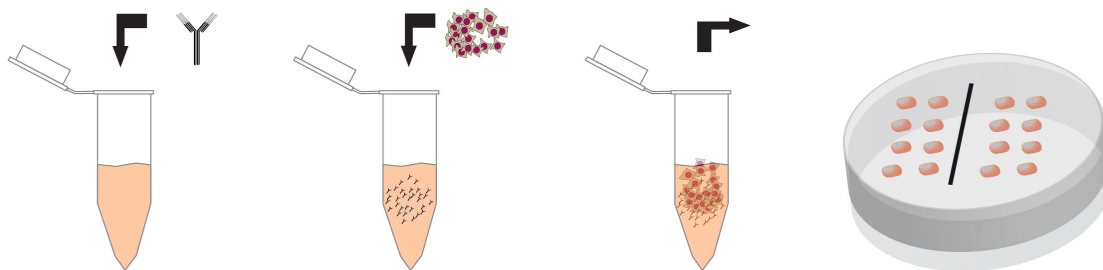


Abb. 3.4 Prinzip der Sphäroidversuche

Zunächst wurden Antikörper mit der jeweiligen Medium/Puffer-Kombination vermischt (Endkonzentration 25 µg/ml), Tumorzellen dazugegeben und das Gemisch als Sphäroid-Tropfen auf die hydrophobe Oberfläche des Petrischalendeckels aufgetragen. Sphäroide wurden für 2-4 Tage im Brutschrank bei 37 °C gehalten.

Zu diesem Zweck wurden multizelluläre Sphäroide aus verschiedenen Zelllinien gene-

riert, welche in der Regel die CA IX und XII zumindest unter hypoxischen Bedingungen koexprimierten. Es wurden im Zuge dieses Projektes aber auch zwei Brustkrebs-Zelllinien aus unserem Bestand identifiziert (SKBR3 und BT474), welche auch unter Hypoxie CA IX-negativ blieben (Abb.3.3). Diese eigneten sich daher hervorragend zur Untersuchung des Einflusses einer CA XII-Inhibition ohne den möglichen kompensatorischen Effekt der CA IX.

In 2D-Kulturen wurde bei Verwendung des CO₂/Bicarbonat-Puffersystems nur bei einer niedrigen Bicarbonatkonzentration (10 mM) eine 6A10-bedingte wachstumsinhibierende Wirkung beobachtet. Ließ man Tumorzellen aber als dreidimensionale Sphäroide wachsen, konnte sogar bei 44 mM Bicarbonat ein inhibierender Effekt von 6A10 beobachtet werden.

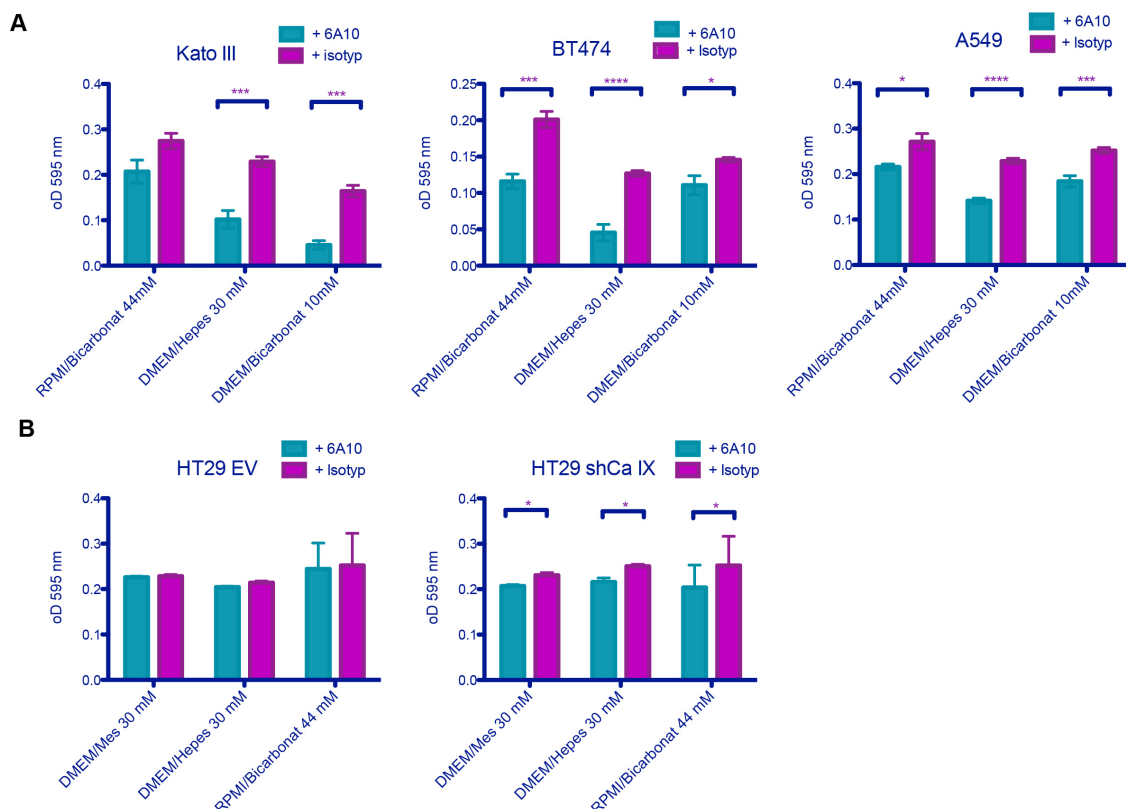


Abb. 3.5 Wachstumsinhibition verschiedener als Sphäroide kultivierter Tumor-Zelllinien durch 6A10 in Abhängigkeit der Bicarbonat-Konzentration und der Ko-Expression der CA IX

(A) Verschiedene Tumor-Zelllinien (Kato III, BT474, A549) wurden zusammen mit 6A10 bzw. einem Isotyp-Antikörper (25 µg/ml) über 3 Tage gemäß Abb. 3.4 unter normalen Sauerstoff-Bedingungen (21 % O₂) als Sphäroide kultiviert. Die Inkubation erfolgte in RPMI-Vollmedium (44 mM Bicarbonat), Hepes-gepuffertem DMEM (30 mM bzw. 10 mM Bicarbonat). Zellvitalität und Proliferation wurde mittels MTT-Test bestimmt

(B) Stabil transfizierte HT29 Kolonkarzinomzellen wurden auf die gleiche Weise behandelt, jedoch unter Hypoxie (0,2 % O₂) inkubiert. Die Inkubation erfolgte in Mes-gepuffertem DMEM (30 mM Bicarbonat), Hepes-gepuffertem DMEM (30 mM Bicarbonat) oder RPMI-Medium (44 mM Bicarbonat). Zellvitalität und Proliferation wurde mittels MTT-Test bestimmt. Jeweils 6 Replicate wurden analysiert. Die statistische Auswertung erfolgte mittels Student's t-test. Werte unter p<0,05 wurden als signifikant beurteilt.

Dieser wurde erwartungsgemäß mit Abnahme der Bicarbonatkonzentration von 44 mM über 30 mM bis zu 10 mM noch stärker. Dieses Resultat konnte mit A549 und Kato III-Zellen (Magenkarzinom), die ein ähnliches CA IX/XII-Expressionsprofil aufwiesen, reproduziert werden (Abb. 3.5A).

Ein besonders starker Proliferationseinbruch wurde bei der CA IX-negativen BT474-Brustkrebs-Zelllinie beobachtet, welche als Sphäroidkultur auch in Bicarbonat-freiem Hepes-gepufferten Medium gut wuchsen. Auch für U87-Glioblastomzellen konnte ich trotz sehr hoher CA IX-Expression eine signifikante Wachstumsinhibition nachweisen (Daten nicht gezeigt). In Abb. 3.5B ist der direkte Vergleich des Einflusses der CA XII-Inhibition durch 6A10 von Sphäroidkulturen der oben bereits beschriebenen HT29-Zellen, welche shCA IX bzw. den Leervektor exprimierten, gezeigt. Nur durch *knock-down* der CA IX ließ sich ein signifikanter, wachstumsinhibierender Effekt von 6A10 nachweisen.

Um zu untersuchen, bei welcher Sphäroidgröße die Wachstumsinhibition durch 6A10 am stärksten ausgeprägt ist, setzte ich verschiedene Zellzahlen ein und inkubierte die Sphäroide mit gleichbleibender 6A10 Konzentration in Hepes-gepuffertem Medium und normoxischen Sauerstoffbedingungen (21 % O₂), da sich vermutlich bei der untersuchten Zelldichte im Sphäroid ein hypoxischer Gradient zwischen den inneren und äußeren Zellschichten ausbilden konnte. Dabei zeigte sich, dass im Bereich von anfangs 8000-16000 eingesetzten Zellen die größten Effekte zu beobachten waren: Sowohl individuelle Effekte der CA XII- und CA IX-Inhibition, als auch ein synergistischer Effekt durch Kombination beider Antikörper (Abb. 3.6).

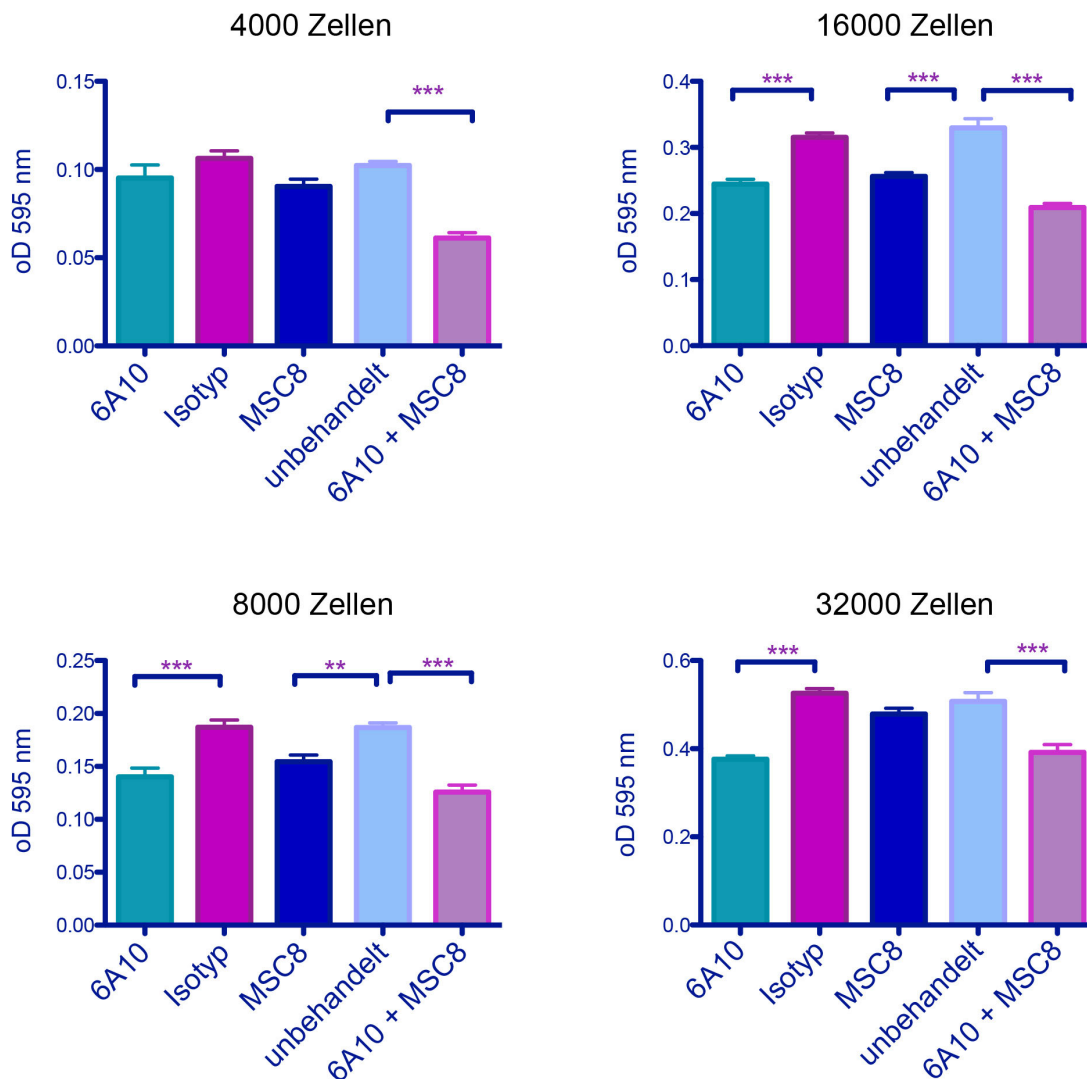


Abb. 3.6 Synergistische Wirkung durch kombinierte Behandlung von Tumorzell-Sphäroiden mit inhibitorischen CA XII- (6A10) und CA IX-Antikörpern (MSC8)

Verschiedene Mengen an A549-Zellen wurden zusammen mit den inhibitorischen Antikörpern, die gegen CA XII (Klon 6A10) oder CA IX (Klon MSC8) gerichtet waren bzw. der Kombination aus beiden Antikörpern, mit Bicarbonat-freiem DMEM (30 mM Hepes-Puffer) vermischt und darin schließlich A549-Lungenkarzinomzellen resuspendiert, sodass sich eine Endkonzentration 25 µg/ml Antikörper ergaben. Als Kontrollen dienten unbehandelte oder mit gleicher Konzentration eines Isotyp-Antikörpers inkubierte Sphäroide. Die Inkubationen wurden bei Normoxie (21 % O₂) durchgeführt. Jeweils 7 Replikate wurden analysiert. Die statistische Auswertung erfolgte mittels Student's t-test. Werte unter p<0,05 wurden als signifikant beurteilt.

Betrachtet man die Ergebnisse aus den Abbildungen 3.1 bis 3.6 zusammen, resultiert aus der Blockierung der CA XII ein eindeutiger, wachstumshemmender Effekt, der durch CA IX kompensiert werden kann.

3.1.3 Eine Real-Time-PCR-Analyse zeigt Herunterregulation von NBC2 als Antwort auf 6A10-Behandlung von Sphäroiden

Da es bisher keinen CA XII-spezifischen Inhibitor gab, konnten bisher keine Daten zu möglichen regulatorischen Effekten, die durch eine Blockierung der CA XII entstehen könnten, erhoben werden. Durch die zuvor erarbeiteten Kulturbedingungen und den

hier erbrachten Nachweis der 6A10-bedingten Wachstumsverzögerungen verschiedener Zelllinien *in vitro*, war die Grundlage für eine Analyse ausgewählter Transkripte gelegt worden. Alle untersuchten Transkripte sind bekannte Proteine, die in der pH-Regulation (siehe Abb. 1.3) eine wichtige Rolle spielen und somit für die Untersuchung in Frage kamen.

Dazu wurden Sphäroide aus den beiden CA XII-positiven Zelllinien A549 und SKBR3 zusammen mit je 25 µg/ml 6A10 bzw. Isotyp-Antikörper über drei Tage unter Normoxie in Hepes-gepuffertem Bicarbonat-freiem Medium inkubiert, um einen Überfluss an Bicarbonat in Standard-Medien auszuschließen.

Um das richtige *housekeeping*-Gen, das sich als Referenz für quantitative PCR eignet, zu identifizieren, wurden die folgenden fünf Kandidaten untersucht: HPRT, HMBS, ACTB, GAPDH und TBP. Die Unterschiede in den Cp-Werten zwischen Isotyp- und 6A10-behandelten Sphäroiden waren für alle gering. Für das HMBS-Gen waren sie sowohl in Sphäroiden als auch in 2D-Kulturen am geringsten, weshalb in der Folge dieses Gen als Referenzgen benutzt wurde.

Wie oben beschrieben, exprimierten A549 Zellen die CA IX nur unter Hypoxie, während in SKBR3-Zellen selbst unter hypoxischen Bedingungen eine CA IX-Expression praktisch nicht nachweisbar war (Abb. 3.3). Die Real-Time-PCR-Analyse zeigte erwartungsgemäß eine deutliche CA IX-Expression in Sphäroiden, da die Diffusion von Sauerstoff durch mehrere übereinanderliegende Zellschichten erschwert ist und sich daher ein hypoxischer Kern ausbildet (Abb. 3.7A). In SKBR3-Sphäroiden konnten CA IX gerade an der Detektionsgrenze nachgewiesen werden, da die Schmelzkurven im Rahmen dieser Arbeit oberhalb eines Cp-Werts von 35 (Abb. 3.7B) auf kein spezifisches PCR-Produkt hinwiesen. Trotz Normoxie wurden für die CA IX in A549-Sphäroiden Cp-Werten von 28 und 29 gemessen (Abb. 3.7A). In 2D-Kulturen (auf HMBS als *housekeeping*-Gen normalisiert), die unter Hypoxie inkubiert worden waren, war der Cp-Wert der CA IX um den Wert 6 niedriger, was etwa einer 18-fach höheren CA IX-Expression entspricht (Daten nicht gezeigt). Dabei ist aber zu berücksichtigen, dass unter Hypoxie alle A549-Zellen CA IX exprimieren, während das in Sphäroiden unter Normoxie wahrscheinlich nur die Zellen im Inneren tun.

Dies steht im Einklang mit den durchflusszytometrisch ermittelten Daten zur differentiellen Expression von CA IX. Nur unter hypoxischen Bedingungen konnte die CA IX in 2D-Kultur nachgewiesen werden (Abb. 3.2). Deshalb wurde beispielsweise die Effizienz des CA IX-spezifischen Primerpaares, die zur Berechnung des Verhältnisses zwischen Transkript und Referenzgen benötigt wurde, mit cDNAs aus hypoxischen 2D-Kulturen von A549-Zellen bestimmt, da unter diesen Bedingungen erwartungsgemäß

keine CA IX-Transkripte nachweisbar waren (Daten nicht gezeigt).

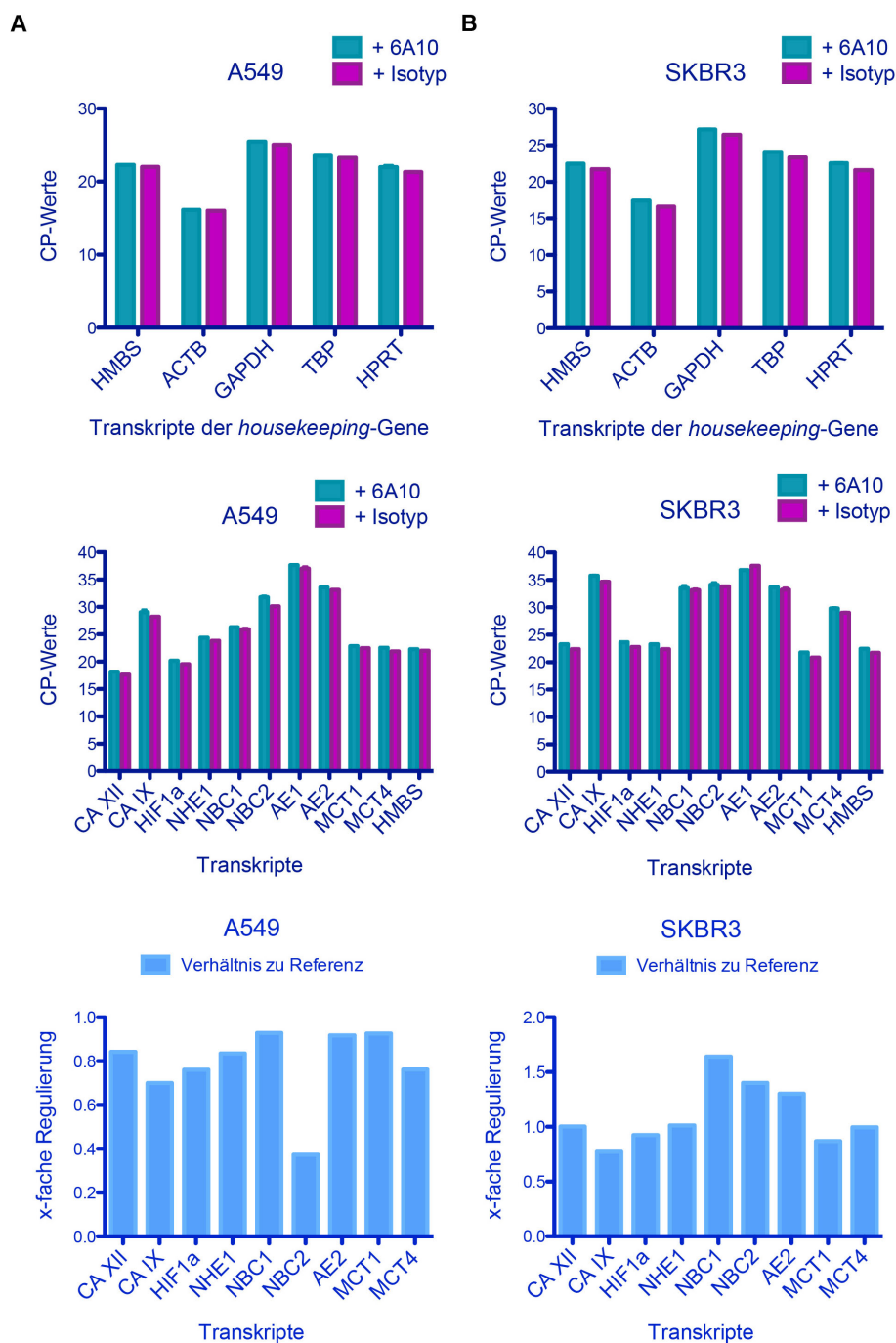


Abb. 3.7 Analyse der für die zelluläre pH-Regulation relevanter Transkripte nach Inkubation von Sphäroiden mit 6A10

Sphäroide aus den beiden CA XII-positiven Zelllinien A549 (**A**) und SKBR3 (**B**) wurden zusammen mit je 25 µg/ml 6A10 bzw. Isotyp über drei Tage unter Normoxie inkubiert. Zur Analyse ausgewählter Transkripte wurde RNA isoliert, in cDNA umgeschrieben und am PCR-Lightcycler gemessen.

Die untersuchten Kandidaten-Gene zur Ermittlung des besten Referenzgens für die A549-Zelllinie (**A**) bzw. SKBR3-Zelllinie (**B**) sind oben, Cp-Werte aller analysierter cDNAs in der Mitte und das Verhältnis der Zielgene zu den Referenzgenen unten abgebildet.

Die per quantitativer Real-Time-PCR untersuchten Transkripte repräsentieren wichtige pH-regulatorische Transportproteine (siehe Abschnitt 1.1.2.3). Die dreitägige Behandlung von Sphäroiden mit 6A10 führte, mit einer Ausnahme, zu keinem nennenswerten

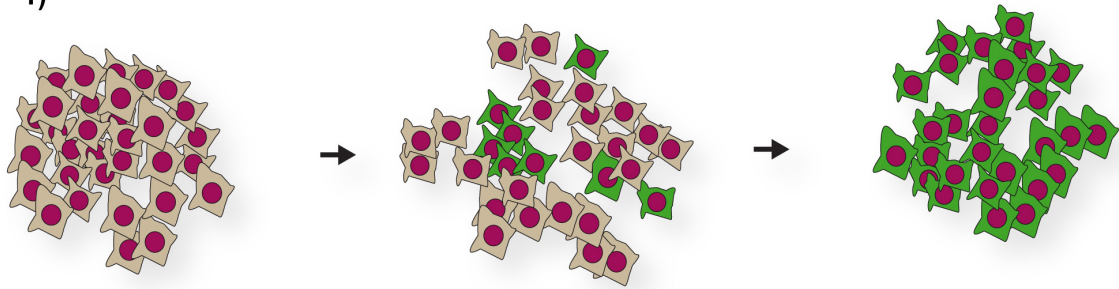
Einfluss der Expression dieser Gene auf Transkriptionsebene. In A549-Sphäroiden wurde der Bicarbonat-/Na⁺-Kotransporter NBC2 mit Cp-Werten von 30,1 bzw. 31,8 in Isotyp-behandelten Sphäroiden reproduzierbar etwa dreimal höher exprimiert als in 6A10-behandelten Sphäroiden. Dies könnte bedeuten, dass CA XII und NBC2 eine funktionelle Einheit bilden, wie dies für CA IX und NBC1 der Fall ist (Svastova 2012).

3.2 Einfluss des 6A10-Antikörpers auf das Tumorwachstum in vivo

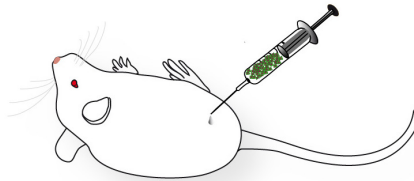
3.2.1 *Etablierung solider Tumoren in NSG-Mäusen*

Um den Einfluss von 6A10 auf das Tumorwachstum in vivo zu untersuchen, etablierte ich ein Xenograft-Tumormodell in NSG-Mäusen (NOD-scid IL2R $\gamma^{-/-}$), die zusätzlich zu fehlenden T- und B-Zellen eine Dysfunktionalität der γ -Kette des IL2-Rezeptors und somit verminderte NK-Aktivität zeigen.

1)

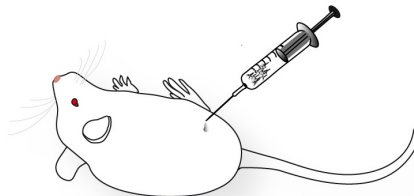


2)



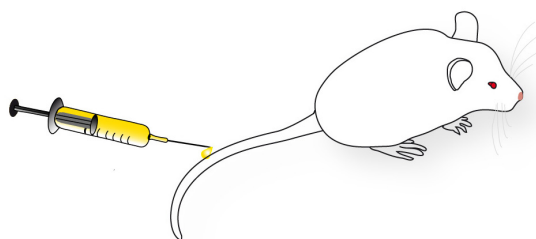
100.000 Tumor-Zellen
werden einmalig
intraperitoneal injiziert

3)



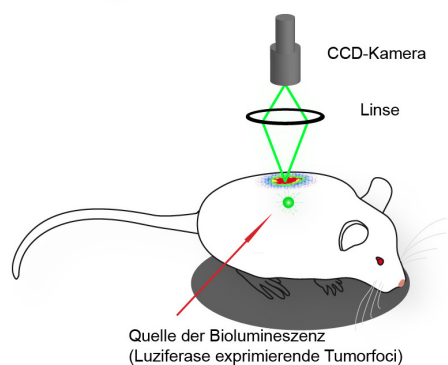
100 µg Antikörper pro Maus
wurden 1x wöchentlich
intraperitoneal injiziert

4)



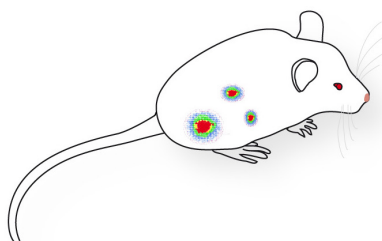
Coelenterazin-Lösung
wurde 1x wöchentlich
unmittelbar vor der
Messung intravenös
injiziert

5)



Lumineszenz-Signale der
Tumorfoci wurden unter
Ausschluss externen Lichts
von einer sensiblen
CCD-Kamera erfasst

6)



Lumineszenz-Signale der
Tumorfoci wurden von der
Software sichtbar gemacht
und konnten quantifiziert
werden

Abb. 4.1 Schematische Darstellung der wichtigsten Arbeitsschritte für die Erhaltung von in vivo-Biolumineszenz-Aufnahmen solider Tumoren in Mäusen

(1) Zunächst wurden für die Tierversuche (TV) ausgewählte Tumorzelllinien mit dem Luziferase-Gen über lentivirale Transduktion ausgestattet. Nach Expansion der Zellen wurden die GFP- und Luziferase-exprimierenden Zellen mithilfe des FACS ARIA III bzw. einer Einzelzellklonierung (erst für den TV5 durchgeführt) zu 100 % angereichert. (2) 1×10^5 Zellen (TV 3, 4 und 5) bzw. verschiedene Zellzahlen in den Vorversuchen wurden jeder Maus am Tag 0 intraperitoneal (i.p.) injiziert. (3) Im Anschluss wurden ihnen der 6A10-bzw. Kontroll-Antikörper je nach Gruppenzugehörigkeit ebenfalls i.p. verabreicht. Diese Antikörper-Gabe wurde 1x wöchentlich zur gleichen Zeit wiederholt. (4) Unmittelbar vor Messung verdünnte Coelenterazin-Lösung wurde durch intravenöse Injektion in eine der beiden lateralen Schwanzvenen appliziert. (5) Das gebildete Licht wurde in einer schwarzen, komplett lichtabgeschirmten Messkammer (symbolisiert durch den schwarzen Kreis) des IVIS 200 Systems (Caliper) unter Isofluran-Anästhesie gemessen. Die Mäuse wurden zu diesem Zwecke ventral unter die Kamera positioniert. Die von der Lumineszenzquelle ausgegangene gestreute Photonenstrahlung traf nach Bündelung durch die Linse auf den darüber liegenden Detektor der CCD-Kamera. Der 15-sekündige Messprozess begann nach erfolgter Injektion und Schließen der Kammer. Eine hochsensitive CCD-Kamera erfasste die gewebedurchdringende Lichtemission, welche ein Nebenprodukt einer enzymatischen Reaktion ($\text{Coelenterazin} + \text{O}_2 \rightarrow \text{Coelenteramid} + \text{CO}_2$) ist, und überlagerte diese mit einer Aufnahme unter normalen Lichtbedingungen. (6) Die Auswertung erfolgte mithilfe der Software Living Image (Caliper), womit diese Signale visualisiert und quantifiziert werden konnten.

Nach der Transduktion von A549- und U87-Zellen mit dem lentiviralen Vektor (Abb. 4.2) konnten, wie beispielhaft für A549 in Abb. 4.5C dargestellt, durch Sortierung am FACS Aria III homogene GFP- und damit auch gLUC-exprimierende Zellpopulationen isoliert werden. Diese homogenen Populationen wurden in den Tierversuchen TV1-4 verwendet. Die in TV5 verwendete A549-Population wird in Abschnitt 3.2.4 näher beschrieben. Wegen der hohen Antikörpermengen von bis zu 37 mg 6A10- bzw. Isotyp-Antikörper pro Versuch, die in gereinigter Form vor jedem Tierversuch produziert werden mussten, wurde die Bindungsspezifität dieser Antikörper vor jedem Tierversuch auf den jeweils verwendeten Zellen getestet. Dazu wurden die jeweiligen Zellen mit seriell verdünntem 6A10 inkubiert und durchflusszytometrisch analysiert. Nur solche Antikörper wurden in den jeweiligen Tierversuchen eingesetzt, die nicht ausgefallen waren und einen guten Sättigungsverlauf zeigten (Abb. 4.5 A,B).

Wurden U87/GFP/gLUC bzw. A549/GFP/gLUC intraperitoneal i.p. in Mäuse injiziert, wuchsen Tumoren an, deren Zellen die Gaussia Luziferase hoch exprimierten. Durch Injektion mit dem Substrat Coelenterazin entstanden Photonen einer bestimmten Wellenlänge, die von einer hochsensitiven CCD-Kamera in der Messkammer detektiert wurden (siehe Abb. 4.1).

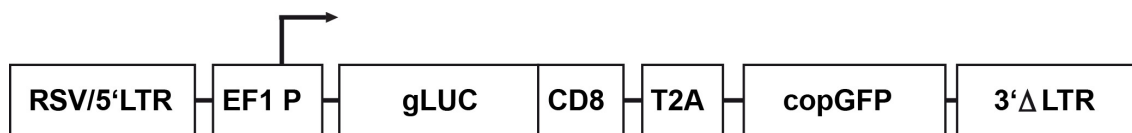


Abb. 4.2 Schema des lentiviralen Konstruktes

RSV/5'LTR: Hybrid des Rous Sarcoma Virus Promotors und der U5 langen terminalen repetitiven Sequenz (LTR) des HI-Virus-1; EF1 P: konstitutiver Elongationsfaktor 1 α -Promotor; gLUC: membran-verankertes Luziferase-Enzym aus *Gaussia*, fusioniert mit der Transmembran-Domäne von humanem CD8; T2A: „selbst-spaltendes“ 2A-Peptid vom Insekten-Virus *Thosea asigna*; copGFP: GFP aus dem Ruderfußkrebs *Pontellina plumata*; 3'ΔLTR: HI-Virus-1 LTR mit selbstinaktivierender U3-Deletion; der Pfeil deutet den Transkriptionsstart an (nach Terzyska et al. 2012).

Mit diesem Biolumineszenz-basierten, bildgebenden Verfahren (*bioluminescence imaging*, BLI) wurde zunächst die minimale Zellzahl ermittelt, die bei jeder behandelten NSG-Maus einen soliden Tumor auslöste. Zu diesem Zwecke wurde je ein Vorversuch mit A549 (Tierversuch1, kurz: TV1) und U87-Zellen (TV2) durchgeführt.

Die Quantifizierung der BLI-Signale demonstrierte streng logarithmisches Wachstum in beiden Versuchen über die gewählten Messzeiträume von 7 (TV1) bzw. 9 (TV2) Wochen (Abb. 4.7). Pro Gruppe und Zell-Dosis wurden hier je vier weibliche Mäuse verwendet, wobei die folgenden Zellzahlen pro Tier injiziert wurden: 1×10^5 , 5×10^5 , 1×10^6 , 5×10^6 oder 1×10^7 .

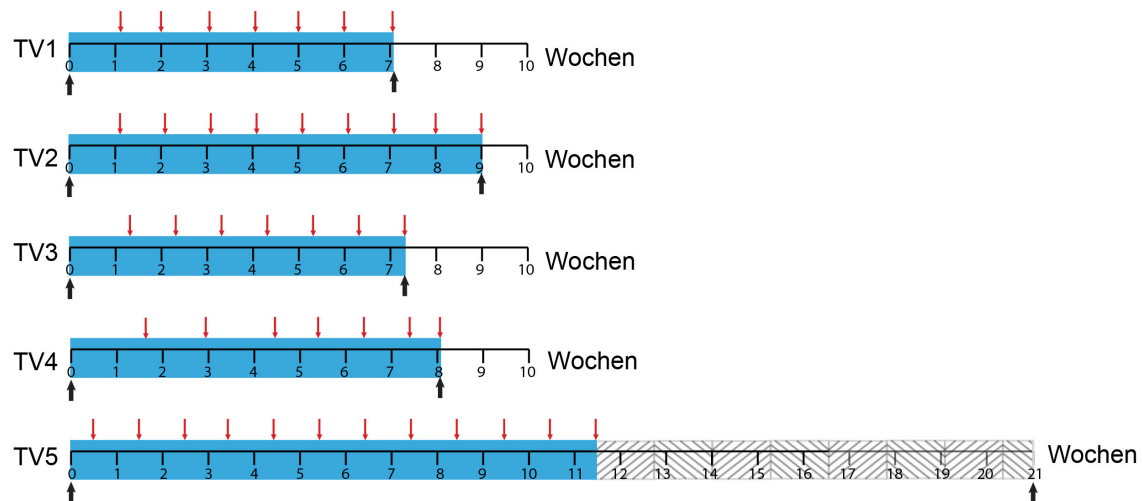


Abbildung 4.3 Übersicht aller Tierversuche

Tierversuche (TV) teilten sich in zwei Vorversuche (TV1 und 2) und 3 Hauptversuche (TV 3, 4 und 5) auf. Die Dauer der Tierversuche wird durch die hellblauen Balken auf der Zeitskala symbolisiert. Sobald die ersten Mäuse die Abbruchkriterien erfüllten, wurden alle Tiere aus dem Versuch genommen. Im TV5 wurden anders als in den vorherigen Versuchen (TV1-4), nur einzelne Tiere gemäß Abbruchkriterien aus dem Versuch genommen, sobald sie diese erreicht hatten, sodass weniger kranke Tiere länger überleben konnten. Der Zeitraum in dem diese sukzessiven Tötungen stattfanden, ist durch den grau gestrichelten Balken symbolisiert. Messzeitpunkte mittels BLI werden durch rote Pfeile markiert, der Anfang und das Ende des jeweiligen Versuchs werden durch schwarze Pfeile gekennzeichnet.

Alle Mäuse entwickelten Tumoren, sodass für alle weiteren Versuche die niedrigste Zellzahl von 1×10^5 festgelegt wurde.

Bei beiden Zelllinien bildete sich zunächst ein Primärtumor an der Injektionsstelle. Im Laufe der Zeit ergaben die regelmäßig durchgeführten Messungen, dass sich die beiden verwendeten Zelllinien bezüglich ihres Wachstums grundlegend unterschieden (Abb. 4.6).

Die injizierten A549-Zellen bildeten zunächst zwar auch einen Primärtumor an der Einstichstelle, doch sehr bald ließen sich auch sekundäre Foci nachweisen. Mit zunehmender Tumorgroße verschmolzen die BLI-Signale miteinander. Sektionen zeigten Tumorknötchen im gesamten Peritoneum, die am Darm und den Ovarien oftmals „perlschnurartig“ angereicht waren. Diese massive Ausbreitung sekundärer Tumoren und Metastasen führte, auch bedingt durch das schnelle Wachstum, zum frühzeitigen Erreichen der Abbruchkriterien (siehe Tab. 3.1).

Tab 3.1 Abbruchkriterien der Tierversuche

Eine Übersicht aller Kriterien, die einen Versuchsabbruch erforderlich machten, ist dargestellt. Jede individuelle Maus wurde gemäß dieser Kriterien beurteilt und bei Erreichen von 3 Punkten durch Tötung aus dem Versuch genommen.

Das Abbruchkriterium ist erfüllt, wenn 3 Punkte erreicht werden. Die Punkte wurden folgendermaßen festgelegt:			
Belastung	Nicht vorhanden	mittel	hoch
Punkte	0	1	2
Gewichtsverlust (%)	Im Bereich der Kontrollgruppe	>10	>15
Futter bzw. Wasseraufnahme	normal	entfällt	beeinträchtigt
Bauchumfang	normal	vergrößert	aufgebläht
Struppiges Fell, fehlende Fellpflege	nein	ja	entfällt
Verhaltensauffälligkeiten*	keine	gering	deutlich
Atembeschwerden	keine	erhöhte Atemfrequenz	Schnaufen
Überschreitung eines BLI-Gesamtwertes von	$3,4 \times 10^6$ Photonen/sec/cm ² /sr	-	6×10^8 Photonen/sec/cm ² /sr
*- Absondern von den anderen Tieren im Käfig, verminderte Reaktion auf Berühren, abnormale Körperhaltung, erniedrigte Spontanaktivität			

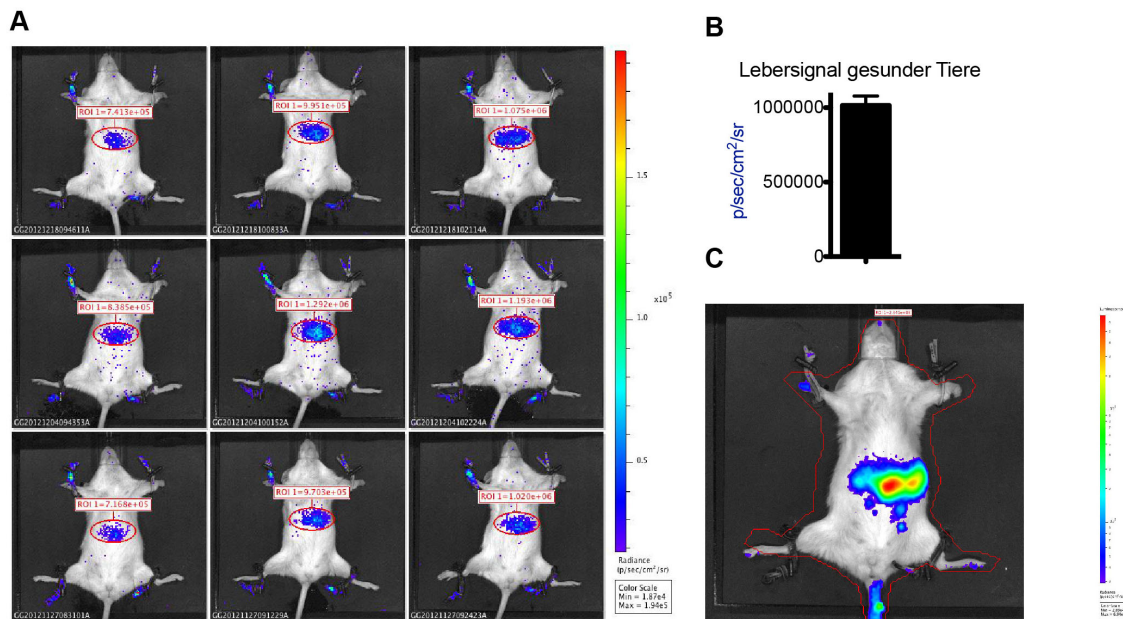


Abb. 4.4 Quantifizierung individueller Behandlungseffekte wird durch Bestimmung der spezifischen Biolumineszenz ermöglicht

(A) Zum Zwecke der Bestimmung des Hintergrundes der BLI wurde für je 3 gesunde Versuchstiere über einen mehrwöchigen Zeitraum an 3 verschiedenen Tagen stichprobenartig eine Messung gemacht. Sowohl bei gesunden als auch tumortragenden Mäusen war immer ein schwaches, in der Leber lokalisiertes Signal zu sehen. (B) Das Leber-Signal ergab quantifiziert den Wert 1×10^6 $\text{p/sec/cm}^2/\text{sr}$. Dieses äußerst geringe Hintergrundsignal addiert sich in allen Auswertungen zu den wesentlich höheren Photonen-Werten (ca. $> 3,5 \times 10^6$ und $\leq 1 \times 10^9$ $\text{p/sec/cm}^2/\text{sr}$) einer tumortragenden Maus. (C) Eine Maus mit einem Lebertumor ist beispielhaft abgebildet, dessen Photonen-Werte gegenüber gesunden Lebern deutlich erhöht war, wie an der Farbskala abzulesen ist. Das Hintergrund-Signal wird somit als vernachlässigbar klein eingestuft, abgesehen davon, dass jede Maus unabhängig von ihrem Krankheitsstatus dieses Signal ausstrahlt und es somit für alle gleich ist.

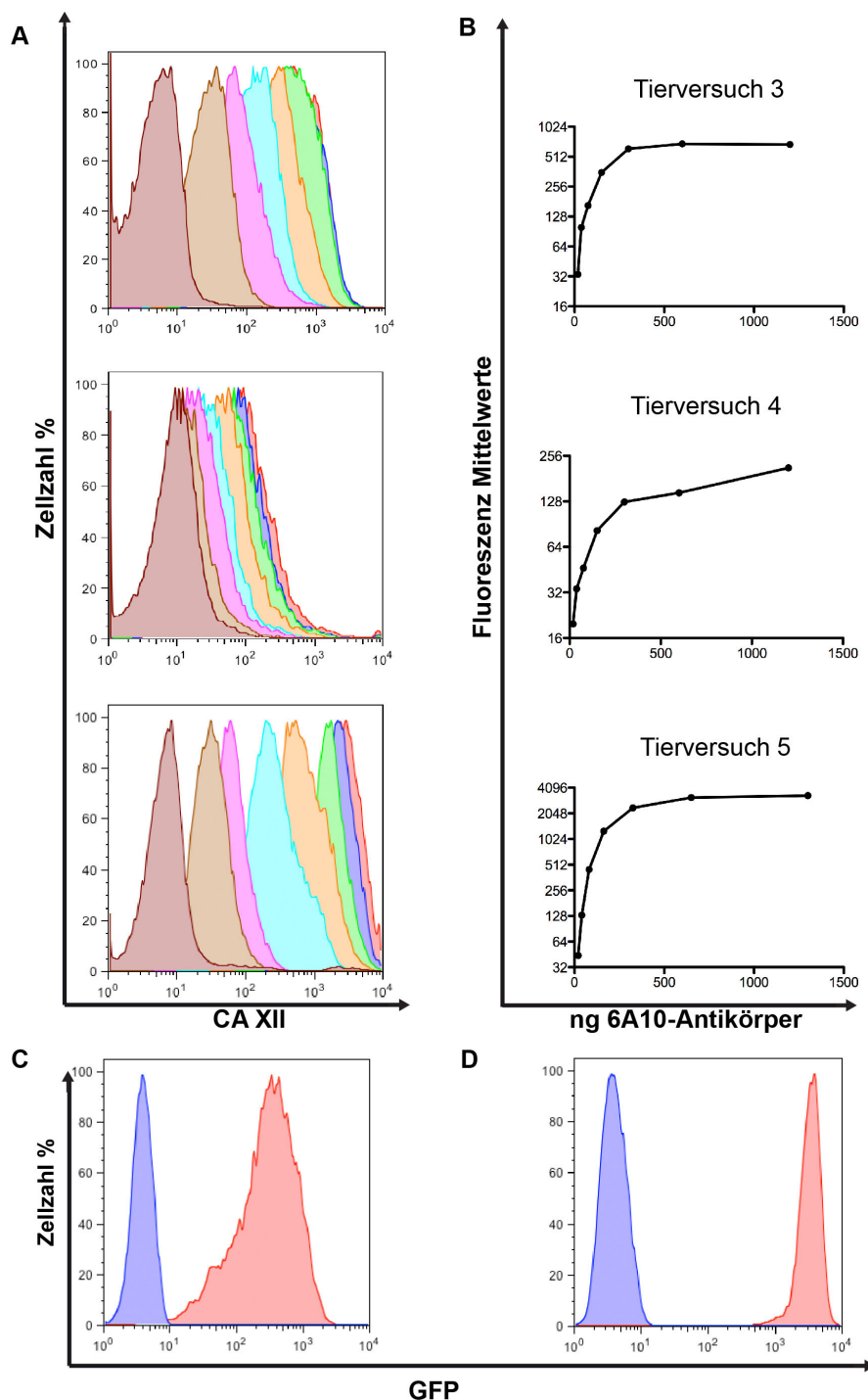


Abb. 4.5 Durchflusszytometrische Analyse von transduzierten A549- und U87-Zellen, die in unterschiedliche Tierversuche eingesetzt wurden

Die durchflusszytometrische Bestimmung der konzentrationsabhängigen Bindungseigenschaften des 6A10-Antikörpers, der in den Tierversuch 3, 4 und 5 verwendet wurde, ist als Histogramm (**A**) oder graphisch (**B**) dargestellt. Dazu wurden eine log₂-Verdünnungsreihe von der höchsten Konzentration des Antikörpers erstellt und die Zellen damit gefärbt. Histogramme bzw. Bindungskurven sind wie folgt dargestellt: A549/GFP/gLUC-Zellen (**oben**), U87/GFP/gLUC-Zellen (**mitte**), A549/GFP/gLUC Klon P5F12 (**unten**). Die Bindungskurven wurden aus den Mittelwerten der Fluoreszenzintensitäten errechnet und zeigen einen guten Sättigungsverlauf, der auf intakte Bindung des 6A10-Antikörpers auf sein Antigen hinweist.

Histogramme aus durchflusszytometrisch ermittelten Daten sind dargestellt. (**C**) Die heterogene GFP-Intensität spiegelt indirekt die Menge an Gaussia Luziferase (gLUC) wider, da die Transkripte dieser Gene auf einer bicistronischen mRNA liegen (siehe Abb.4.2). (**D**) Eine gelungene Einzelzellklonierung resultierte in einer Vielzahl an intensiv GFP-positiven Zellen. Der hier dargestellte Klon P5F12 zeigte die höchste GFP-Expression und damit verbunden auch die höchste Luziferase-Expression. Er wurde später im Tierversuch 5 verwendet.

Mäuse, die eine starke Anschwellung des Abdomens aufwiesen, welches eines der Abbruchkriterien war, bildeten auch deutlich mehr zähflüssigen Ascites als Tiere, die eher durch ihre Gewichtsabnahme auffielen. Anfangs- und Endgewicht unterschieden sich bei den meisten Tieren jedoch kaum. Die krankheitsbedingte Gewichtsabnahme wurde bei den meisten Mäusen durch die Zunahme der Tumormasse und die Anreicherung von Ascites kompensiert. Besonders auffällig waren Splenomegalien, die in allen Mäusen auftraten. Dabei übertrafen die Milzen häufig eine Länge von 20 mm und einen Durchmesser von 5-7 mm, was der doppelten Größe einer für NSG-Mäuse normalen Milz entsprach. Kleinere oberflächliche Tumorfoci waren ebenfalls häufig zu beobachten. Eine weitere Auffälligkeit waren die oft stark vergrößerten und prall geschwollenen Gallenblasen. Auch auf den Nieren fanden sich viele kleine Tumorfoci, während die Lebern weniger Foci, dafür aber häufig Einblutungen aufwiesen. Kleinere Tumorknötchen waren hauptsächlich entlang des Darms und zwischen Magen und Duodenum angesiedelt (Daten nicht gezeigt).

Die U87-Zellen formten dagegen einen großen soliden Primärtumor (in der Regel etwa 1-1,5 cm³), der, wie die Sektionen zeigten, in den meisten Fällen sogar bis zu 30 % seines Volumens als subkutanen Auswuchs aufwies. Auch diese Tiere wiesen in der Regel eine, wenn auch etwas geringer ausgeprägte, Splenomegalie auf. Häufig waren kleine Tumorknötchen entlang der Eierstöcke und des Uterus zu finden. Auffällig war in vielen Mäusen das Wachstum von kleinen Tumorknötchen an der Peritonealwand. Insgesamt zeigten die inneren Organe der Mäuse keine besonderen Auffälligkeiten und machten, trotz sehr großer Primärtumoren, einen wesentlich gesünderen Eindruck, als die Tiere mit A549-Tumoren.

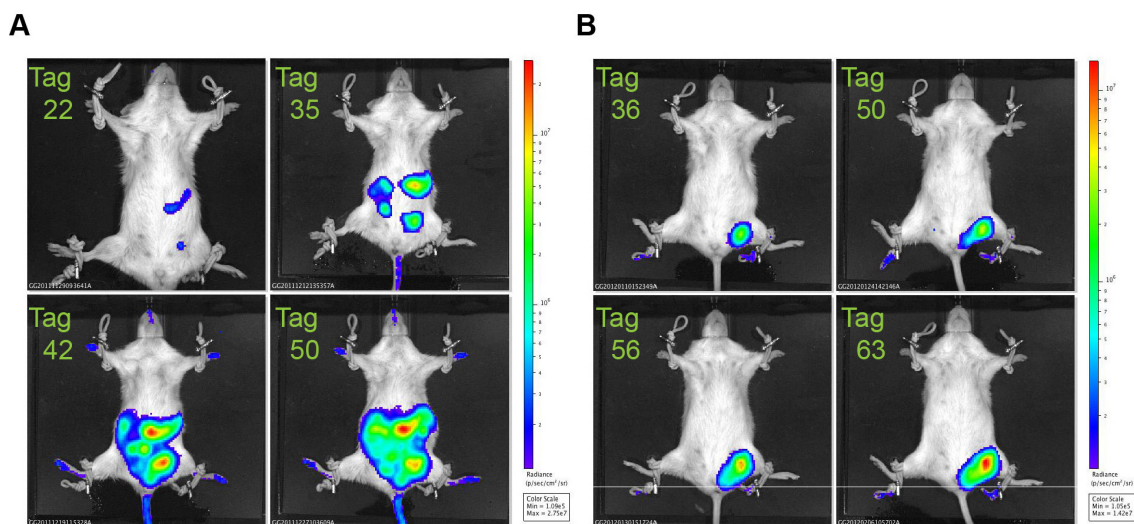


Abbildung 4.6 Mithilfe der Biolumineszenz-basierten Bildgebung konnte in den Vorversuchen im A549-Modell disseminierte und im U87-Modell lokales Tumorstadium unterschieden werden

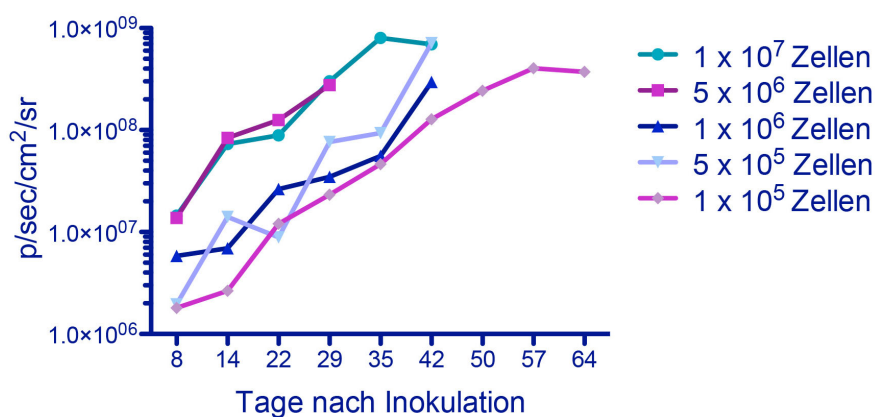
Jeweils eine Maus zu unterschiedlichen Messzeitpunkten wurde abgebildet, um die Verschiedenheit des Tumorstadiums und deren Lokalisation im Peritoneum zu verdeutlichen.

(A) Maus mit A549-Tumorzellen; Lumineszenz gemessen nach 22, 35, 42, 50 Tagen. **(B)** Maus mit U87-Tumorzellen; Lumineszenz gemessen nach 36, 50, 56, 63 Tagen.

Das späte Auftreten der BLI-Signale der Tumorknötchen an der Peritonealwand deuten auf metastatische Ereignisse hin. Ein wichtiges Ergebnis aus diesen Vorversuchen war zudem, dass in beiden Tumor-Modellen die BLI-Signale mit der Position der gefundenen Tumoren post mortem korrelierten.

A

Vorversuch 1: A549



B

Vorversuch 2: U87

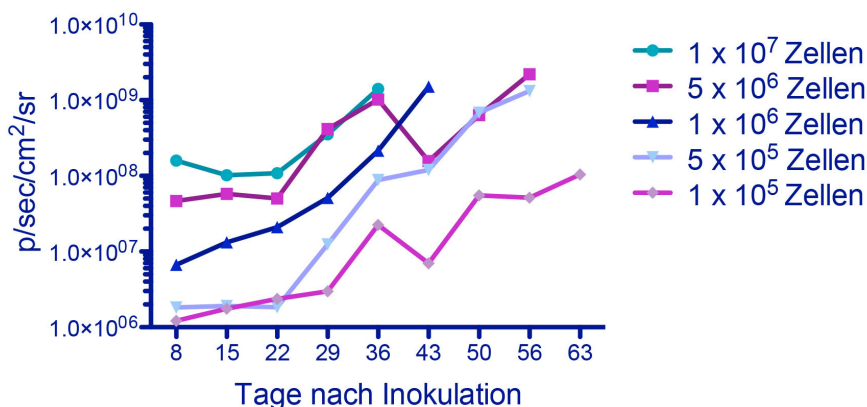


Abb. 4.7 Durch Ermittlung der geringsten Zellzahl von Tumorzellen, die in jeder Maus Tumorstadium auslösen, wurde die Zell-Dosis für die darauffolgenden Tierversuche bestimmt

Die Vorversuche TV1 (A) und TV2 (B) wurden mit A549/GFP/gLUC (A) bzw. U87/GFP/gLUC (B) durchgeführt. Je 4 weibliche Mäuse pro Gruppe wurden mit 5 verschiedenen Tumorzellzahlen der jeweiligen Zelllinien in physiologischer Kochsalzlösung an Tag 0 intraperitoneal injiziert. Quantifizierte Mittelwerte wurden gegen die Zeit (Tage) graphisch aufgetragen. Zu den in den Kurven abgebildeten Zeitpunkten wurde die Tumorlast von jeweils 2 von 4 Mäusen jeder Gruppe wöchentlich alternierend ermittelt. Da zu jedem Messzeitpunkt nur zwei Mäuse verwendet wurden, werden zur besseren Übersichtlichkeit keine Fehlerbalken abgebildet.

In beiden Experimenten benötigten die Mäuse, welche mit der niedrigsten Zellzahl von 1×10^5 Tumorzellen inokuliert worden waren, die längste Zeit um die Abbruchkriterien des Versuches zu erreichen. Die so ermittelte Zell-Dosis von 1×10^5 Tumorzellen wurde in den folgenden Versuchen als einzige Dosis festgelegt, da bei jeder Maus ein Tumor angewachsen war und die Signale der Individuen homogen waren.

3.2.2 Erster Tierversuch mit A549-Zellen zur Dosisfindung zeigt Behandlungserfolg durch regelmäßige Applikation des 6A10-Antikörpers

Wie oben beschrieben, exprimieren A549-Zellen in hohem Maße die Tumor-assoziierte CA XII, während die CA IX nur bei Sauerstoffmangel nachweisbar exprimiert wird (Abb.3.3). Diese Expressionsprofile boten damit eine geeignete Grundlage, um den inhibitorischen Effekt des 6A10 auf die Enzymaktivität und die leichten wachstumsverzögernden Effekte aus den zuvor beschriebenen in vitro-Versuchen, in vivo grundlegend zu studieren. Dabei sollte in einem Therapie-Modell der Effekt einer regelmäßigen Gabe von 6A10 auf das Tumorwachstum untersucht werden. Hierzu wurden NSG-Mäuse vor Versuchsbeginn auf sechs verschiedene Gruppen verteilt, wobei jede Gruppe aus drei männlichen und drei weiblichen Tieren bestand. Jedes Individuum dieser sechs Gruppen erhielt einmal wöchentlich den 6A10- bzw. einen GST-spezifischen Isotyp-Antikörper in der entsprechenden Konzentration intraperitoneal als Bolus injiziert. In Abb. 4.8A sind die Wachstumskurven der Tumoren in den 6A10-behandelten Mäusen denen der Isotyp-behandelten Gruppe gegenübergestellt. Wie der Kurvenverlauf zeigt, war die niedrigste Antikörper-Dosis (10 µg pro Maus und Woche) für einen therapeutischen Effekt nicht ausreichend. Die regelmäßige Behandlung mit der mittleren Dosis 6A10 (100 µg pro Maus und Woche) führte jedoch zu einem verzögerten Tumorwachstum. Die durchschnittliche, quantifizierte Gesamtumorlast wies über den gesamten Messzeitraum deutlich niedrigere BLI-Werte auf. Dies galt für beide Geschlechter gleichermaßen, wenn auch die ersten quantifizierbaren Signale bei den Männchen etwas später auftraten (Abb. 4.8B). Da sich aber die Wachstumskinetiken nicht unterschieden, wurden beide Geschlechter, die jeweils die gleiche Dosis des 6A10 bzw. Isotyp-Antikörpers erhalten hatten, für statistische Auswertungen zusammengefasst. Diese Kurve ist in Abb. 4.8A dargestellt. Sie stellt damit das arithmetische Mittel aus den hier nicht dargestellten, aber in ihren Verläufen identischen Kurven von jeweils 3 Mäusen gleichen Geschlechts, dar. Die Mäuse, die regelmäßig die höchste Dosis von je 500 µg 6A10 bzw. Isotyp erhalten haben, zeigten erstaunlicherweise keine Unterschiede zwischen behandelten und Kontroll-Tieren. Der Grund hierfür ist nicht bekannt.

Um die Verlässlichkeit der BLI-Messungen zu überprüfen, wurden alle Tiere am selben Tag getötet und sezziert. Die Sektionen ergaben bei allen untersuchten Mäusen vergleichbare Befunde bezüglich Tumorlast sowie Anzahl und Verteilung der Tumorfoci. Damit bestätigten sich die Beobachtungen aus dem Vorversuch (TV1). Bereits äußerlich fiel der bessere gesundheitliche Zustand der mit 100 µg 6A10-behandelten Mäuse auf. Ihr Fell war noch glatt und glänzend, ihre Beweglichkeit war unauffällig und die Tiere isolierten sich nicht (Isolation gilt als Zeichen für Schmerzen). Daneben wiesen diese Tiere gegenüber der Isotyp-Kontrollgruppe eindeutig weniger Metastasen auf.

Auch waren die Mengen an Ascitesflüssigkeit deutlich geringer als bei den Tieren der Isotyp-Gruppe. Auch die Milzen der 6A10-behandelten Tiere waren weitaus weniger stark vergrößert. Die Beschaffenheit und Färbung der inneren Organe wirkte wesentlich natürlicher als bei den Kontroll-Tieren und wies eine deutlich geringere Zahl oberflächlicher Tumor-Foci auf.

All diese Ergebnisse zeigten, dass BLI ein spezifisches und sensitives Verfahren zur Verfolgung des Tumorwachstums in vivo darstellt und direkt mit der Tumorgroße und dem tatsächlichen Krankheitsbild der Mäuse korrelierte.

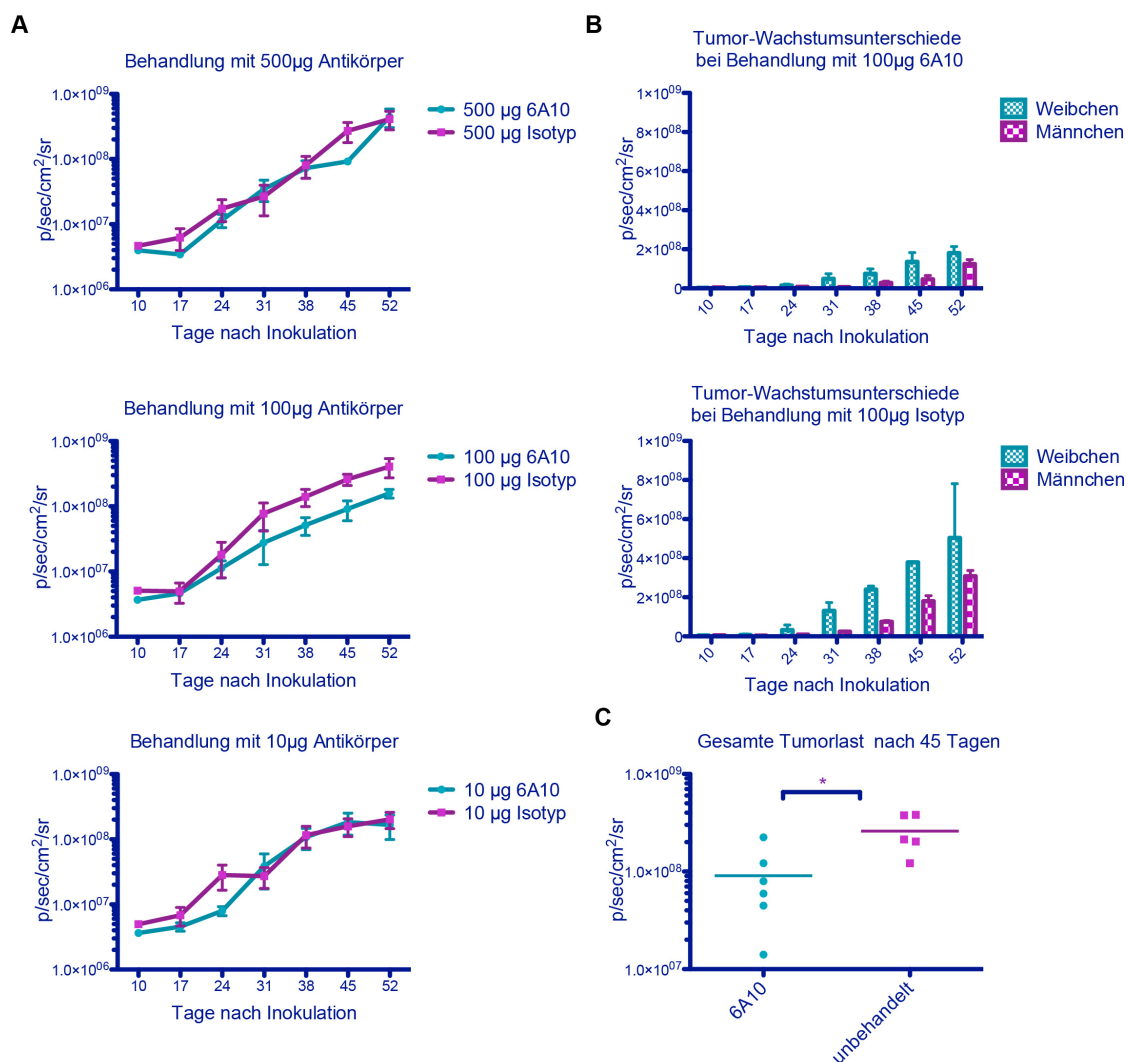


Abbildung 4.8 Nachweis eines therapeutischen Effektes des 6A10-Antikörpers mithilfe der Biolumineszenz Bildgebung im Tierversuch 3

Je 1×10^5 A549 Lungenkarzinomzellen wurden an Tag 0 intraperitoneal injiziert. Pro Gruppe wurden 3 weibliche und 3 männliche Versuchstiere verwendet. Getestet wurden Dosen von 10 µg, 100 µg und 500 µg pro Maus des 6A10-Antikörpers bzw. des Isotyp-Antikörpers. Von Tag 0 bis zum Ende des Experimentes wurden einmal wöchentlich die Antikörper intraperitoneal appliziert. Die Lumineszenz-Messungen wurden ab Tag 10 wöchentlich durchgeführt.

(A) Quantifizierte Mittelwerte wurden gegen die Zeit (Tage) graphisch aufgetragen. (B) Beispielhaft wird der Vergleich des Tumorwachstums in Männchen und Weibchen der 100 µg-Gruppen dargestellt. (C) Statistische Analyse mittels Student's t-test ergab eine statistisch signifikante Tumorwachstumshemmung von bis zu 65% an Tag 45 nach Inokulation bei Verwendung der 100 µg-Dosis Antikörper (p-Wert=0,0165).

3.2.3 Tierversuch mit U87-Zellen zur Dosisfindung zeigte keinen Behandlungserfolg durch regelmäßige Applikation des 6A10-Antikörpers

Patienten mit Glioblastomen haben eine äußerst schlechte klinische Prognose, weshalb neue Therapieoptionen dringend benötigt werden. Da U87-Glioblastomzellen ebenfalls eine hohe CA XII-Expression zeigten, wurde der therapeutische Effekt des 6A10-Antikörpers auch an dieser Zelllinie untersucht. Wie oben für A549-Zellen beschreiben, wurden hierfür U87-Zellen verwendet, die nach lentiviraler Transduktion GFP und ein Luziferase-Reportergen exprimierten. Aufgrund der Ergebnisse des Vorversuchs (TV2) wurde erwartet, dass die Zellen als einzelner Primärtumor wachsen. Diese würden, im Vergleich zum disseminierten Tumorwachstum des A549-Modells, wegen einer kleineren Oberfläche eine geringere Angriffsfläche für den Antikörper bieten. Trotzdem erschien es aufgrund des langsameren Wachstums der U87-Zellen in vivo möglich, zumindest im Anfangsstadium eine Verzögerung des Tumorwachstums zu erreichen.

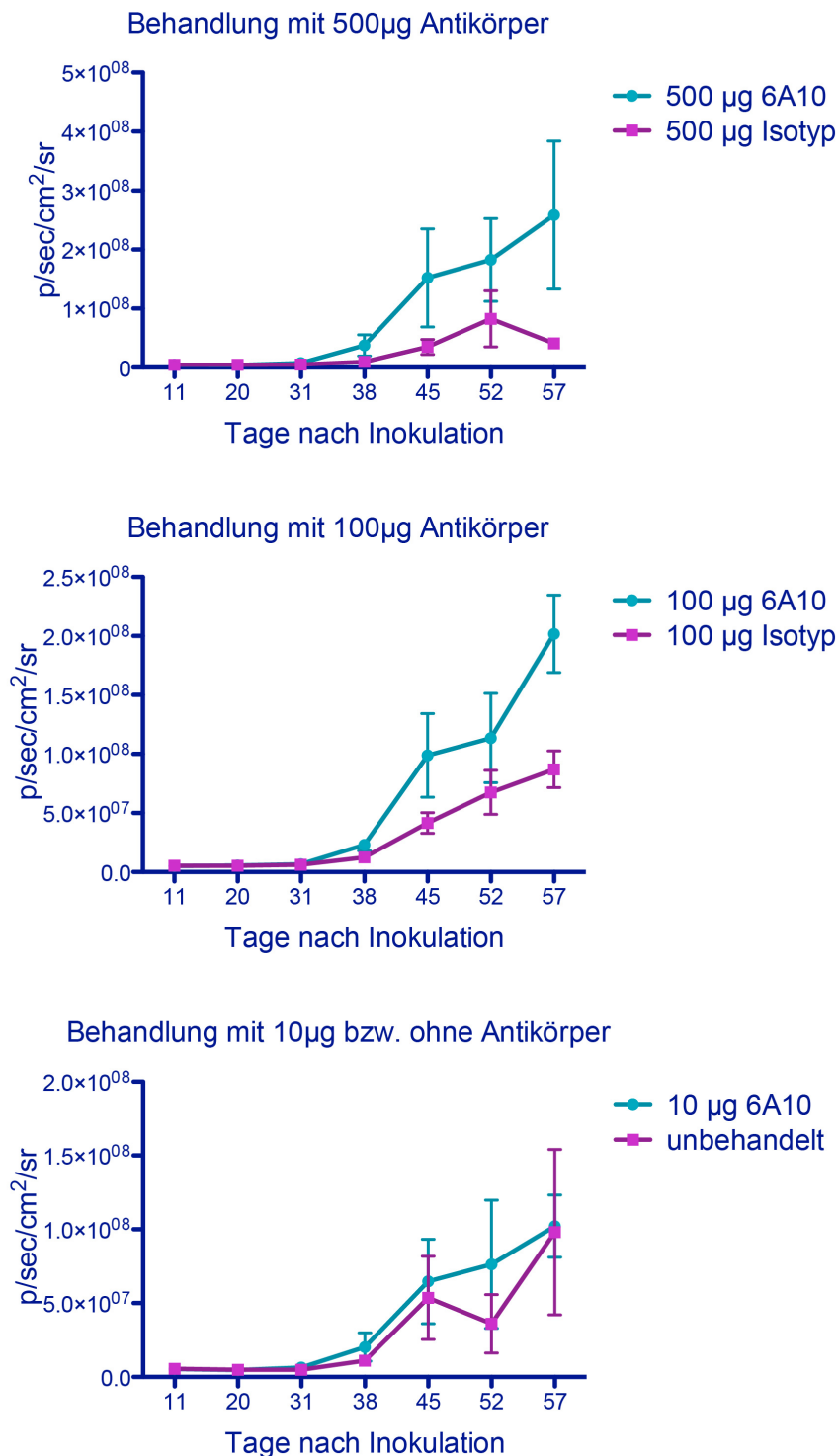


Abbildung 4.9 Die Biolumineszenz Bildgebung im Tierversuch 4 deutet auf eine unerwünschte wachstumsfördernde Wirkung des 6A10 im U87-Modell hin

1×10^5 U87 Glioblastomzellen wurden an Tag 0 intraperitoneal injiziert. Es wurden 6 Versuchstiergruppen mit je 6 weiblichen Mäusen verwendet. Die Tiere erhielten einmal wöchentlich 500 µg, 100 µg oder 10 µg 6A10-Antikörper bzw. 500 µg oder 100 µg des Isotyp-Antikörpers, oder keine weitere Behandlung. Das Tumorstwachstum wurde regelmäßig durch die Luziferasebasierte in vivo-Bildgebung überwacht.

Quantifizierte Mittelwerte wurden gegen die Zeit (Tage) graphisch aufgetragen.

Der Versuchsaufbau war weitgehend identisch zu TV3, allerdings wurden aus Gründen des einheitlicheren Anwachsens der Tumorzellen dieses Mal nur weibliche Tiere ver-

wendet. Da zudem die wiederholten Injektionen von 10 µg Isotyp-Antikörper/Tier/Woche im Vorversuch keinen Einfluss auf das Tumorwachstum hatten, wurde diese Gruppe nicht wiederholt, sondern durch eine gänzlich unbehandelte Kontrollgruppe ersetzt. Damit sollte untersucht werden, ob bereits die wöchentliche Verabreichung eines IgG-Antikörpers (also eines Fremdproteins), trotz starker Immundefizienz der Tiere, einen Einfluss auf das Tumorwachstum hat.

Eine positive Wirkung des 6A10-Antikörpers auf das Tumorwachstum konnte jedoch nicht beobachtet werden. Die Kurven der niedrigsten Dosis sowie der unbehandelten Tiere unterschieden sich nicht. Erstaunlicherweise wiesen die Tiere, die regelmäßig mit 100 µg- oder 500 µg 6A10 behandelt worden waren, sogar ein leicht beschleunigtes Tumorwachstum auf (Abb. 4.9), das innerhalb der einzelnen Gruppen jedoch relativ heterogen war. Auch technische Probleme, wie z.B. Messfehler aufgrund teilweise subkutaner Injektion des Luziferase-Substrats (wie am Tag 57 in einer Isotyp-Gruppe geschehen), konnten insbesondere gegen Versuchsende nicht ausgeschlossen werden (siehe Kapitel 4.2). Da hier die gesamte Kurve der Isotyp-behandelten Mäuse nach unten knickt, ist der Messfehler offensichtlich (Abb. 4.9). Auch Auslöschung durch Interferenz und die eingeschränkte Zugänglichkeit des Substrats in die enormen Tumormassen, waren entscheidende Faktoren, die zu unvorhersehbaren Variationen führten. Schließlich waren auch bei der Sektion der Tiere keine Unterschiede zwischen 6A10- und Isotyp-behandelten Tieren offensichtlich.

3.2.4 Der Einsatz von A549-Zellen aus einer Einzelzellklonierung führt zu besonders starker 6A10-bedingter Wachstumsverzögerung

Aus der Einzelzellklonierung von A549-Zellen (Abb.4.5) gingen mehrere Klone hervor, die sich durch eine starke, einheitliche GFP-Expression auszeichneten. Da GFP- und die Luziferase von einer bicistronischen mRNA codiert werden, konnte auch von einer starken Luziferase-Expression ausgegangen werden. Für den folgenden Tierversuch wurde der A549-Einzelzellklon P5F12 ausgewählt (Abb. 4.5), der in der Zellkultur langsamer wuchs als die A549-Ausgangspopulation und daher vermutlich auch in vivo ein langsames Wachstum zeigen sollte. Wie in den vorherigen Versuchen wurden auch bei diesem Tierversuch, der die Ergebnisse des TV3 bestätigen sollte, 1×10^5 Zellen pro Maus i.p. injiziert. In diesem Versuch wurde die Anzahl der Versuchstiere auf 8 pro Gruppe erhöht, um eine bessere statistische Aussage über die Ergebnisse treffen zu können und den Einfluss potenzieller „Ausreißer“ auf die Durchschnittswerte der quantifizierten BLI-Signale innerhalb der Gruppen zu minimieren.

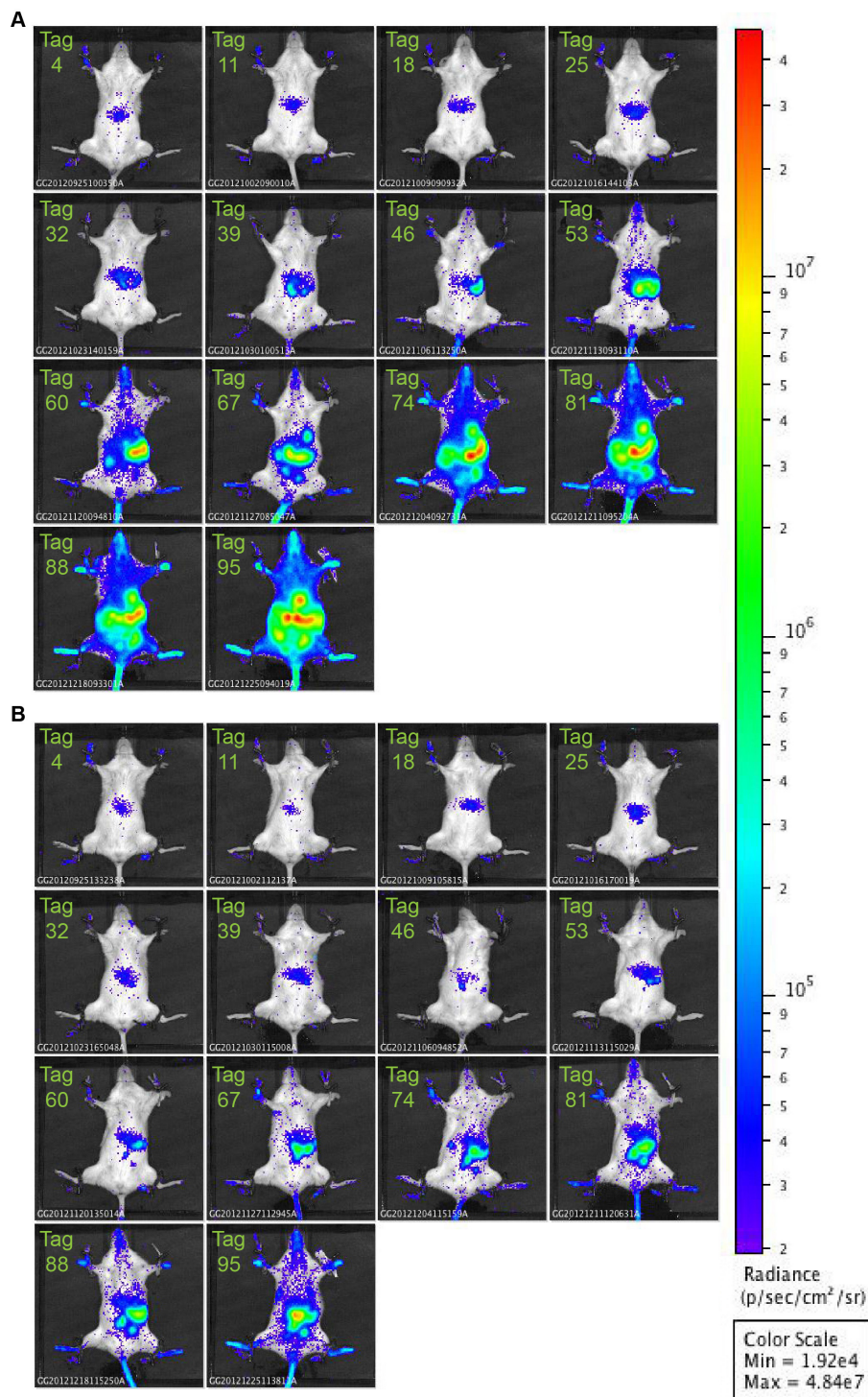


Abb. 4.10 Durch die Lumineszenz-Bildgebung konnte der Behandlungserfolg im Tierversuch 5 anhand der Tumormasse der Versuchstiere über einen mehrwöchigen Zeitraum regelmäßig beobachtet und verlässlich bestimmt werden

1×10^5 A549 Lungenkarzinomzellen des Klon P5F12 wurden an Tag 0 intraperitoneal injiziert. Die Tiere erhielten einmal wöchentlich 100 μ g 6A10-Antikörper bzw. keine weitere Behandlung. Beispielfhaft ist je eine repräsentative Maus aus der mit 6A10-Antikörper unbehandelten Gruppe (A) und eine aus der mit 6A10-Antikörper behandelten Gruppe (B) des 5. Tierversuches dargestellt. Die Aufnahmen wurden ab Tag 4 nach Tumorzellinjektion bis Tag 95 wöchentlich angefertigt. Das verzögerte Tumorentstehen der mit 6A10 behandelten Maus ist deutlich zu erkennen. Bei der oben abgebildeten Maus (A) ist ein spezifisches Signal für Tumorentstehen ab Tag 25 erkennbar, wohingegen bei der unten abgebildeten Maus (B) erst ab Tag 39 ein spezifisches Signal messbar war. Davor wurden von der CCD-Kamera nur die typischen Lebersignale erfasst. Diese dienten als interne Kontrolle für die adäquate Injektion der Coelenterazin-Lösung.

Die wöchentliche Injektion von 100 µg 6A10 bzw. Isotyp-Antikörper pro Tier wurde beibehalten. Zusätzlich wurde eine Gruppe aus acht unbehandelten Tieren gebildet, um zu beobachten, ob durch die wöchentliche Verletzung des Peritoneums Tumorzellen leichter in die Blutbahn geraten und dadurch einen veränderten Wachstumsverlauf und ein verändertes Disseminationsverhalten verursachen. Hierfür fanden sich aber im Laufe des Versuchs keine Hinweise.

Die Tumor-Wachstumskurven in TV5 zeigten eine deutlich stärkere Wachstumsinhibition durch 6A10. Dabei waren die Verläufe, wie in Abbildung 4.11 zu erkennen, innerhalb der Gruppen einheitlicher als in allen vorherigen Versuchen. Abbildung 4.10 zeigt den fortschreitenden Verlauf der Tumor-Erkrankung anhand je einer repräsentativen Maus aus der 6A10-Gruppe und der unbehandelten Kontrollgruppe. So traten in der 6A10-Gruppe die ersten detektierbaren BLI-Signale, die über das Hintergrund-Niveau hinausgingen, deutlich später auf (Abb. 4.10 und 4.11A). Aus dem Kurvenverlauf ist außerdem ersichtlich, dass sich die unbehandelte Gruppe nicht wesentlich von der Isotyp-behandelten Gruppe unterschied. Damit konnte ausgeschlossen werden, dass die wiederholten Antikörper-Injektionen einen Einfluss auf den Krankheitsverlauf hatten. Zukünftige Experimente würden demnach mit weniger Versuchstieren durchgeführt werden können.

Die BLI-Messungen wurden über Tag 81 hinaus nicht mehr regelmäßig durchgeführt und quantifiziert. Sie dienten nur noch als zusätzliches Abbruchkriterium, da viele Mäuse gesättigte BLI-Werte erreichten und, wie sich am Ende aller Tierversuche zeigte, die BLI-Signale und die tatsächliche Tumormasse bei großen Tumoren nicht mehr gut korrelierten.

Die starke Verzögerung des Tumorwachstums durch Behandlung mit 6A10 war statistisch hochsignifikant und betrug am letzten korrekt durchgeführten Messtag (Tag 81) 84% gegenüber der Kontrollgruppe (Abb. 4.11B,D). Offenbar war das langsamere Wachstum der hier eingesetzten, einzelzellklonierten A549-Zellen ein Grund dafür, dass der Antikörper 6A10 sein inhibitorisches Potential besonders gut entfalten konnte. Da die Korrelation zwischen BLI und *post mortem*-Analyse im A549-Modell (TV1 und TV3) als sehr gut befunden wurde, entschieden wir uns, in diesem Versuch auch die Überlebenszeit der Versuchstiere zu bestimmen. Die Tiere wurden also bei Erreichen der Abbruchkriterien getötet und daraus eine Kaplan-Meier-Kurve erstellt (Abb. 4.11C). Die statistische Auswertung mit dem Mantel-Cox-Test ergab einen signifikanten lebensverlängernden Effekt der 6A10-Therapie gegenüber der Isotyp-Behandlung ($p=0,0208$) und den unbehandelten Tieren ($p=0,0376$).

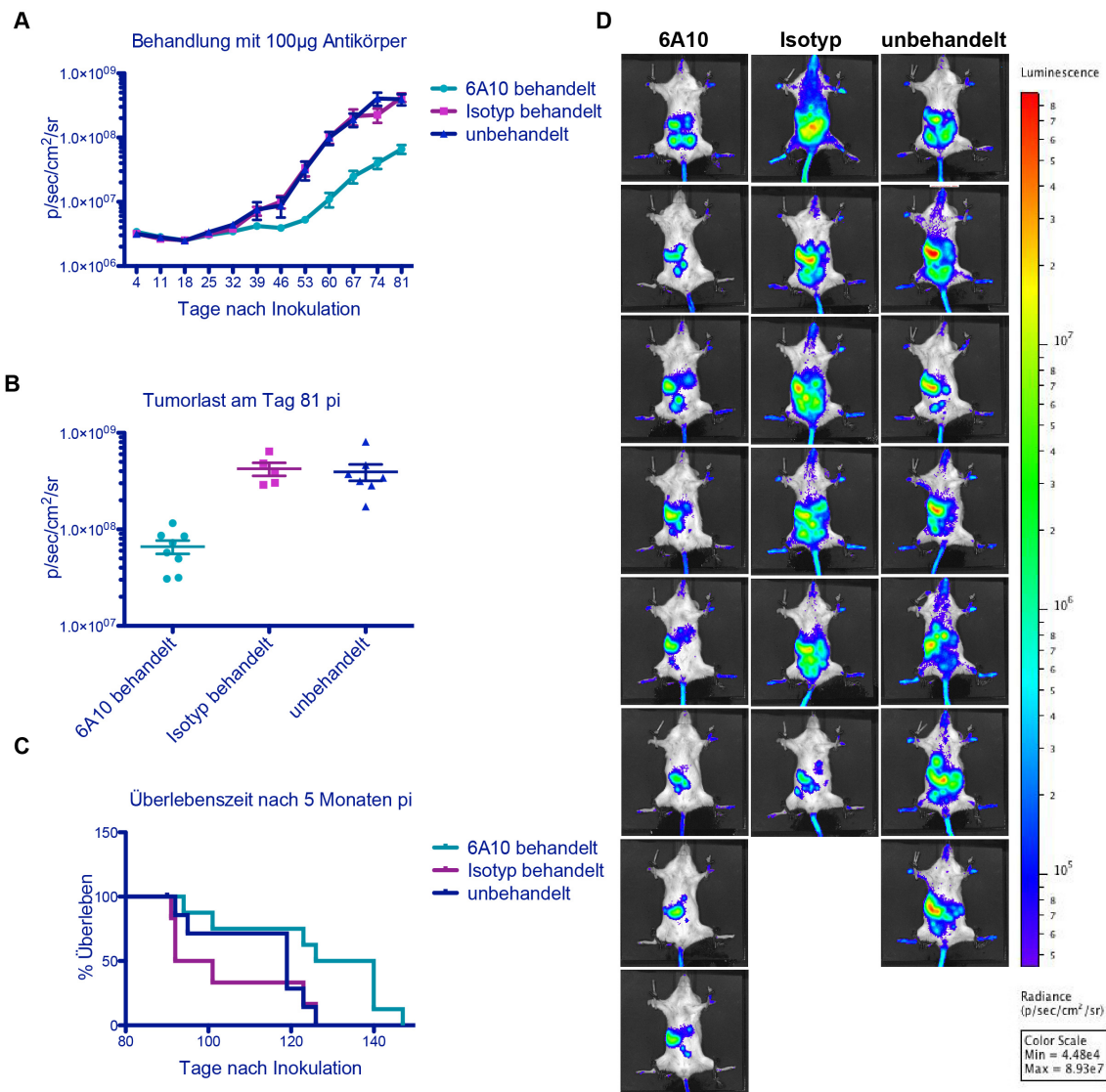


Abbildung 4.11 Inhibition des Tumorwachstums von A549-Zellen des Klon P5F12 durch 6A10 in vivo

Je 1×10^5 A549 Lungenkarzinomzellen (Klon P5F12) wurden an Tag 0 intraperitoneal injiziert. Pro Gruppe wurden 8 weibliche Versuchstiere verwendet. Die bereits in TV3 bewährte Dosis von 100 µg des 6A10-Antikörpers bzw. des Isotyp-Antikörpers pro Maus wurden auch in diesem Versuch verwendet.

Von Tag 0 bis zum Ende des Experimentes wurde einmal wöchentlich intraperitoneal appliziert. Die Lumineszenz-Messungen wurden ab Tag 4 wöchentlich durchgeführt.

(A) Quantifizierte Mittelwerte wurden gegen die Zeit (Tage) graphisch aufgetragen. (B) Statistische Analyse mittels Student's t-test ergab eine Tumorwachstumshemmung von bis zu 84% am 81. Tag nach Inokulation (p -Wert $< 0,0001$). (C) Die Überlebenszeit der Versuchstiere wurde nach Ende der BL-Messperiode erfasst und als Kaplan-Meier-Kurve dargestellt. Die 6A10-Gruppe wies verglichen mit der Isotyp-Gruppe eine signifikant längere Überlebenszeit auf ($p=0,0208$). (D) Aufnahmen aller Versuchstiere am letzten BLI-Messtag sind, nach Behandlungsgruppen geordnet, einander gegenübergestellt. Drei Mäuse wurden aus der Analyse ausgeschlossen, da sie keinen Tumor entwickelt hatten. Die Skala ist für alle Messungen identisch und logarithmiert.

Da die Versuchstiere aus dem Versuch genommen wurden, sobald sie in einem weit fortgeschrittenem Krankheitsstadium waren und Symptome der Abbruchkriterien zeigten, war bei den Sektionen kein auffälliger makroskopischer Unterschied zwischen den Mäusen aus verschiedenen Gruppen zu beobachten. Auffällig war aber, dass der Tro-

pismus des injizierten A549-Einzelzellklons in allen untersuchten Mäuse anders war als nach Injektion der parentalen Tumorzell-Population, die in den Tierversuchen (TV) 1 und 3 verwendet wurden. Während in TV1 und TV3 die Primärtumoren bevorzugt an der Einstichstelle anwuchsen und nur als kleine Tumorfoci auf den Lebern detektierbar waren, wuchsen die Primärtumoren aus A549-Klon P5F12 in der Leber an. Große Tumoren (bis zu 14 mm x 8 mm) durchwucherten ganze Leberlappen und wurden in fast allen untersuchten Fällen an der Leberpforte (porta hepatis) gefunden, an der sich die einzelnen Leberlappen (Lobuli) verzweigen. Auch hatten alle Mäuse deutliche Splenomegalien (Größe der Milzen etwa 20 mm x 7-8 mm) und häufig große Mengen Ascites, der gelegentlich auch blutig war. Kleine Tumoren traten auch auf den Nieren und am Diaphragma häufiger auf.

3.2.5 Die Kolokalisation der Signale zweier verschiedener optischer Bildgebungsverfahren verifiziert die Bindung des 6A10 an Tumorgewebe

Um eine weitere Bestätigung zu erbringen, dass der in TV3 und TV5 beobachtete wachstumsverzögernde Effekt von der Bindung des 6A10 an die zugänglichen Tumorzellen resultiert, wurde der 6A10-Antikörper an den Infrarotfarbstoff 800CW gekoppelt und zur direkten Detektion der Tumoren 95 Tage nach Inokulation dreier Tumortragender Mäuse (561, 538 und 579) und einer gesunden Maus als Kontrolle (586) in vivo eingesetzt (Abb.4.12).

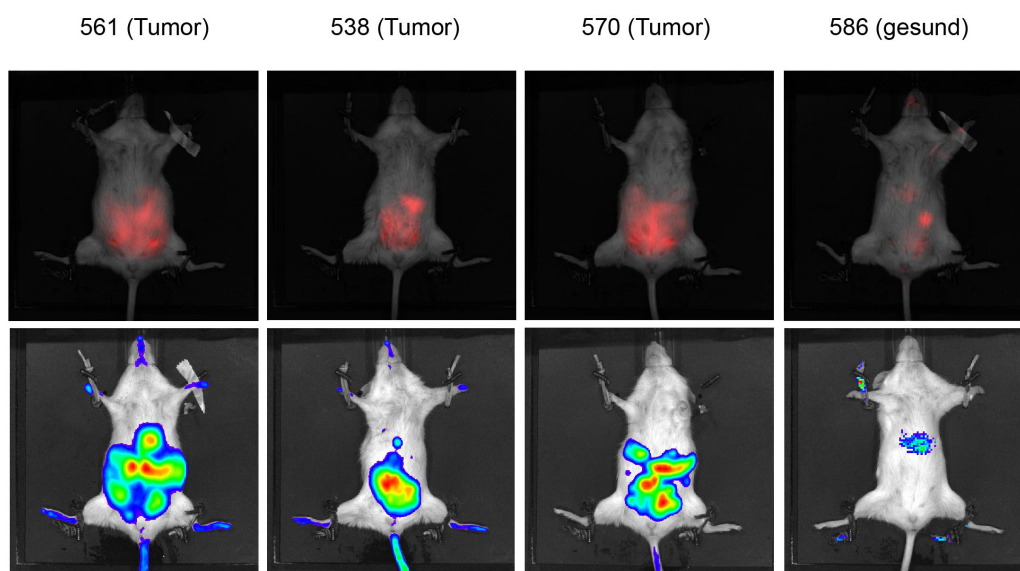


Abb. 4.12 Fluoreszenz-Emission des in vivo applizierten 6A10-Infrarot-Farbstoff-Konjugates korrelierte mit von Tumoren emmitierten Bio-Lumineszenz-Signalen in vivo

Vier Mäuse aus TV5 wurden zunächst mit dem Infrarotfarbstoff 800CW gekoppelten 6A10-Antikörper injiziert und nach 24h (Mäuse 561, 570 und 586) bzw. 48 h (Maus 538) am IVIS 200 System (Caliper) unter Isofluran-Anästhesie gemessen. Im Anschluß wurde nach Injektion von Coelenterazin die BL-Emission gemessen.

In der oberen Reihe sind Fluoreszenz-basierte Aufnahmen, in der unteren Reihe Biolumineszenz-basierte Aufnahmen dreier Tumor-tragender Mäuse und einer gesunden Maus abgebildet. Trotz erwartungsgemäß geringerer Sensitivität der Fluoreszenzmessung bestand eine sehr gute Korrelation zwischen Tumormasse, Lumineszenz und spezifischer Bindung des Infrarotfarbstoff-gekoppelten Antikörpers 6A10 an Tumoren und Metastasen.

Hierfür wurden 50 µg 6A10-800CW intraperitoneal injiziert und die spezifischen Fluoreszenz-Signale 24 Stunden später gemessen. Abbildung 4.12 zeigt, dass sich die 6A10-Signale weitgehend mit den Biolumineszenz-Signalen deckten.

Diesen Messungen gingen Versuche voran, die dazu dienten, den idealen Messzeitpunkt zu definieren. Kürzere Zeiten zwischen Antikörperinjektion und Messung führten zu hohem Hintergrund, eine längere Inkubationszeit bis zu 48 h verbesserte die Spezifität oder Auflösung nicht mehr. Beispielhaft ist das Fluoreszenz-Signal der Maus 538 in Abbildung 4.12 zu sehen, das nach 48 h Stunden Inkubation mit 6A10-800CW gemessen wurde. Auch sie zeigte spezifisch die Position der Tumoren an, jedoch ist das 48h-Signal schwächer als das 24h-Signal. Das typische Signal im Magen tritt damit deutlicher hervor. Dieses ist auf die im langwelligen Bereich anregbaren, aromatischen Ringsysteme pflanzlicher chlorophyllhaltiger Futtermittel zurückzuführen. Im Vergleich dazu ist das typische Hintergrundsignal der BLI-Bildgebung in der Leber zu finden, wo das Substrat vermutlich abgebaut wird (Abb. 4.12 und Abb. 4.4).

3.2.6 Mithilfe von ex-vivo-Analysen konnten makroskopisch unauffällige Organe hochauflösend auf Metastasen untersucht werden

Die ex vivo-Analyse von Organen mit beiden optischen Bildgebungsverfahren kann zur Identifikation von Tumorfoci verwendet werden und kann z.B. dazu benutzt werden, um geeignete Organe (also z.B. solche mit okkulten Tumorfoci) für immunhistologische Untersuchungen kleiner Metastasen zu identifizieren.

Um zu klären, welches optische Bildgebungsverfahren sich besser für die Visualisierung von Tumorfoci und Metastasen ex vivo eignet, wurden die Organe je einer Maus mit weit fortgeschrittenen Tumoren unmittelbar nach ihrer Tötung mit den verschiedenen bildgebenden Verfahren untersucht, wie in Abb. 4.13 gezeigt.

Eine weitere Möglichkeit zur ex-vivo-Analyse, mit sogar noch höherer Auflösung, basiert auf der Tatsache, dass jede in den hier beschriebenen Tierversuchen verwendete Tumorzelle neben der Luziferase auch funktionelles GFP exprimiert. So konnten kleine Organe und Gewebe direkt unter dem Fluoreszenz-Mikroskop auf GFP-abhängige Licht-Emission untersucht werden.

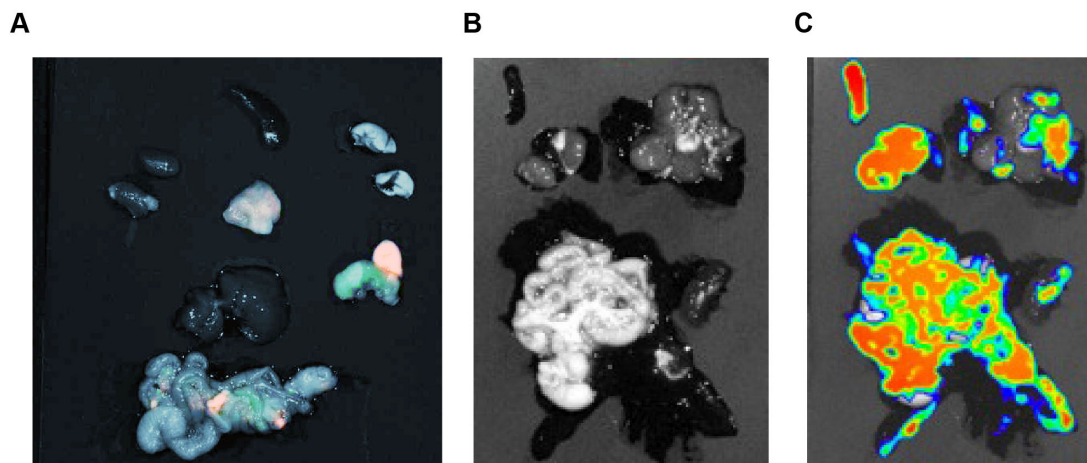


Abb. 4.13 Durch Fluoreszenz-basierte Bildgebung konnte die genaue Lage von Tumorfoci im Vergleich zu Biolumineszenz-basierter Bildgebung verlässlicher angezeigt werden

Organe von zwei Mäusen wurden am Tag 95 nach Inokulation der A549/GFP/gLUC Tumorzellen des Klonen P5F12 präpariert und mit optischen Bildgebungsverfahren ex vivo analysiert. **(A)** 48 h vor Tötung und Sektion wurden dem Versuchstier 50 µg 6A10-800CW i.p. verabreicht. Zwei Tage später wurde dessen im Peritoneum liegenden Organe (Nieren, Milz, Leber, Magen, Darm und zusätzlich der Primärtumor) entfernt und ex vivo auf ihre 6A10-bedingte Fluoreszenz hin untersucht. Als Negativkontrolle wurden die beiden Lungenflügel (rechts oben) präpariert, da in keinem Tierversuch bisher ein Tumorbefall in der Pleura-Höhle beobachtet worden war. Nach spektraler Kompensation konnten spezifische Fluoreszenz-Signale (rot) und noch verbliebene Autofluoreszenz (grün) beobachtet werden. Einzelne rotgefärbte Foci entsprachen kleinen Tumorknötchen bzw. dem Primärtumor. **(B)** und **(C)** zeigen eine Durchlicht-Aufnahme und die Biolumineszenz-Messung einer anderen Maus (ex-vivo), der zuvor eine Coelenterazin-Lösung i.v. gespritzt worden war, gefolgt von schneller Tötung durch zervikale Dislokation und Präparation der Organe für die Messung.

Dabei ließen sich sowohl oberflächliche, epitheliale Tumorfoci als auch Mikrometastasen in tiefer gelegenen Gewebeschichten überraschend gut visualisieren (Abb. 4.14). So war es im TV5 möglich, Tumor-Infiltrationen in vergrößerten Milzen zu entdecken und sogar in Lungengewebe nachzuweisen, obwohl diese in keinem der Versuche makroskopische Befunde zeigten. Auch bei den Milzen ließen sich so Tumordinfiltrationen von oberflächlich anhaftendem Fettgewebe unterscheiden. Damit hat sich die Fluoreszenz-basierte, mikroskopische Untersuchung für unsere Fragestellungen als ein wertvolles ergänzendes Verfahren zur Identifizierung einer Tumordinfiltration makroskopisch unauffälliger Organe erwiesen. Sie war besonders dafür geeignet, um eine Vorauswahl relevanter Gewebe für die immunhistologische Untersuchung zu treffen, welche zum Zeitpunkt der Fertigstellung der Arbeit noch nicht abgeschlossen werden konnte. Dem gegenüber erwies sich die in vivo-GFP-Messung als nicht geeignet, weil auch gesunde, nicht GFP-exprimierende Gewebe eine hohe Autofluoreszenz in diesem Wellenlängenbereich aufwiesen.

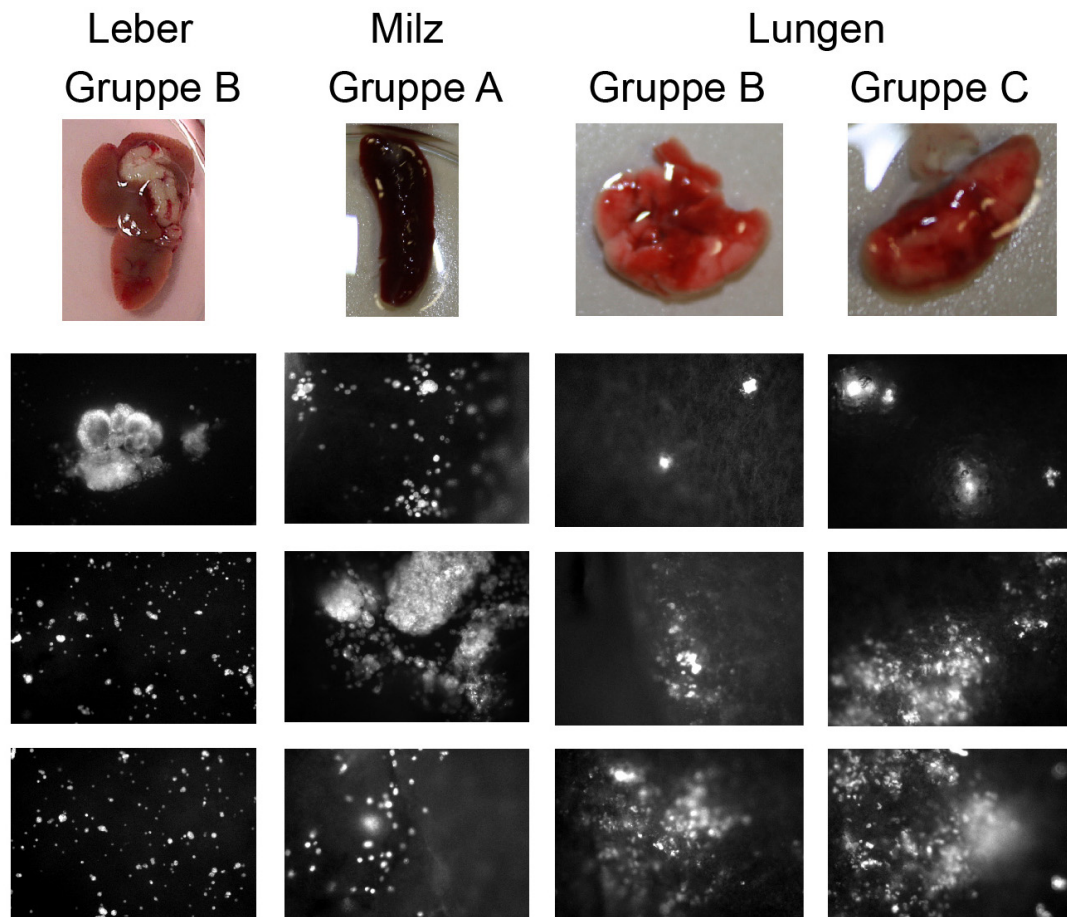


Abb. 4.14 Visualisierung der Tumor-Infiltration in verschiedenen makroskopisch unauffälligen Organen

In jeder Spalte ist ein Organ zu sehen und darunter jeweils drei repräsentative Bilder bei 10-facher Vergrößerung unter dem Fluoreszenzmikroskop im GFP-Kanal. Die Organe wurden vier verschiedenen kranken Mäusen, welche die Abbruchkriterien erreicht hatten, aus verschiedenen Behandlungsgruppen des TV5 am selben Tag entnommen und auf Infiltration durch GFP-positive Tumorzellen hin untersucht (Organe von links nach rechts: Leber, Milz, Lungen). Nur die oben abgebildete Leber zeigte einen makroskopisch deutlich erkennbaren Tumor und diente als Positiv-Kontrolle. Gruppe A, 6A10-behandelt; Gruppe B, Isotyp-behandelt; Gruppe C, unbehandelt.

3.3 Gewinnung und Charakterisierung Tumor-gerichteter monoklonaler Antikörper

Vorarbeiten in unserem Labor hatten gezeigt, dass sich Exosomen-haltige Mikrovesikel, die aus Tumor-Zelllinien gewonnen wurden, zur Immunisierung von Mäusen und Ratten zur Generierung Tumor-reaktiver monoklonaler Antikörper hervorragend eignen. Diese Mikrovesikel werden in dieser Arbeit aufgrund ihres Ursprungs und der Expression exosomaler Marker-Proteine (z.B. TSG101 und CD63), als Onkosomen bezeichnet. Aus einer solchen Immunisierung mit Onkosomen der Lungenkarzinom-Zelllinie A549 war auch der Carboanhydrase XII-spezifische monoklonale Antikörper 6A10 hervorgegangen, dessen Charakterisierung im Abschnitt 1 beschrieben wurde.

Analog zu dieser erfolgreichen Immunisierung wurden in darauf folgenden Immunisierungen Onkosomen weiterer Tumor-Zelllinien verwendet. Diese Zelllinien und näher charakterisierte Antikörper sind in Tabelle 3.2 aufgelistet. Durchflusszytometrische Daten zu weiteren Antikörpern, die noch zu keiner massenspektrometrischen Identifizierung ihrer Spezifität geführt haben, weil Immunpräzipitierungen zum jetzigen Zeitpunkt keine eindeutigen Ergebnisse geliefert haben, sind in Abb. 5.8. aufgelistet.

3.3.1 Screening und Auswahl geeigneter Hybridome mithilfe der reversen Immunisierungs-Methode

Die Immunisierung erfolgte für alle Onkosomen-Präparate auf die gleiche Weise. Je 10 µg Onkosomen wurden einer Ratte intraperitoneal (i.p.) injiziert. Nach erfolgter Grund- und Booster-Immunisierung wurden Hybridome generiert, die monoklonale Antikörper produzierten. Von diesen wurden mittels ELISA diejenigen ausgewählt, welche Antikörper vom IgG-Isotyp sezernierten. Anhand einer ersten durchflusszytometrischen Analyse wurden davon solche Antikörper ausgeschlossen, die humane PBMCs erkannten. Alle anderen selektierten Hybridome wurden für weitere Analysen aufbewahrt.

3.3.1.1 Identifizierung und Bestätigung Tumor-reaktiver Antikörper

Aufgrund des hier beschriebenen Immunisierungsverfahrens sind die Spezifitäten der generierten Antikörper zunächst unbekannt und müssen einzeln ermittelt werden. Um herauszufinden, welches Antigen die jeweiligen Antikörper erkennen, wurden sie an Sepharose G-beads gekoppelt, womit die gebundenen Proteine präzipitiert und elektro-phoretisch aufgetrennt wurden. Spezifisch präzipitierte Proteine (also solche, die von einem Isotyp-Antikörper nicht präzipitiert wurden), wurden massenspektrometrisch analysiert und ggf. mittels weiterer Verfahren validiert.

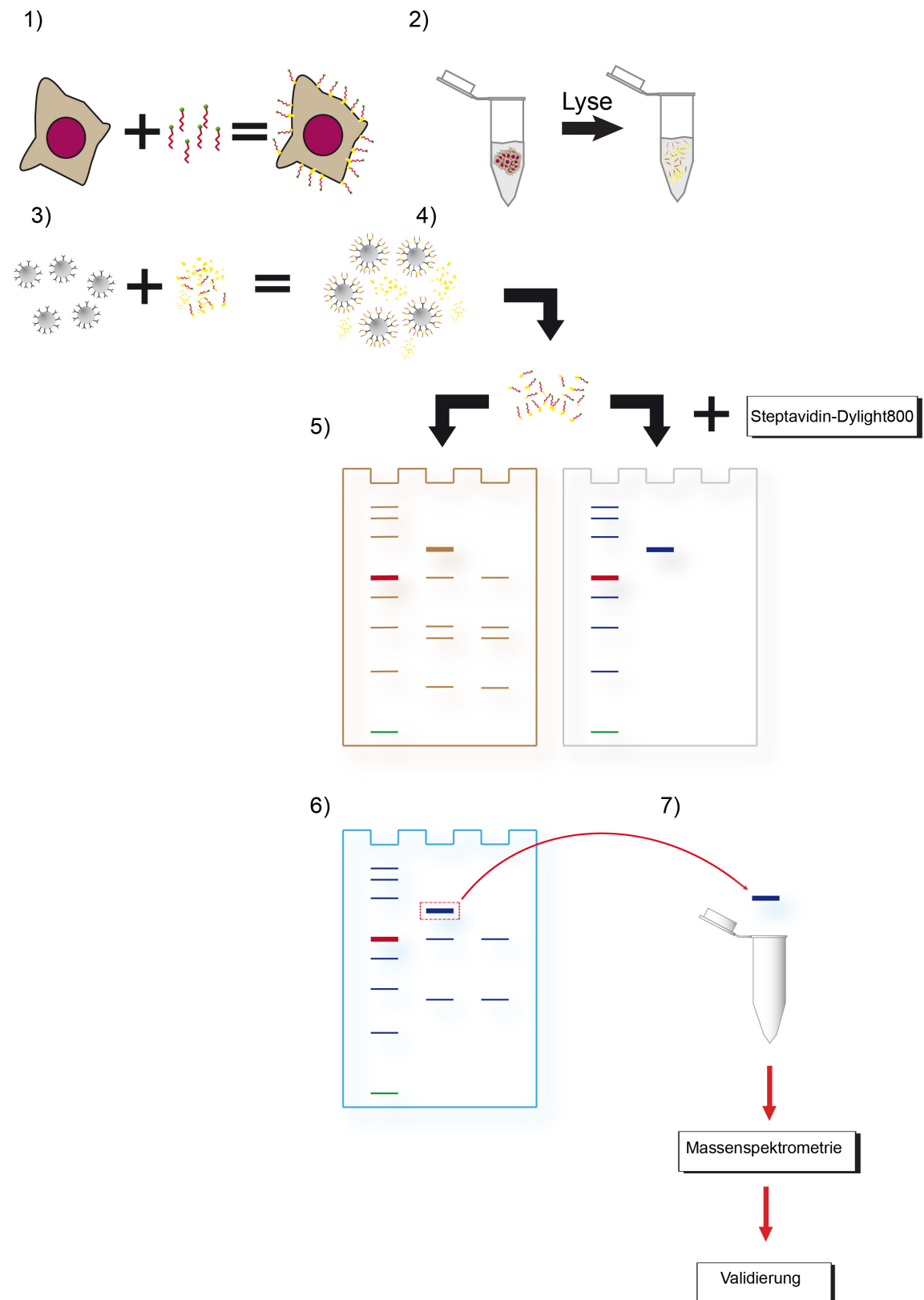


Abb. 5.1 Schematische Darstellung der wichtigsten Arbeitsschritte zur Identifizierung und Validierung unbekannter Antigene, welche durch neue tumorspezifische Antikörper aus Onkosomen-Immunisierungen erkannt und präzipitiert wurden

Nach durchflusszytometrischer Bestimmung derjenigen Zelllinie, die von dem tumorspezifischen Antikörper unbekannter Spezifität am stärksten erkannt wurde, wurde diese Zelllinie expandiert, biotinyliert (1) und lysiert (2). Dabei wurden durch das Ladung tragende Biotinylierungs-Reagenz nur die Polypeptide markiert, welche sich an der Zelloberfläche befanden. Das Gemisch aus biotinylierten und unmarkierten Proteinen wurde mit an Sepharose-Beads gekoppelten tumorreaktiven Antikörpern inkubiert (3). Dies führte zur spezifischen Präzipitation des erkannten und gebundenen Antigens (4). Nach intensivem Waschen wurden die Antigen-Antikörper-Beads-Komplexe durch Zugabe von Probenpuffer und Hitzeeinwirkung voneinander dissoziiert und auf SDS-Gelen aufgetrennt. Zur Bestätigung eines spezifischen Präzipitats wurde ein Westernblot mit einem Streptavidin-Konjugat (HRP bzw. IR-Farbstoff) entwickelt. So ergaben nur biotinylierte Proteine, die durch den tumorreaktiven Antikörper angereichert worden waren, ein spezifisches Signal, welches in der parallel durchgeführten Silberfärbung ebenfalls unter anderen unspezifischen Banden mehr oder weniger hervorstach (5). Konnte diese spezifische Bande zweifelsfrei identifiziert werden, wurde die gesamte Prozedur erneut durchgeführt, wobei das Präzipitat bevorzugt als Bande aus einem mit Coomassie-Blau gefärbten, präparativen SDS-Gel ausgeschnitten wurde (6) um schließlich zur massenspektrometrischen Untersuchung verschickt zu werden (7). Diese Untersuchung ergab eine Trefferliste, welche das vermeintliche Antigen auflistete. Zum Zwecke der Validierung des erkannten Antigens wurden im Ergebnis teil näher beschriebene Methoden individuell auf das jeweilige Protein abgestimmt. Da alle bisher aus Onkosomen-Immunisierungen erhaltenen Antikörper ausschließlich natives Antigen erkannten und deshalb in Westernblot bzw. Paraffin-Schnitten nicht funktionierten, musste diese aufwendige Prozedur zur Identifikation der Spezifitäten angewendet werden.

Alle getesteten Antikörper, die aus diesen Immunisierungen hervorgegangen waren und ausgewählt wurden, erkannten natives, nicht aber denaturiertes Antigen. Sie lieferten also keine spezifischen Signale auf konventionellen Westernblots, wohl aber auf nativen Dot-Blots und in der Durchflusszytometrie mit lebenden Zellen. Die Vorgehensweise zur Lösung dieses Problems ist in Abbildung 5.1 skizziert. Auf diese Weise wurden die massenspektrometrisch zu untersuchenden Banden aller identifizierten Antikörper ausgewählt. Die tumorreaktiven Antikörper 17H1, 15A7, 22F2 aus der Immunisierung mit Mesotheliom-Onkosomen und die Antikörper 13D1 und 7A11 wurden hier nicht näher charakterisiert, da durchgeführte Immunpräzipitationen noch zu keinen Ergebnissen geführt hatten, die im Westernblot zweifelsfrei bestätigt werden konnten. Ihr durchflusszytometrisches Antigen-Expressionsprofil ist in Abbildung 5.8. zusammengefasst.

3.3.1.2 Der Antikörper 13C8 erkennt das Antigen MelCAM (CD146)

Der Antikörper 13C8 stammte aus der Immunisierung einer Ratte mit Onkosomen der Melanom-Zelllinie SKMel23. Die Bestimmung der Subklasse mittels ELISA, der mit Isotyp-spezifischen Antikörpern durchgeführt wurde, ergab, dass 13C8 die IgG2a-Subklasse besitzt. Durchflusszytometrische Untersuchungen zeigten, dass das von 13C8 gebundene Antigen sehr hoch auf der Oberfläche von Melanomzellen (darunter: Mel624.38, Sr1Mel, SKMel23 und A375) exprimiert wird. Auch auf Glioblastom-Zellen (U87, U251 und U373) wurde eine hohe Expression beobachtet. Zwei weitere Zelllinien (Lungenkarzinom-Zellen A549 und Nierenzellen HEK293), wiesen dagegen eine deut-

lich geringere Expression auf. Interessanterweise wurden gesunde und nicht-immortale embryonale Fibroblasten (Wi38) von 13C8 ebenfalls stark angefärbt (Abb. 5.2,B). Die beiden am stärksten positiven Melanom-Zelllinien (SKMel23 und A375) wurden für die analytischen Immunpräzipitationen ausgewählt. Die Immunpräzipitation (IP) aus biotinylierten A375-Lysaten ergab auf dem mit Silber gefärbten SDS-Gel (kurz: Silbergel) eine klare Bande, die in der mitgeführten Isotyp-Kontrolle fehlte. Auf dem mit Streptavidin-HRP entwickelten Westernblot wurde diese Bande als einzige spezifische Bande verifiziert. Schwache Reaktionen riefen einige weitere Banden hervor, die aber in beiden Präzipitaten in vergleichbarer Stärke vorhanden waren und vermutlich auf Proteine zurückzuführen sind, die unspezifisch an die Sepharose-Beads banden. Obwohl zu deren Abreicherung ein „*pre-clearing*“ durchgeführt wurde, konnten offenbar nicht alle unspezifisch bindenden Proteine quantitativ entfernt werden. Nach erfolgter Identifizierung der richtigen Bande wurde die ganze Prozedur in präparativem Maßstab wiederholt, die spezifisch präzipitierte Bande aus einem mit Coomassie gefärbten SDS-Gel (kurz: Coomassie-Gel) ausgeschnitten und massenspektrometrisch analysiert. Diese Analyse erfolgte am Zentrallabor für Proteinanalytik am Adolf-Butenandt-Institut (Abb. 5.2,A). Die zur massenspektrometrischen Analyse verschickte Bande hatte im SDS-Gel eine Größe von ca. 80 kDa. Das in Abb. 5.2 dargestellte Silbergel bzw. der Westernblot zeigte eine Bande, die auf Höhe von ca. 130 kDa lief. Sie resultierte aus IPs deren Zellen durch Ernten mithilfe eines Zellschabers statt des zuvor verwendeten Trypsins gewonnen wurden. Dieses Ergebnis lässt vermuten, dass es sich bei der 80 kDa-Bande um ein tryptisches Fragment handelte.

Die aus der Massenspektrometrie erhaltene Trefferliste zeigt eine Auflistung der Proteine an, die in dieser Bande identifiziert wurden. Die Reihenfolge basiert auf der Anzahl, Länge und Häufigkeit der Peptidfragmente, die durch die Analyse identifiziert wurden. Bei der Mehrzahl dieser Proteine handelte es sich um verschiedene Keratin-Isoformen, welche allgemein als häufige Kontamination bekannt sind. Diese wurden von den weiteren Analysen ausgeschlossen. An erster Stelle, also mit der höchsten Wahrscheinlichkeit und Sequenzabdeckung, stand das Antigen MelCAM (Abb. 5.2,C), dessen errechnete Masse basierend auf dem Vergleich mit der publizierten Sequenz bei ca. 74 kDa liegt. Die tatsächliche Größe des Proteins liegt aber deutlich höher, da die zum Vergleich verwendete, in der Datenbank hinterlegte Referenzsequenz unvollständig war. Tatsächlich besitzt das gesamte MelCAM-Protein eine Größe von 130 kDa.

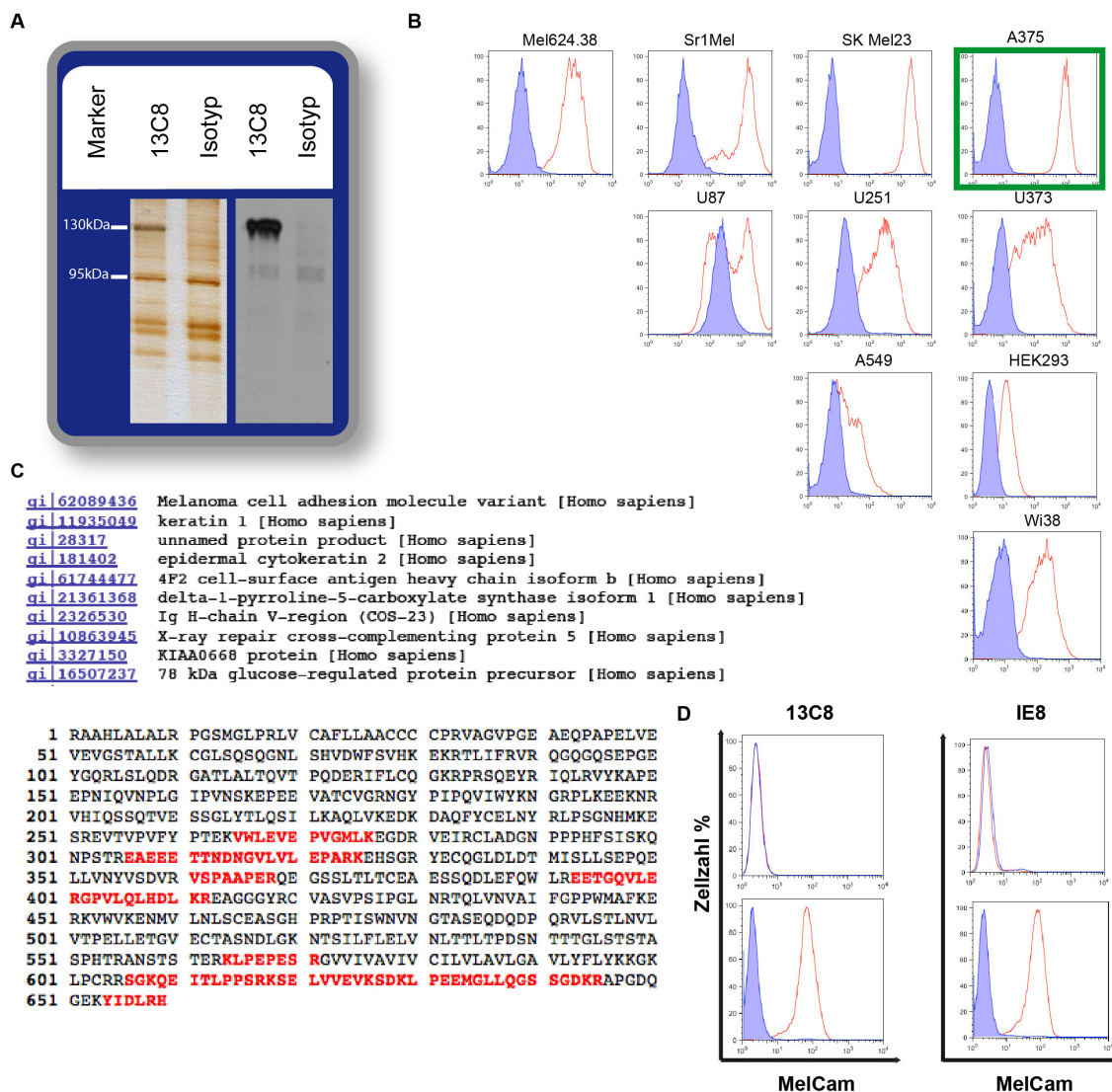


Abb. 5.2 Antikörper 13C8 erkennt MelCam

Zur Identifikation des unbekannten Antigens, das durch den 13C8-Antikörper erkannt wird, wurden IPs mit Lysaten von humanen Tumorzelllinien gemacht, welche dieses Antigen zu diesem Zeitpunkt am höchsten an ihrer Zelloberfläche exprimierten und mit IPs des Isotyp-Antikörpers verglichen. **(A)** Das Silbergel links zeigt eine Bande bei ca. 130 kDa, die durch den Westernblot (rechts) bestätigt werden konnte. **(B)** Die durchflusszytometrische Analyse einiger Tumorzelllinien, die mit diesem Antikörper gefärbt wurden, ergab besonders hohe Expression auf Melanom-Zelllinien (oberste Zeile), verglichen mit Glioblastom-Zelllinien (zweite Zeile), anderen Tumorzelllinien (dritte Zeile) und primären embryonalen Fibroblasten (letzte Zeile). Das Histogramm der für die IP und massenspektrometrische Analyse verwendete Melanom-Zelllinie A375 ist grün umrahmt.

(C) Die Analyse der 13C8-Bande aus dem Coomassie-Gel ergab an erster Stelle der Trefferliste, die aus den Massenspektrometrie-Daten erstellt wurde, das „*melanoma cell adhesion molecule*“ (kurz: MelCam) (**oben**). 17% der Peptidfragmente wurden dabei erkannt (rot markiert), woraus ein „Score“ von 1669 resultierte (**unten, Tab.3.3**). **(D)** Zur Bestätigung des Ergebnisses wurden eine Melanom-Zelllinie verwendet, die mit einem MelCam-Expressionsplasmid (**unten**) bzw. Leervektor (**oben**) stabil transfiziert war und mit dem Antikörper 13C8 oder einem kommerziell erhältlichen Antikörper (Klon IE8) gefärbt und durchflusszytometrisch analysiert wurde. Die den Leervektor tragenden Zellen waren MelCam-negativ, wohingegen die MelCam-transfizierten Zellen sowohl vom 13C8, als auch vom kommerziellen IE8-Antikörper erkannt wurden und ein identisches Expressionsprofil lieferten (rote Histogramme).

Um dieses Ergebnis zu bestätigen, wurde eine MelCAM-negative Melanomzelllinie analysiert, die mit einem MelCAM-Expressionsplasmid bzw. dessen Leervektor stabil

transfiziert war (freundlicherweise überlassen von Frau Prof. Judy Johnson, Institut für Immunologie, LMU). Sowohl 13C8 als auch ein kommerzieller MelCAM-spezifischer Antikörper (Klon IE8) ergaben ein gleichmäßiges positives Signal auf den MelCAM-exprimierenden Zellen, wohingegen beide Antikörper keine Bindung an die mit Leervektor-transfizierten Zellen zeigten (Abb. 5.2,D). Die oben beschriebenen Ergebnisse zeigten, dass 13C8 das Zelladhäsions-Protein MelCAM, ein Glykoprotein, das seinen Namen durch die hohe Oberflächen-Expression auf malignen Melanomen erhalten hat, erkennt.

3.3.1.3 Der Antikörper 8F2 erkennt das Antigen Integrin $\alpha 3$

Der Antikörper 8F2 stammte aus der Immunisierung einer Ratte mit Onkosomen der Lungenkarzinom-Zelllinie A549. Die Bestimmung der Subklasse mittels ELISA, der mit Isotyp-spezifischen Antikörpern durchgeführt wurde, ergab, dass 8F2 die IgG2a-Subklasse besitzt. Die durchflusszytometrische Untersuchung verschiedener Tumor-Zelllinien ergab eine exakte Übereinstimmung des Expressionsmusters aller getesteten Zelllinien mit dem eines VLA3 α -spezifischen Antikörpers (8G7), der aus der gleichen Immunisierung stammte, die vor Beginn dieses Projektes mit Onkosomen der A549 Lungenkarzinom-Zelllinie durchgeführt und im Labor identifiziert worden war.

Für die präparative Immunpräzipitation wurden ebenfalls Zelllysate der A549-Zelllinie verwendet. Auf den Silber- und Coomassiegelen war eine spezifische Bande mit einer molekularen Masse von ca. 130 kDa deutlich zu erkennen, die auch per Westernblot bestätigt werden konnte. In einem präparativen Ansatz wurde diese Bande eng ausgeschnitten und per Massenspektrometrie als Integrin $\alpha 3$ (Synonym: VLA3 α , ITGA3, CD49c) identifiziert.

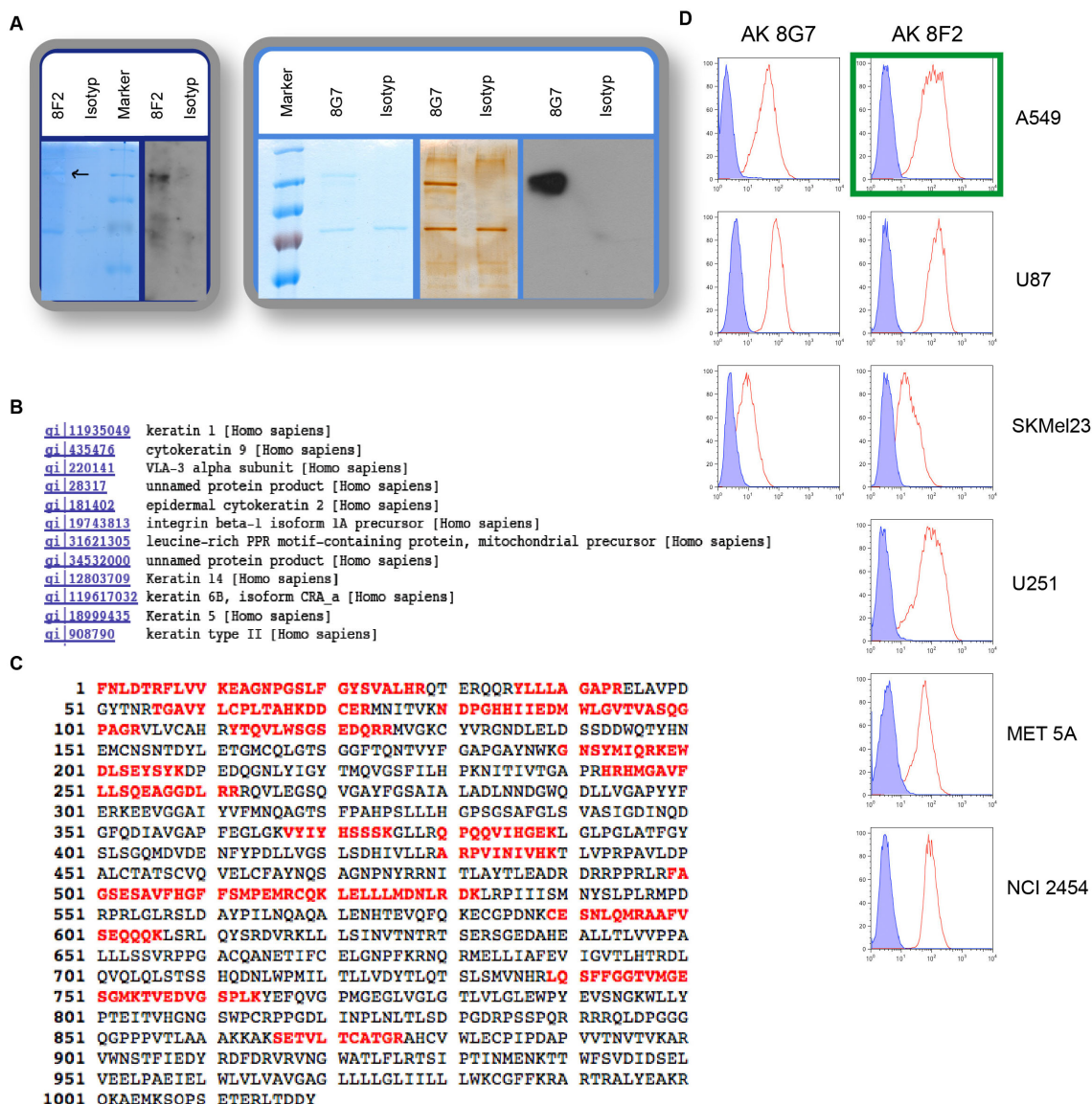


Abb. 5.3 Antikörper 8F2 erkennt VLA3α (CD49c)

Zur Identifikation des Antigens, das durch den 8F2-Antikörper erkannt wird, wurden IPs mit Lysaten der Lungenkarzinomzelllinie A549 durchgeführt (grün umrahmt) und mit IPs eines Iso-
typ-Antikörpers verglichen. **(A)** Das Coomassie-Gel links zeigt eine Bande bei ca. 130 kDa, die durch den Westernblot bestätigt werden konnte. Rechts sind ein Coomassie-, ein Silbergel und ein Westernblot vom bereits bestätigten Antikörper 8G7 abgebildet, welcher an VLA3α (CD49c) bindet. **(B)** Die massenspektrometrische Analyse der 8F2-Bande aus dem Coomassie-Gel ergab an dritter Stelle der Trefferliste, die aus den Massenspektrometrie-Daten erstellt wurde, ebenfalls das VLA3α-Molekül. **(C)** 24% der Peptidfragmente wurden dabei erkannt, was einen sehr hohen „Score“ von 3381 Punkten lieferte (Tab.3.3), und damit eine hohe Verlässlichkeit des Ergebnisses zeigte. **(D)** Der durchflusszytometrische Vergleich zeigt eine vollständige Übereinstimmung der Erkennungsmuster des 8F2-Antikörpers mit 8G7.

Zum Vergleich wurden Immunpräzipitationen mittels beider Antikörper (8F2, 8G7 und ein IgG2a-Isotyp als Kontroll-IP) mit Lysaten aus biotinylierten A549-Zellen durchgeführt. Diese elektrophoretisch aufgetrennten Lysate ergaben eine spezifische Bande, die sowohl im Silbergel als auch im Westernblot mit der Bande des jeweils anderen Präzipitats deckungsgleich war.

3.3.1.4 Der Antikörper 2A4 erkennt wahrscheinlich das Protein Integrin α V

Der Antikörper 2A4 stammte aus der Immunisierung einer Ratte mit Onkosomen der Melanom-Zelllinie SKMel23. Die Bestimmung der Subklasse mittels ELISA, der mit Isotyp-spezifischen Antikörpern durchgeführt wurde, ergab, dass 2A4 die IgG2a-Subklasse besitzt. Die durchflusszytometrische Untersuchung verschiedener Tumor-Zelllinien mit 2A4 ergab eine sehr hohe Expression des Antigens auf der Oberfläche von Glioblastom-Zellen (U87, U251, U373) und besonders von Melanomzellen (darunter: Mel624.38, Sr1Mel, A375 und SKMel23). Außerdem färbte dieser Antikörper auch die embryonale Fibroblasten-Zelllinie Wi38 an (Abb.5.4).

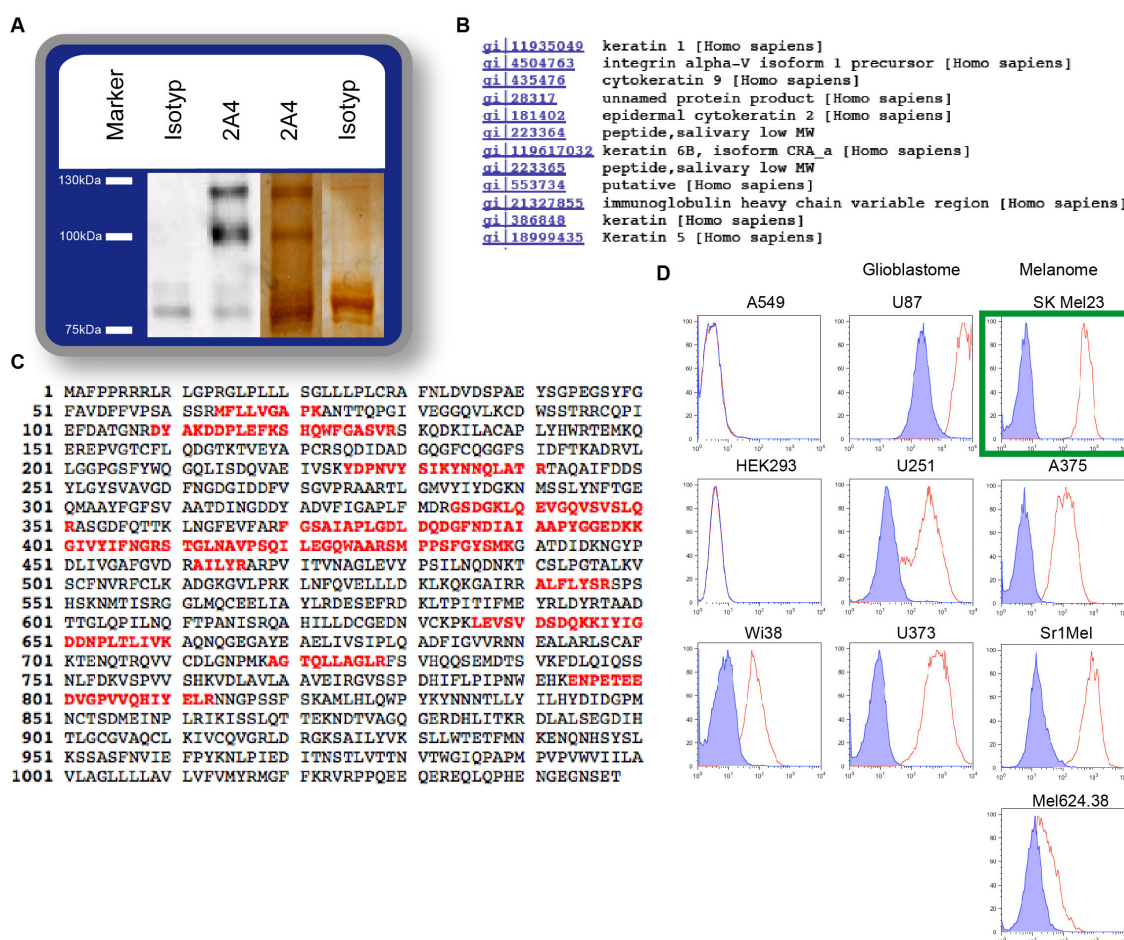


Abb. 5.4 Antikörper 2A4 erkennt das Integrin α V

Zur Identifikation des Antigens, das durch den 2A4-Antikörper erkannt wird, wurden IPs mit Lysaten der Melanom-Zelllinie SKMel23 durchgeführt (grün umrahmt) und mit IPs eines Isotyp-Antikörpers verglichen.

(A) Die IPs ergaben eine Bande bei ca. 120 kDa, wie im obigen Westernblot und Silbergel zu sehen ist. (B,C) Sie wurde laut dem Ergebnis der Massenspektrometrie vom Integrin α V hervorgerufen. Eine zweite Bande bei ca. 100 kDa ist auf eine Kontamination dieser Probe mit Kerationen zurückzuführen (Trefferliste der 100 kDa-Bande nicht dargestellt).

(D) Die durchflusszytometrische Analyse verschiedener Zelllinien zeigt, dass das erkannte Antigen auf SKMel23-Zellen am höchsten exprimiert war. Melanom- und Glioblastom-Zelllinien zeigen eine starke Färbung im Durchflusszytometer.

Die durchgeführten IPs ergaben zwei Banden. Die 100 kDa-Bande wurde durch Keratine hervorgerufen, die unspezifisch an die Beads gebunden hatten. Die Bande, die im SDS-Gel bei ca. 120 kDa detektiert wurde, ergab als einzigen spezifischen Treffer das

Integrin α V. Aus der publizierten Sequenz von Integrin α V (ohne posttranslationale Modifikationen) wurde ein Molekulargewicht von 117 kDa errechnet.

3.3.1.5 Der Antikörper 3A10 erkennt wahrscheinlich das Protein Integrin β 3

Der Antikörper 3A10 stammte aus der Immunisierung einer Ratte mit Onkosomen der Melanom-Zelllinie SKMel23. Die Bestimmung der Subklasse mittels ELISA, der mit Isotyp-spezifischen Antikörpern durchgeführt wurde, ergab, dass 3A10 die IgG2a-Subklasse besitzt. Die durchflusszytometrische Untersuchung verschiedener Tumor-Zelllinien mit 3A10 ergab die höchste Expression des Antigens auf Glioblastom-Zelllinien (U373, U251, U87) und A549-Lungenkarzinomzellen. Außerdem wurde auch auf verschiedenen Melanom-Zelllinien Mel624.38, Sr1Mel, A375 und SKMel23) eine hohe Expression im Durchflusszytometer nachgewiesen. Die deutlichste Bande konnte aus Lysaten der U87-Zelllinie gewonnen werden, welche als einzelne Bande ohne unspezifische Ko-Präzipitate per Westernblot bestätigt werden konnte. Diese Bande konnte auf Höhe der 130 kDa-Bande des Größenstandards detektiert werden. Schließlich wurde eine solche gut sichtbare Bande aus einem Coomassie-Gel ausgeschnitten und massenspektrometrisch untersucht.

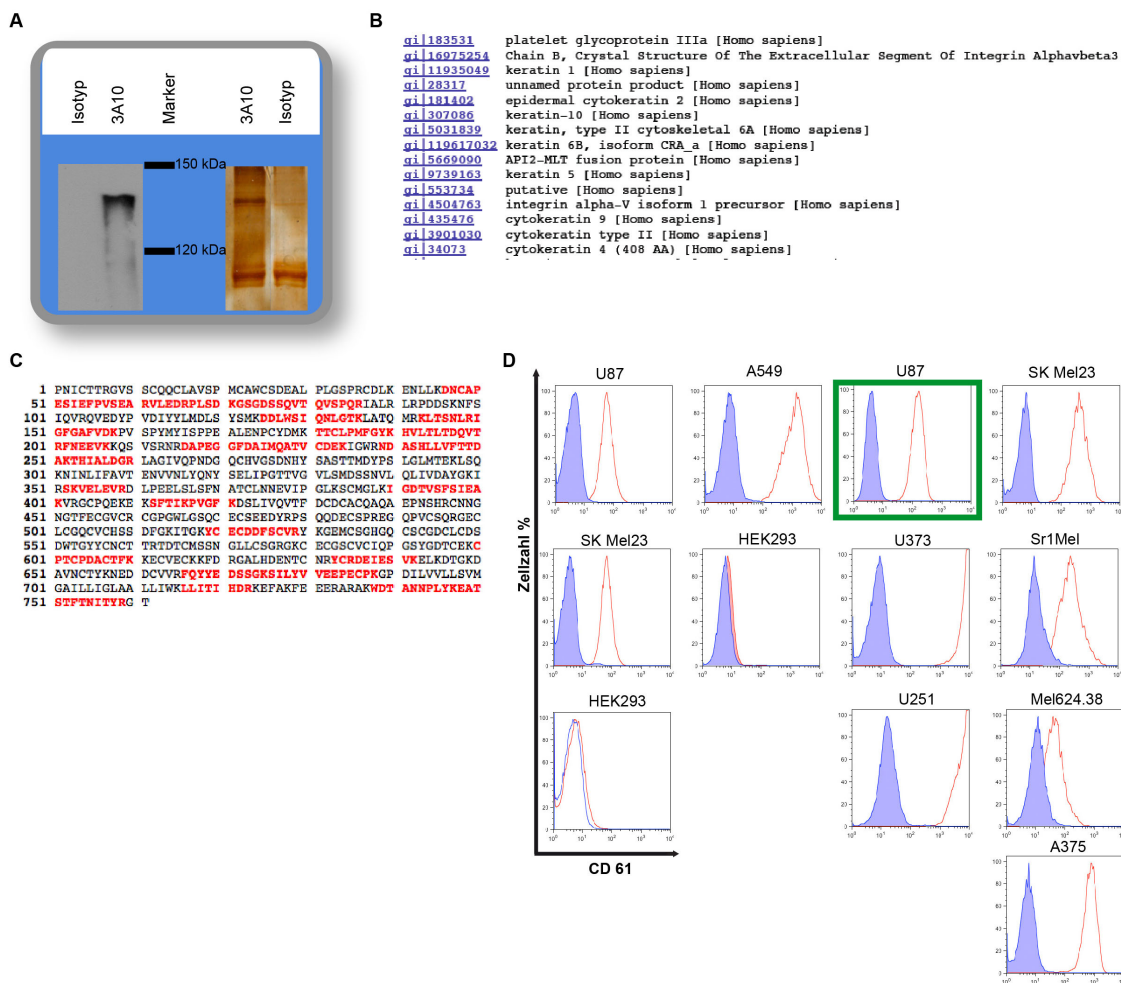


Abb. 5.5 Antikörper 3A10 erkennt das Integrin $\beta 3$ bzw. $\alpha V/\beta 3$

Zur Identifikation des Antigens, das durch den 3A10-Antikörper erkannt wird, wurden IPs mit Lysaten der Glioblastom-Zelllinie U87 durchgeführt (grün umrahmt) und mit IPs eines Isotyp-Antikörpers verglichen.

(A) Aus den IPs ging eine einzelne Bande bei ca. 130 kDa hervor, wie im Silbergel (rechts) dargestellt ist; der Westernblot (links) bestätigte diese Bande. **(B,C)** Der erste Treffer in der Liste ist Integrin $\beta 3$, der zweite ist $\alpha V\beta 3$. Die Sequenzabdeckung beider Sequenzen ergab jeweils 30%, woraus scores von 3851 und 3338 resultierten (Tab.3.3). **(D)** Die durchflusszytometrische Analyse verschiedener Zelllinien zeigt, dass das erkannte Antigen auf U373-Zellen am höchsten exprimiert ist. Die verwendeten Lysate wurden allerdings aus U87-Zellen gewonnen, da diese zu diesem Zeitpunkt die höchste Expression aufwiesen. Ein kommerzieller Antikörper, der gegen CD61 (Integrin $\beta 3$) gerichtet ist, zeigte ein vergleichbares Färbungsmuster auf diesen beiden Zelllinien (linke Spalte).

Es wurden zwei relevante Treffer entdeckt, von denen der erste Treffer Integrin $\beta 3$ (CD61) und der zweite Treffer $\alpha V\beta 3$ (CD51/CD61) ist. Ob der Antikörper nun das CD61-Molekül oder die Quartärstruktur des Vitronektin-Rezeptors (CD51/CD61) erkennt, konnte nicht mehr rechtzeitig geklärt werden. Integrine bilden normalerweise Heterodimere aus jeweils einer α - und β -Untereinheit aus. Da die IP unter nativen Bedingungen durchgeführt wurde und die Untereinheiten αV und $\beta 3$ auf soliden Tumoren bzw. Zelllinien, welche aus ihnen hervorgegangen waren, häufig ko-exprimiert werden (siehe Kapitel 4.3), konnte zu diesem Zeitpunkt aufgrund der ähnlichen scores nicht zwischen $\beta 3$ und $\alpha V\beta 3$ unterschieden werden.

Färbungen auf den drei untersuchten Zelllinien U87, SKMel23 und HEK293 mit 3A10 bzw. einem kommerziellen CD61-spezifischen Antikörper ergaben eine gute Übereinstimmung der Expressions-Profile (Abb.5.5 D).

3.3.1.6 Der Antikörper 12E12 erkennt das Antigen Protein 14-3-3 zeta/delta

Der Antikörper 12E12 stammte aus der Immunisierung einer Ratte mit Onkosomen der Mesotheliom-Zelllinie MSTO211H. Die Bestimmung der Subklasse mittels ELISA, der mit Isotyp-spezifischen Antikörpern durchgeführt wurde, ergab, dass 12E12 die IgG1-Subklasse besitzt. Die durchflusszytometrische Untersuchung verschiedener Tumor-Zelllinien mit 12E12 ergab die höchste Expression auf der Oberfläche von SKMel23 Melanom-Zellen; die Expression auf anderen Tumor-Zelllinien war etwas niedriger. Für die analytischen IPs wurden biotinylierte Lysate verschiedener Zelllinien (SKMel23, U87, HEK293 und U251), eingesetzt.

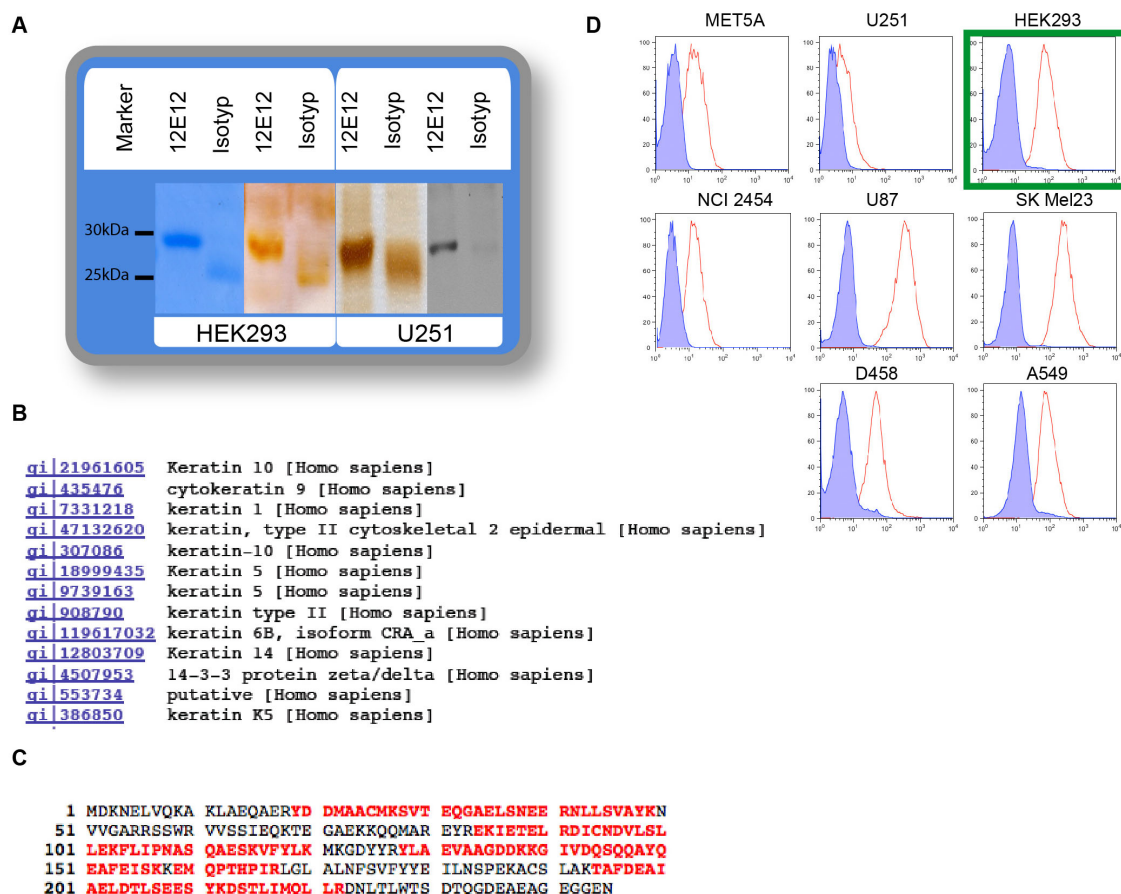


Abb. 5.6 Antikörper 12E12 erkennt 14-3-3 ζ/δ

(A) IPs wurden mit Lysaten verschiedener Zelllinien durchgeführt. Bei Verwendung von Gesamtzelllysaten aus HEK293-Zellen und Membranfraktionen aus U251-Zellen konnte eine spezifische Bande bei ca. 30 kDa detektiert werden, wie im Coomassiegele bzw. in den beiden Silbergele dargestellt. Diese Bande wurden per Westernblot (rechts) auf etwa gleicher Höhe bestätigt.

(B,C) Die Trefferliste aus der oben abgebildeten Coomassiebande ergab als einziges spezifische Signal das 14-3-3 ζ-Protein bzw. seine phosphorylierte Form dem δ Protein, und zwar mit 55%-iger Sequenzabdeckung (Tab.3.3). Die ζ- und δ-Formen unterscheiden sich nur durch eine Phosphorylierung an einem Serin-Rest. (D) Auf SKMel23-Zellen konnte die höchste Oberflächen-Expression dieses normalerweise intrazellulären Proteins entdeckt werden, wie das entsprechende Histogramm aus der durchflusszytometrischen Untersuchung zeigt. Für die Massenspektrometrie wurde die im Histogramm grün umrahmte HEK293-Zelllinie verwendet.

Obwohl die SKMel23-Zellen das Antigen am höchsten exprimierten, wurde die präparative IP nicht mit SKMel23-Lysaten durchgeführt, weil sie als einzige Zelllinie Lysate lieferte, die im Silbergel nach erfolgter Präzipitation und elektrophoretischer Auftrennung eine Doppelbande bei ca. 28 und 30 kDa aufwiesen. Im Gegensatz dazu gab es bei Verwendung von Lysaten aus HEK293-, U87- und U251-Zellen nur eine einzelne Bande. Massenspektrometrisch analysiert wurde schließlich eine Bande aus einer IP mit Lysaten aus HEK293-Zellen, die eine saubere Bande ergeben hatten, welche bei der Isotyp-Kontrolle fehlte. Auch der Westernblot lieferte eine klare Bande bei ca. 28 kDa. Die massenspektrometrische Analyse ergab, dass 12E12 wahrscheinlich das Protein 14-3-3 ζ/δ erkennt (Abb. 5.6).

3.3.1.7 Der Antikörper 23E12 erkennt das Antigen Hsp90

Der Antikörper 23E12 stammte aus der Immunisierung einer Ratte mit Onkosomen der Melanom-Zelllinie Sr1Mel. Die Bestimmung der Subklasse mittels ELISA, der mit Iso-typ-spezifischen Antikörpern durchgeführt wurde, ergab, dass 23E12 die IgG2a-Subklasse besitzt. Die durchflusszytometrische Untersuchung verschiedener Tumor-Zelllinien mit 23E12 ergab eine besonders hohe Expression des Antigens auf den Melanom-Zelllinien A375, Mel 624.38 und insbesondere auf SKMel23-Zellen. Des Weiteren war eine moderate Expression auf SKBR3 Brustkrebszellen und eine hohe Expression auf U87 Glioblastom-Zellen zu beobachten. Eine Mesotheliom-Zelllinie (MSTO211H) erwies sich dagegen als negativ.

In Silber- und Coomassiegelen konnte nach IPs mit SKMel23-Lysaten eine deutliche Bande bei ca. 100 kDa identifiziert werden. Ein Ko-Präzipitat ergab im Silbergel und im Westernblot einen diffusen Schmier. Das bedeutet, dass es sich bei dem Ko-Präzipitat womöglich um homologe Proteine, die sich nur in wenigen kDa voneinander unterscheiden, oder verschiedene Isoformen bzw. Fragmente eines Proteins, handelt. Neben der 100 kDa-Bande wurde an der intensivsten Stelle dieses Bereichs auch eine Bande auf Höhe von ca. 50 kDa aus einem Coomassiegel ausgeschnitten, welche in der in Abb. 5.7A dargestellten Nachfärbung mit dem Verfahren der Silberfärbung besser zu erkennen war. Die Analyse der 100 kDa-Bande ergab als ersten spezifischen Treffer das Hitzeschock-Protein90 (Hsp90). Der darauf folgende Treffer, ein Vorläuferprotein von Calnexin, weist eine hohe Homologie zu Hsp90 auf und steht deshalb auf dieser Liste weit oben. Die 50kDa-Bande repräsentiert β -Tubulin (Abb.5.7).

Die hohe Sequenzabdeckung von 30 % bei der Identifizierung von Hsp90 und die Identifizierung des Ko-Präzipitats, einem bekannten Interaktionspartner von Hsp90, lässt vermuten, dass dieses Ergebnis korrekt ist. Die endgültige Bestätigung konnte aus zeitlichen Gründen noch nicht abgeschlossen werden.

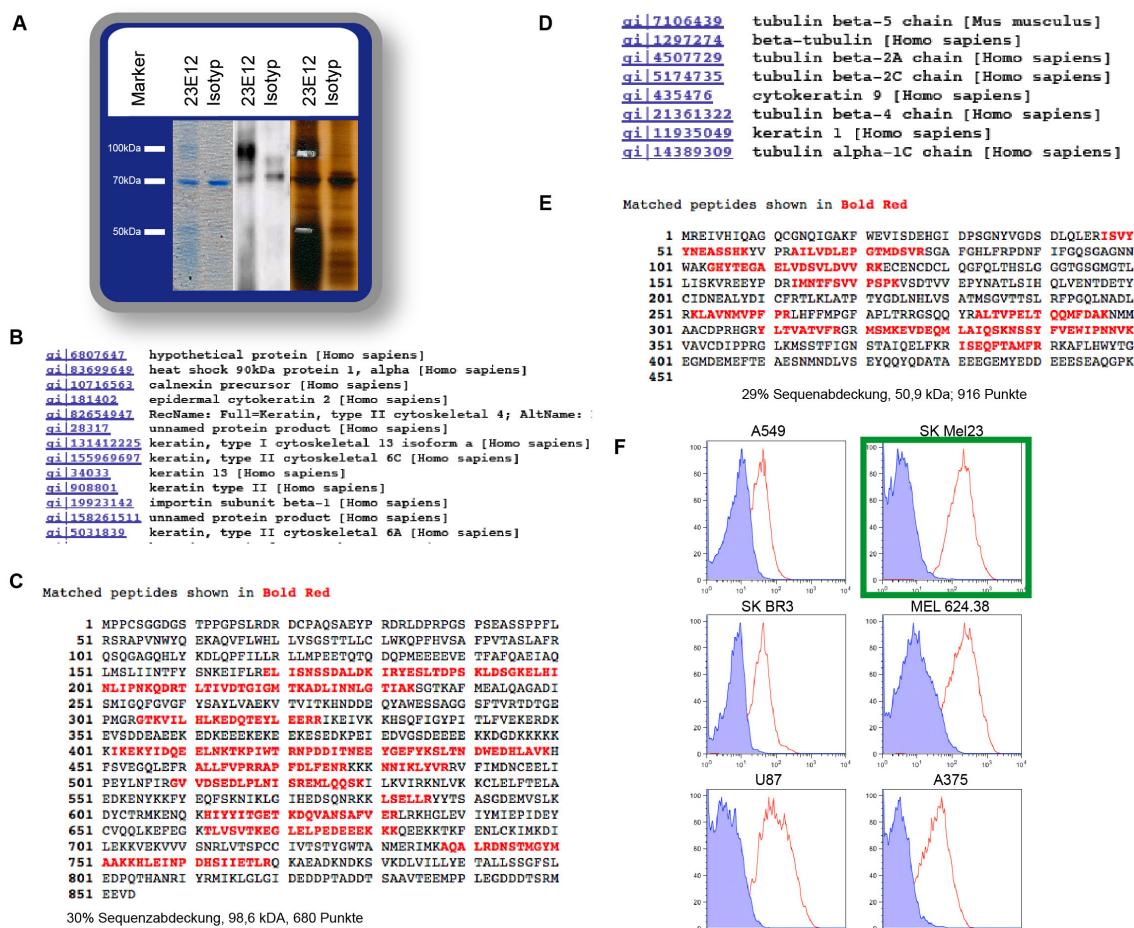


Abb. 5.7 Antikörper 23E12 erkennt Hsp90

(A) Die Immunpräzipitation wurde mit Lysaten aus SKMel23-Zellen durchgeführt. Die Banden wurden aus dem Coomassiegele ausgeschnitten (links), welches nachträglich zur Kontrolle mit Silber nachgefärbt wurde (Mitte). Die Bande, welche sich auf einer Höhe von ca. 100 kDa befand, wurde mittels Westernblot bestätigt (rechts). Eine zweite aus einem Ko-Präzipitat resultierende Bande, die sowohl im Westernblot, als auch in der Silberfärbung eine diffuse Bande ergab, wurde aus dem Coomassiegele an seiner intensivsten Stelle bei ca. 50 kDa ausgeschnitten. Beide Banden wurden der massenspektrometrischen Untersuchung unterzogen.

(B,C) Der erste von zwei spezifischen Treffern in der Analyse-Liste war das Hitzeschock-Protein 90 (Hsp90). Der zweite Treffer ist ein dazu homologes Protein, dass die erkannten Peptid-Sequenzen teilweise beinhaltet.

(D,E) Bei dem Ko-Präzipitat handelt es sich um verschiedene Isoformen des β -Tubulin, die aufgrund ihrer Homologie und ähnlicher Größe einen weiten molekularen Masse-Bereich abdecken und damit die diffuse Bande erklären. Obwohl ein endgültiger Beweis noch aussteht, ist das Ko-Präzipitat (β -Tubulin) ein guter Hinweis darauf, dass die 100 kDa-Hauptbande tatsächlich Hsp90 ist, da es ein bekannter Interaktionspartner von Hsp90 ist (Li et al. 2012). Die 100 kDa-sowie die 50 kDa-Bande wurde mit hoher Sequenzübereinstimmung identifiziert. (F) Aus der hier gezeigten durchflusszytometrischen Analyse verschiedener Zelllinien ist ersichtlich, dass SKMel23-Zellen die höchste Expression von Hsp90 aufweisen. Für die IP wurden deshalb Ly-sate aus dieser Zelllinie (grün umrahmt) verwendet.

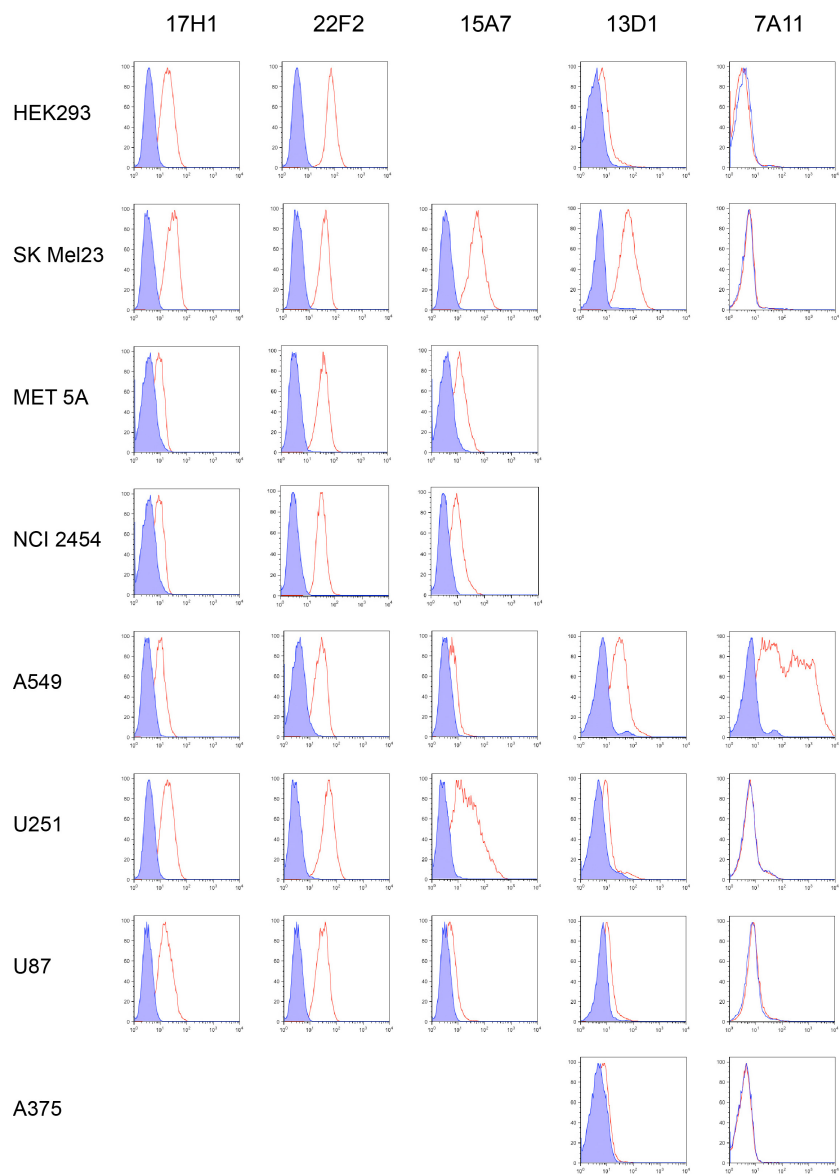


Abb. 5.8 Durchflusszytometrie-Profil weiterer Antikörper
Durchflusszytometrisch ermittelte Histogramme fünf weiterer Antikörper aus folgenden Immunisierungen sind dargestellt. Reihen von links nach rechts: Antikörper in Spalte 1-3 stammen aus der Mesotheliom-Immunisierung mit MSTO 211H, Antikörper in Spalte 4-5 stammen aus der Lungenkarzinom-Immunisierung mit A549-Zellen.

Tab.3.3 Tumor-reaktive Antikörper und deren Antigene aus der Onkosomen-Immunisierungsmethode						
Klon	13C8	3A10	2A4	23E12	12E12	8F2
Immunisierung mit Onkosomen aus Zelllinien	Melanom/ SKMel23	Melanom/ SKMel23	Melanom/ SKMel23	Melanom/ Sr1Mel	Mesotheliom/ MSTO 211H	Lungenkarzinom/ A549
Spezies, Isotyp	Ratte, IgG2a	Ratte, IgG2a	Ratte, IgG2a	Ratte, IgG2a	Ratte, IgG1	Ratte, IgG2a
Identifiziertes Antigen, Synonyme	MelCAM, MCAM, CD146	Integrin β3, CD61 oder CD51/CD61	Integrin αV, CD51	Hsp90	14-3-3 ζ	CD49c, VLA-3 α-Kette, Integrin α3
Molekulare Masse (Da)	73774	87470 bzw. 79715	117062	98652	27899	114517
Sequenzabdeckung	17%	33%	19%	30%	55%	24%
Score	1669	3851 bzw. 3338	437	680	381	3381
Status	bestätigt	Nicht bestätigt	Nicht bestätigt	Mit hoher Wahrscheinlichkeit	Mit hoher Wahrscheinlichkeit	bestätigt

3.3.2 Generierung von vier Carboanhydrase IX-spezifischen Antikörpern mit der zielgerichteten Immunisierungs-Methode

Die Klonierung der humanen CA IX in einen eukaryotischen Expressionsvektor hatte zum Ziel, rekombinante Onkosomen einer Ratten-Zelllinie, die das humane CA IX-Protein tragen, für Immunisierungen zu verwenden. Damit sollte untersucht werden, ob sich veränderte Onkosomen auf für zielgerichtete Immunisierungen eignen.

Zunächst wurde die cDNA des humanen CA IX-Gens in den Expressionsvektor pcDNA3.1 kloniert. Abbildung 5.9 zeigt ein Schema dieser Klonierung. Die Restriktionsspaltung aller mit dem CA IX-Expressionsplasmid transformierter Bakterienklone ergab die erwarteten Fragmente. Ein Aliquot aus einer Plasmid-DNA-Präparation des Klons 3 wurde aus beiden Richtungen ansequenziert und ergab vollständige Übereinstimmung mit publizierten Sequenzen (Daten nicht gezeigt).

Die Immunisierung selbst erfolgte mit Onkosomen der Ratten-Zelllinie RBL, welche zuvor mit dem oben beschriebenen Expressionsplasmid stabil transfiziert worden waren (RBL-CA IX). Je 10 µg Onkosomen wurden zwei Ratten intraperitoneal (i.p.) injiziert. Nach erfolgter Grund- und Booster-Immunisierung wurden Hybridome aus Milzzellen einer der beiden Ratten generiert, welche nach Vereinzelung monoklonale Antikörper produzierten. Mittels ELISA wurden IgG-Antikörper für weitere Untersuchungen ausgewählt.

Die ca. 500 Hybridome, die aus dieser Immunisierung resultierten, wurden zunächst mittels Durchflusszytometrie auf humanen Zellen getestet. Um spezifisch CA IX-reaktive Antikörper zu identifizieren, wurde ein 1:1-Gemisch von CA IX-negativen Zellen (HEK293) und CA IX-positiven Zellen (HEK293-CA IX) verwendet (HEK293 Zellen transfiziert mit dem CA IX-Expressionsplasmid (Abb.5.10)). Nur CA IX-spezifische Antikörper sollten die beiden Zelllinien unterschiedlich erkennen und im Durchflusszytometer zwei Populationen darstellen.

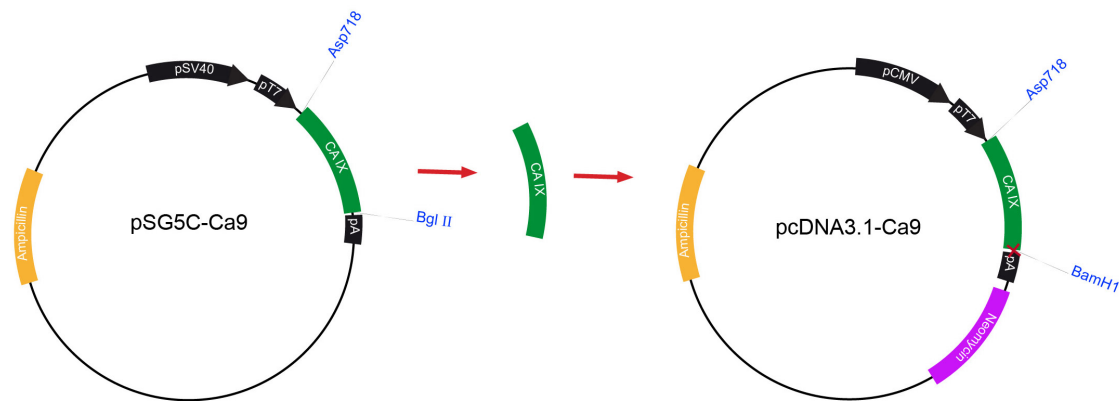


Abb. 5.9 Klonierung der humanen CA IX in einen eukaryotischen Expressionsvektor

Schematische Darstellung der Klonierung. Das Gen für die humane CA IX wurde durch Spaltung mit den Restriktionsenzymen *Asp718* und *Bgl*II aus dem Ausgangsvektor pSG5C-Ca9 (links) herausgeschnitten. Rechts ist der Empfängervektor pcDNA3.1 mit dem bereits eingefügten CA IX-Gen (grün) dargestellt. Es wurde zunächst mit den Enzymen *Asp718* und *Bam*HI gespalten. Durch die Verschmelzung der kompatiblen „klebrigen Enden“ aus *Bam*HI und *Bgl*II wurde die palindromische Sequenz der *Bam*HI -Schnittstelle zerstört.

Ampicillin-Resistenzgen (gelb); pSV40: SV40 Promotor; pCMV: CMV Promotor; pA: Polyadenylierungs-Sequenz; Neomycinresistenzgen (violett).

Auf diese Weise gelang es, insgesamt 4 Hybridome zu identifizieren (15F8, 8C2, 16E7, und 24H1), die in der Durchflusszytometrie zwei *peaks* im Histogramm ergaben. Die Tatsache, dass diese 4 Klone durchflusszytometrisch identifiziert wurden, weist bereits darauf hin, dass auch sie möglicherweise bevorzugt natives Antigen erkennen, was ganz im Sinne des Vorhabens war. Untersuchungen, ob sich unter den anderen 496 Klonen noch solche Antikörper verbergen, die denaturierte CA IX erkennen und damit z.B. für Westernblot-, und Immunhistologie von Paraffin-Präparaten geeignet sein könnten, waren bis zur Fertigstellung dieser Arbeit noch nicht abgeschlossen. Auch die Booster-Immunisierung der zweiten Ratte stand noch aus. Sie könnte noch weitere CA IX-spezifische Antikörper liefern. Die vier identifizierten Antikörper werden nach der Stabilisierung der Hybridome weiter charakterisiert. Insbesondere soll untersucht werden, ob sich unter ihnen ein Antikörper befindet, der die Enzymaktivität der CA IX blockiert.

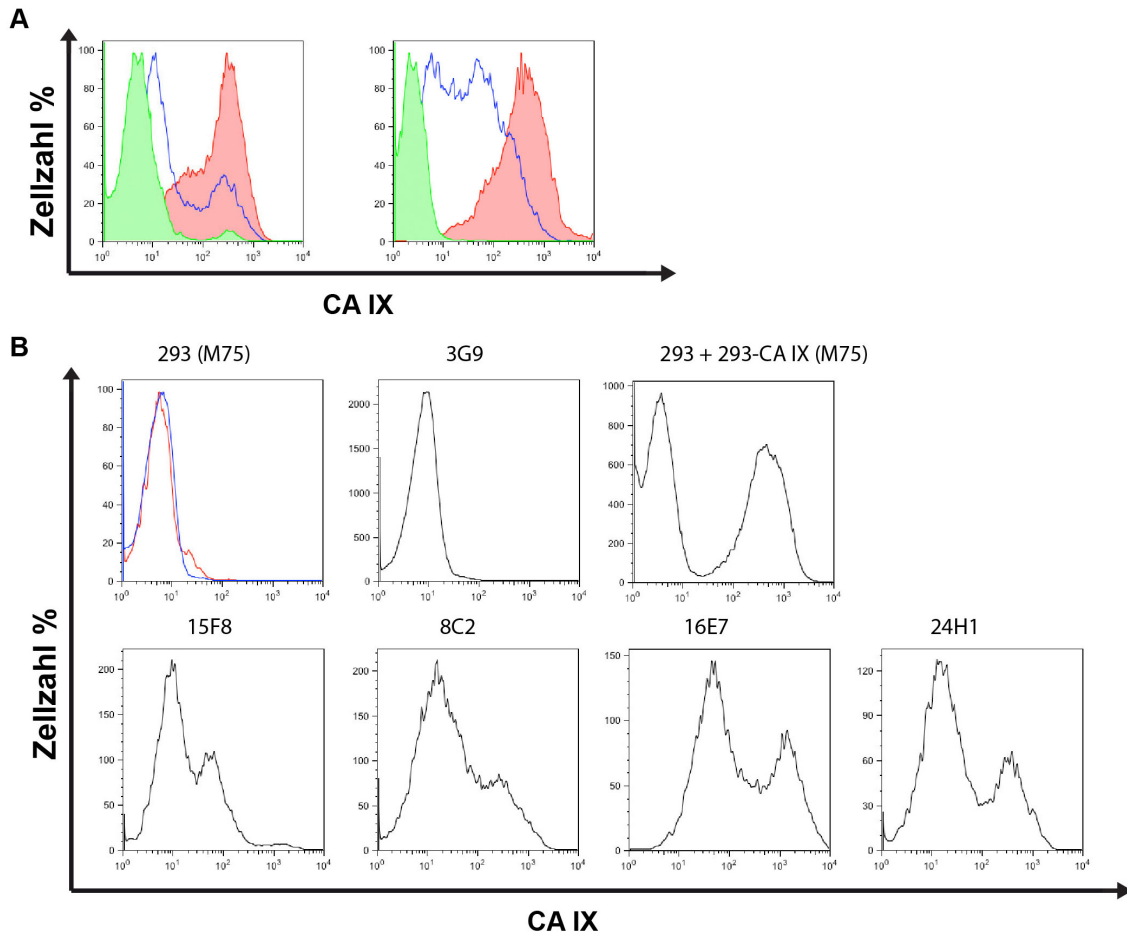


Abb. 5.10 Erfolgreiche Generierung monoklonaler Antikörper gegen die humane CA IX
(A) Die Ratten-Suspensionszelllinie RBL (**links**) und die humane Zelllinie HEK293 (**rechts**) wurden jeweils mit dem CA IX-Expressionsplasmid (siehe Abb. 5.9) transfiziert und über einen mehrwöchigen Zeitraum mit G418 selektioniert. Danach wurden die am stärksten CA IX exprimierenden Zellen am FACS ARIA III isoliert und dann expandiert. Das jeweils rote Histogramm verdeutlicht den Erfolg dieser Sortierung. Das jeweils grüne Histogramm zeigt die CA IX-negativen parentalen Zelllinien. Die blauen Histogramme stellen die Ausgangspopulationen vor der Sortierung dar.
(B) Isolierte Onkosomen von RBL-CA IX-Zellen wurden zur Immunisierung einer Ratte eingesetzt. Antikörper der daraus resultierenden Hybridome wurden durchflusszytometrisch auf Bindung an eine 1:1-Mischung aus CA IX-negativen HEK293-Zellen und CA IX-exprimierenden HEK293-CA IX-Zellen getestet. CA IX-reaktive Antikörper ergaben zwei Populationen (15F8, 8C2, 16E7, 24H1 und M75, einem CA IX-spezifischen Antikörper, als Positiv-Kontrolle), und wurden so von irrelevanten Antigenen, die nur einen positiven *peak* ergeben hatten, diskriminiert. Als Negativ-Kontrolle wurde die parentale CA IX-negative HEK293-Zelllinie verwendet. Der Antikörper aus Hybridom 3G9 hat nicht gebunden und stellt eine CA IX-negative Population dar.

4 DISKUSSION

4.1 Carboanhydrasen, Mikroumgebung und evolutionäre Medizin

Aufgrund der alternden Gesellschaften nimmt in den industrialisierten Ländern die Zahl der Krebsfälle und Rezidive ständig zu (Robert-Koch-Institut et al. 2012). Gleichzeitig ließen sich die klinische Prognose für bestimmte Tumorarten, wie die Karzinome, nicht entscheidend verbessern, weshalb nach neuen, spezifischeren Therapieoptionen gesucht wird. Die Entwicklung neuer Medikamente, welche die Modulierung der Tumor-Mikroumgebung zum Ziel haben, hat in den vergangenen Jahren stetig an Bedeutung gewonnen. Hypoxie, Azidose und ROS gehören zu den wichtigsten Merkmalen der Mikroumgebung solider Tumoren, die für maligne Progression und metastatisches Potenzial verantwortlich sind und maßgeblich für die Therapieresistenz gegenüber konventionellen Krebstherapien verantwortlich sind (Nagasawa 2011). Insbesondere ist man daher bestrebt, die Regulation der äußeren und inneren pH-Werte von Tumorzellen so zu beeinflussen und zu stören, dass die Zellen sensibler für konventionelle Therapien werden.

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Aktivität der CA XII maßgeblich an der Modulierung der Mikroumgebung beteiligt ist und einen großen Einfluss auf das Wachstum von Tumorzellen *in vitro* und *in vivo* ausübt. Zusammen mit den Ergebnissen anderer weisen meine Experimente auf eine klinische Bedeutung einer CA XII bzw. CA IX/CA XII gerichteten Krebstherapie hin.

Bisher wurde intensiv an der Entwicklung von überwiegend chemischen Inhibitoren geforscht, die membrangebundene CA-Isoformen gegenüber zytosolischen bevorzugen. Zu den derzeit vielversprechendsten Inhibitoren ihrer Art gehören Sulfonamid- und Coumarin-Derivate (Morris et al. 2011).

Sulfonamide, Sulfamate, und Sulfamide blockieren die Enzyme durch Bindung an das im aktiven Zentrum der CAs liegende Zn^{2+} -Ion (Supuran 2008, Supuran 2010). Einige dieser Inhibitoren blockieren nur die Tumor-assoziierten CAs (Guler et al. 2010). Um die Inhibierung auf membranständige CAs zu reduzieren, sind die Konjugation von positiven bzw. negativen Ladungsträgern oder hydrophilen Zuckerresten (De Simone et al. 2006, Supuran 2008, Supuran 2010) eine offensichtliche Möglichkeit, wobei eines der *small molecules*, die von De Simone und Kollegen entwickelt wurden, als Prodrug wirkt, das erst unter Hypoxie zum CA-Inhibitor konvertiert wird und eine besonders hohe Selektivität gegenüber CA IX und XII aufweist (De Simone et al. 2006). Kürzlich

wurden natürliche Coumarine und deren Derivate als CA-Inhibitoren entdeckt, deren inhibitorischer Mechanismus auf Blockierung des aktiven Zentrums durch eine hydrolysierte Form der Drogen beruht (Maresca et al. 2009, Maresca et al. 2010). Das Problem der spezifischen Inhibition der CA IX oder CA XII bestand damit natürlich weiterhin. Dennoch haben Lou und Kollegen mit Sulfonamid- und Coumarin-basierten Inhibitoren eine effiziente Inhibition der CA IX in einem Mammakarzinom-Modell erreicht, wodurch das Wachstum von primären Tumoren und Metastasen verzögert wurde (Lou et al. 2011).

Unser Antikörper 6A10 ist der erste spezifische und hoch-effiziente biologische Inhibitor der CA XII (Tab 1.3). Seine Enzym-inhibierende Wirkung im zellfreien System wurde bereits in Vorarbeiten in unserem Labor nachgewiesen (Battke et al. 2011). Zur Untersuchung, ob die spezifische Inhibition der CA XII durch den 6A10-Antikörper auch in vitalen Tumorzellen funktioniert, wurde eine Vielzahl von Zelllinien auf CA XII-Expression hin untersucht. Parallel hierzu wurde die CA IX-Expression untersucht, da zuvor publizierte Daten einen kompensatorischen Effekt der beiden häufig ko-exprimierten Tumor-assoziierten CAs nahelegten (Chiche et al. 2010b). In fast allen untersuchten Zelllinien, die von den verschiedensten Tumorarten, u.a. Glioblastomen, Mamma- und Magenkarzinomen stammten, wurde die CA XII bereits unter Normoxie hoch exprimiert und erfuhr eine weitere Hochregulation in einer hypoxischen Umgebung (z.B. bei A549- und HT29-Zellen). Die CA IX-Expression hingegen wurde in fast allen untersuchten Zelllinien erst durch Hypoxie induziert.

Da A549- und U87-Zellen eine besonders hohe CA XII-Expression und ein robustes Wachstum unter verschiedenen Zellkulturbedingungen aufwiesen, wurden sie verwendet, um die wachstumsinhibierende Wirkung des Antikörpers 6A10 genauer zu definieren und damit die Grundlage für die Untersuchung im Sphäroid-Modell und schließlich im Tiermodell zu schaffen. Wie schon Doyen und Mitarbeiter (Doyen et al. 2012), konnte im Rahmen dieser Arbeit beobachtet werden, dass Tumorzellen in der Lage waren in einem weiten Spektrum von leicht alkalischen bis stark sauren pH-Werten (pH7,4-pH6,5) zu überleben und zu proliferieren. Auch unter extremem Sauerstoffmangel (0,2 % O₂) wuchsen die Zellen, wenn auch deutlich langsamer. Die Untersuchung von Carboanhydrasen und deren Inhibition ist nicht trivial, da das CO₂-Bicarbonatsystem das wichtigste Puffersystem in der Physiologie der Säugetiere darstellt. Daher enthalten alle gängigen Zellkulturmedien hohe Konzentrationen an Bicarbonat mit der Folge, dass Zellen in der Standard-Zellkultur weitgehend unabhängig von der Aktivität der membranständigen Carboanhydrasen wachsen können. Um dies zu ändern und damit die Abhängigkeit von Tumorzellen von der CA XII besser untersuchen zu können, reduzierte ich die Bicarbonatkonzentration im Zellkulturmedien oder ersetzte es ganz

durch alternative Puffersysteme (Hepes, Mes). Unter diesen Bedingungen stand den Zellen als Bicarbonatquelle nur spontan gebildetes Bicarbonat aus der standardmäßigen CO₂-Begasung und dem Stoffwechsel zur Verfügung, und ich konnte die wachstumsinhibierende Wirkung einer CA XII-Blockierung auch in der Zellkultur untersuchen. Diese erarbeiteten Bedingungen ermöglichten es mir erstmals, eine wachstumsinhibierende Wirkung in Monolayer-Zellkulturen nachzuweisen. Die kombinierte Behandlung kultivierter Tumorzellen mit monoklonalen inhibierenden Antikörpern gegen CA IX (MSC8) und CA XII (6A10) zeigten einen synergistischen Effekt und bestärkten die in der Literatur vorherrschende Vermutung, dass beide Enzymaktivitäten teilweise redundant sind.

Meine Ergebnisse bestätigten, dass in Monolayern ein Effekt durch Inhibition der CAs nur in bicarbonatfreien Medien zu beobachten ist, die nur dem CO₂-Gehalt im Brutschrank (5%) ausgesetzt waren. Auch in dreidimensionalen Zellkulturen, so genannten Sphäroiden, konnte ich die stärksten wachstumsinhibierenden Effekte in bicarbonatfreiem bzw. mit wenig Bicarbonat gepuffertem (10 mM) Medium beobachten. Dabei waren diese meist ausgeprägter als in Monolayer-Kulturen, was dadurch zu erklären ist, dass sich in dreidimensionalen Strukturen Bicarbonat-, Sauerstoff- und pH-Gradienten ausbilden (Friedrich et al. 2007, Chiche et al. 2009, Hulikova et al. 2011), wie es wohl in vivo in nicht-vaskularisierten Mikrometastasen der Fall ist.

Untersuchungen von Chiche und Kollegen und Swietach und Kollegen haben gezeigt, dass die CA IX an der pH-Regulation in Sphäroiden beteiligt ist. Das Enzym hatte allerdings keinen Einfluss auf das Wachstumsverhalten der Zellen in Monolayer-Kulturen, vermutlich weil die Bicarbonat-Transporter schon mit Bicarbonat-gepuffertem Medium gesättigt waren und nicht auf das zusätzlich von der CA IX produzierte Bicarbonat angewiesen waren (Swietach et al. 2008, Chiche et al. 2009). Durch Übertrag dieser Erkenntnisse auf dreidimensional wachsende Sphäroid-Kulturen konnte ich im Rahmen dieser Arbeit erstmals statistisch signifikante Wachstumsunterschiede, die ausschließlich auf die spezifische Inhibition der CA XII durch Inkubation mit dem 6A10 Antikörper hervorgerufen worden waren, nachweisen. Besonders ausgeprägt war die Wachstumsinhibition in Zelllinien, die erst bei Hypoxie eine CA IX-Expression aufwiesen (A549, Kato III) oder bei Mammakarzinomzellen, die selbst unter hypoxischen Bedingungen CA IX-negativ blieben (SKBR3 und BT474). Wie aus der Literatur bekannt, und wie wir mit eigenen Arbeiten (Abb. 6.2) bestätigen konnten, sind viele Fälle von Brustkrebs CA IX-negativ, exprimieren aber viel CA XII und könnten daher eine interessante und wichtige Indikation für einen klinisch-therapeutischen Einsatz des 6A10-Antikörpers darstellen.

Im Vergleich von CA IX-positiven und CA IX-negativen HT29-Kolonkarzinomzellen

konnte ich zeigen, dass nur in Abwesenheit der CA IX (durch *knockdown*) ein signifikanter Wachstumsverzug durch 6A10 erreicht werden konnte. Zusammen genommen weisen diese Ergebnisse auf eine kompensatorische Rolle der CA IX in den untersuchten Tumorzelllinien A549 und HT29 hin. Derartige Effekte konnten zuvor nur durch genetisches *silencing* beobachtet werden, nicht aber durch gezielte Blockierung der jeweiligen Enzymaktivitäten (Chiche et al. 2009, Doyen et al. 2012). Diese Arbeiten waren damit zur Überprüfung dieser Hypothese zwar wertvoll, sie sind aber klinisch-therapeutisch nur schwer realisierbar.

Die Behandlung von Sphäroiden aus A549-Zellen mit 6A10 führte auch zur Herunterregulation des NBC2-Transkripts, einem Natrium-Bicarbonat-Transporter, der am zellulären Import von alkalischem Bicarbonat beteiligt ist (Soleimani and Burnham 2000). Eine Assoziation oder ein direkter Zusammenhang mit CA XII wurde für dieses Protein noch nicht untersucht. Es ist jedoch bekannt, dass CA IX eine physikalische und funktionelle Einheit mit dem Natrium-Bicarbonat-Transporter NBC1 bildet (Orlowski et al. 2012). Diese physikalische Interaktion erleichtert den Import des von der CA IX gebildeten Bicarbonats. Grundsätzlich sind weitere Assoziationen der CA IX bzw. XII mit Bicarbonat-Transportern und (Bicarbonat-) Anionenaustauschern denkbar, ein funktioneller Komplex, der auch als Bicarbonat-Transportmetabolon bezeichnet wird (Svastova 2012). Die Inhibierung einer oder beider CAs könnte somit auch direkte Konsequenzen für assoziierte und interagierende Transporter haben.

In A549-Zellen, die als *monolayer* kultiviert waren, konnte CA IX sowohl auf Transkriptionsebene als auch durchflusszytometrisch nur unter Hypoxie nachgewiesen werden. Per qPCR konnte ich die in Sphäroiden herrschende Hypoxie indirekt bestätigen, da trotz Kultivierung bei Normoxie CA IX exprimiert wurde, wenn auch in geringerem Maße als es bei konventionellen A549-Kulturen unter Hypoxie der Fall ist. Dies ist dadurch zu erklären, dass die äußeren Zellschichten eines Sphäroids noch genügend Sauerstoff per Diffusion erhalten und deshalb nur ein Teil der Zellen unter Sauerstoffmangel leidet (Chiche et al. 2010a, Doyen et al. 2012, Pelletier et al. 2012). Auch der Befund, dass selbst unter hohen Bicarbonat-Konzentrationen im Sphäroid-Modell eine 6A10-bedingte Wachstumsinhibition zu beobachten war, spricht für den limitierten Zugang von Sauerstoff und Bicarbonat und folglich für einen Säuregradienten innerhalb der Sphäroide. Experimentelle Daten zu solchen pH-Gradienten in Sphäroiden wurden bereits von verschiedenen Arbeitsgruppen erhoben (Friedrich et al. 2007, Swietach et al. 2008). Es erscheint plausibel, dass Tumorzellen auf die Blockierung der CA XII und damit die Bicarbonat-Zufuhr zum Erhalt des leicht alkalischen pH_i (Neri and Supuran 2011, Parks et al. 2011) mit einer kompensatorischen Hochregulierung der CA IX reagieren. Solche Untersuchungen wie auch in vivo-Experimente zur gleichzeitigen Blo-

ckierung der CA IX und CA XII konnten im Rahmen dieser Arbeit noch nicht durchgeführt werden, sind aber für die Zukunft geplant.

Jede Zelle ist stark von der Homöostase des pH_i abhängig. Dies gilt besonders für Tumorzellen, die durch ihren Glykolyse-lastigen Stoffwechsel vermehrt Säure produzieren. Wie eingangs erläutert, kann die vermehrte intrazelluläre Säurebildung nicht nur zu einer erhöhten Mutationsrate führen, die einerseits genetische Instabilität und damit noch höhere Mutationsraten zur Folge hat, sondern auch direkt zum Zelltod führen (Loeb 2011). In dieser Arbeit wurde mehrfach eine 6A10-bedingte, verlangsamte Proliferationsrate beobachtet. Inwiefern dies auf eine Zunahme von Nekrose zurückzuführen war, wurde nicht untersucht. Es lässt sich aber festhalten, dass die Blockierung einer und, insbesondere, beider Tumor-assoziierten CAs die pH_i -Regulation empfindlich stört. Möglicherweise ist die Inhibition der CAs ohne gleichzeitige Blockierung wenigstens eines Bicarbonat-Transporters für die Induktion des Zelltodes zwar nicht ausreichend, doch führt die beobachtete Wachstumsverzögerung zu der Vermutung, dass die Energiekosten der Zelle für den Import von Bicarbonat und den Export von Protonen gestiegen war. Wahrscheinlich ist, dass beide Mechanismen in unterschiedlichen Tumorzellarten unterschiedlich stark beansprucht werden. Dabei setzen sich in einem soliden Tumor solche Zellen durch, die die pH -Regulation durch ihren (epi-)genetischen Hintergrund am energieeffizientesten durchführen, was ihnen einen Wachstumsvorteil gegenüber anderen Zellen verschafft, also ihre Fitness steigert. Unter diesem Aspekt ist auch die beobachtete Herunterregulierung von NBC2 als Reaktion auf eine CA XII-Blockierung zu sehen, da der Transporter dadurch unwirksam wäre. Komplementäre therapeutische Angriffspunkte zu einer CA XII-Inhibition wären also z.B. NBCs, AEs oder V-ATPasen, die ebenfalls das Säure-Base-Gleichgewicht der Tumorzelle regulieren (Parks et al. 2011, Perez-Sayans et al. 2012). Die kombinierte Blockierung unterschiedlicher Komponenten der pH -Regulation könnte den Säureausstoß effizient hemmen und eine ausgeprägtere intrazelluläre Azidifizierung verursachen, woran die Tumorzelle schließlich sterben würde (Neri and Supuran 2011). Ein weniger saures extrazelluläres Tumormilieu würde außerdem die Invasivität und Metastasenbildung auf unterschiedliche Weise hemmen, etwa indem säureempfindliche Immuneffektorzellen wie CD8⁺-T-Lymphozyten ihren anergen Zustand verlören (Calcinotto et al. 2012).

Weitere therapeutische Optionen für den 6A10-Antikörper wären eine radioaktive Markierung und eine Konjugation mit Toxinen (*antibody-drug-conjugate*, ADC) oder Enzymen, die Prodrugs in zytotoxische Produkte umsetzen können (ADEPT) (Xu and McLeod 2001), was zu einer spezifischeren Art der Chemotherapie führen könnte. Der ADEPT-Ansatz bietet besonders viele Vorteile gegenüber einer konventionellen Che-

motherapie, da erstens 6A10 ein Tumor-assoziiertes Enzym inhibiert, zweitens die konjugierten Pro-Toxin-spezifischen Enzyme mit maximaler Spezifität an den Wirkort transportiert werden, und drittens erst im Tumor-Milieu in aktive Toxine umgewandelt werden. Diese Form der Therapie bedeutet nicht zuletzt auch für den Patienten mehr Sicherheit, da jedes Tumor-assoziierte Antigen auch in verschiedenen Normalgeweben vorkommt. Da dort allerdings weder erhöhte ROS-Konzentrationen noch Azidose oder Tumor-assoziierte Proteasen vorhanden sind, kommt es dort nicht zur Aktivierung der Pro-Toxine. Dieser Ansatz ließe sich hervorragend in unserem etablierten NSG-Mausmodell testen. Eine direkte Konjugation von Pro-Toxinen mit monoklonalen Antikörpern wäre prinzipiell auch möglich, doch wurde diese Strategie bisher nicht experimentell getestet. Dass eine funktionelle Konjugation von monoklonalen Antikörpern mit Drogen bzw. Prodrugs grundsätzlich möglich ist, lässt sich an zahlreichen erfolgreichen klinischen Studien mit ADCs belegen (Teicher and Chari 2011). Auch wenn in den letzten Jahren keine Prodrug eine klinische Zulassung erhalten hat, werden derzeit eine Vielzahl an klinischen Studien zur Krebstherapie durchgeführt (Nagasawa 2011). Schließlich ist bekannt, dass Hypoxie-adaptierte Zellen und hypoxische Tumoren eine erhöhte Strahlenresistenz aufweisen (Brown 2007), doch haben Doyen und Mitarbeiter gezeigt, dass Bestrahlung bei Inhibition beider CAs (IX und XII) dauerhaft das Tumorstadium verlangsamt (Doyen et al. 2012). Dies ist ein Indiz dafür, dass eine Strahlentherapie wesentlich effizienter wirken kann, wenn die Zellen ihren pH_i nicht mehr effizient regulieren können.

Derartige Folgen einer experimentellen CA XII-Blockierung zu studieren war bislang nur durch shRNA-vermittelten Knockdown möglich. Auf diese Weise konnten Hsieh und Kollegen eine reduzierte Expression von MMP2 und 9 als Folge nachweisen, während Timp2, ein Inhibitor von Matrix-Metalloproteasen wie MMP2, verstärkt gebildet wurde. Die Hemmung dieser Säure-induzierten Proteasen war nach Ansicht der Autoren einer der Gründe für die deutlich reduzierte Migration, Invasivität und in vitro-Koloniebildung unter kontaktunabhängigen Bedingungen. MMP2 und MMP9 sind Tumor-assoziierte Proteasen, die im Milieu solider Tumoren die extrazelluläre Matrix abbauen und mit zahlreichen Tumor-assoziierten Integrinen interagieren und so zu Mobilität und Invasivität der Tumorzellen beitragen (Stock and Schwab 2009, Bauvois 2012). Auch in xenotransplantierten Mäusen bildeten shCAXII-exprimierende MDA-MB-231 Brustkrebszellen deutlich weniger und kleinere Lungenmetastasen als parentale, CA XII-exprimierende MDA-MB-231 Zellen (Hsieh et al. 2010). Das lässt vermuten, dass die CA XII ein wichtiger Faktor für die Invasivität und Metastasierung von Tumorzellen darstellt.

Auf jeden Fall erscheint die weitere molekulare Charakterisierung der CA XII ein loh-

nenswertes Ziel, da sich dadurch möglicherweise weitere kompensatorische Mechanismen aufdecken lassen, die mögliche Zielstrukturen für die Kombinationstherapien darstellen. Dies wäre zugleich ein gutes Beispiel für evolutionäre Medizin (Stearns 2012), die zum Ziel hat, durch Blockierung verschiedener zusammenhängender Mechanismen, das Risiko für eine Entstehung therapieresistenter Zellklone zu reduzieren (Merlo et al. 2006, Aktipis et al. 2011, Gillies et al. 2012, Silva et al. 2012).

4.2 Die in vivo-Inhibierung der Carboanhydrase XII bietet Möglichkeiten, neue bildgebende Verfahren mit Therapieformen durch konjugierte Antikörper zu kombinieren

Im Rahmen meiner in-vitro-Arbeiten konnte ich beobachten, dass der Antikörper 6A10 unter geeigneten Kulturbedingungen das Wachstum von Tumorzellen hemmt. Diese Ergebnisse waren ausschlaggebend dafür, diesen Effekt in vivo zu verifizieren. Die Transplantation humaner Tumorzellen in immunsupprimierte Mäuse ist ein etabliertes Verfahren zur Überprüfung der antitumoralen Aktivität von Therapeutika wie Antikörpern und *small molecules*. Die im Rahmen meiner Arbeit verwendeten immundefizienten NSG-Mäusen gehören zu den Maus-Modellen mit den stärksten Immundefekten aufgrund der kompletten Abwesenheit eines funktionalen adaptiven Immunsystems und einer nur rudimentär vorhandenen angeborenen Immunität (Ito et al. 2002, Shultz et al. 2007). Sie boten somit ideale Bedingungen für das Wachstum von xenogenem Tumorgewebe und das Studium des unmittelbaren Einflusses von 6A10 auf das Tumorstadium.

Für die Durchführung und Auswertung dieser Versuche adaptierte ich zudem ein auf Biolumineszenz basiertes in-vivo-Bildgebungsverfahren (BLI). Die Messung der Luziferase-Aktivität als Marker für das Tumorstadium erwies sich als sensitives Verfahren, das direkt mit der *post mortem* bestimmten tatsächlichen Tumorstadium korrelierte – wenn auch mit bestimmten Einschränkungen. Als ideal erwiesen sich eher disseminiert wachsende A549-Tumorzellen. Ihr Wachstum gewährleistete offenbar, dass das injizierte Substrat der Luziferase nahezu alle Tumorzellen erreicht, was zu konklusiven Wachstumskurven ohne “Ausreißer” führte. Allerdings beobachtete ich auch, dass ab einem bestimmten Stadium die gemessenen BLI-Werte nicht mehr direkt mit der Tumorstadium korrelierten. Der Grund hierfür ist, dass innerhalb eines großen soliden Tumors nicht mehr alle Zellen mit dem Substrat versorgt werden und dass das gebildete Licht einem *quenching*-Effekt unterliegt. Der für die Messungen geeignete Beobachtungszeitraum war aber stets ausreichend für die Beobachtung therapeutischer Effekte und umfasste die wichtige frühe Phase des Versuchs, in der sich das Verfahren als

sehr sensitiv erwies. Nur eingeschränkt zu verwenden war die BLI im U87-Modell. Im Gegensatz zu A549-Zellen wachsen U87-Zellen als kompakter, solider Tumor, der schnell ein zu großes Volumen erreichte, um über die gesamte Versuchsdauer gute BLI-Werte zu liefern. Dennoch hat sich die adaptierte BLI-Messung als wertvolles Verfahren zur Verlaufskontrolle und Überprüfung der Wirksamkeit des 6A10-Antikörpers erwiesen.

Im A549-Tumormodell zeigte eine Dosis von 100 µg 6A10 bei männlichen und weiblichen Versuchstieren einen eindeutigen wachstumsverzögernden Effekt (TV3 und 5). Unerwarteterweise beobachtete ich bei dem U87-Modell eine leichte wachstumsfördernde Tendenz, die wissenschaftlich nicht zu verstehen ist. Es liegt daher nahe, dass es sich um versuchsbedingte Messschwankungen und -ungenauigkeiten handelte, für die die oben genannten Gründe verantwortlich waren. Auch die aufgrund des langsameren Tumorwachstums längere Dauer des Versuchs führte dazu, dass für die BLI häufiger i.v. injiziert werden musste. Dies verursachte eine zunehmende Schädigung der Venen und erschwerte das ordnungsgemäße Injizieren des Luziferase-Substrats enorm.

Wie an den kleinen Fehlerbalken in Abb. 4.11 abzulesen ist, konnte ich diese Schwankungen im TV5 minimieren. Gründe hierfür sind die Verwendung eines Einzelzellklons (A549 P5F12), der eine homogene GFP- und Luziferase-Expression gewährleistete, sowie meine zunehmend besser werdenden manuellen Fertigkeiten in der i.v.-Injektion und Auswertung. Der Hauptgrund für den dramatischen wachstumsverzögernden Effekt von bis zu 84 % durch 6A10 in TV5 war aber vermutlich das relativ langsame Wachstum des Klons, wodurch die Tumoren über einen längeren Zeitraum behandelt werden konnten. Das langsamere Wachstum ermöglichte eine effizientere Inhibition durch 6A10, da sich die Mäuse für längere Zeit im Zustand der simulierten minimalen Resterkrankung befanden, bevor einzelne Tumorfoci eine Größe überschreiten konnten, die für eine Therapie mit einem Antikörper nicht mehr zugänglich gewesen wären. Interessanterweise traten die ersten detektierbaren BLI-Messwerte bei den 6A10-behandelten Tieren deutlich später auf als bei den Kontrolltieren. Dies interpretiere ich dahingehend, dass 6A10 in vivo auch auf Einzelzellen oder Mikrometastasen wirkt, was für einen klinisch-therapeutischen Einsatz enorm wichtig und wünschenswert ist. Als zusätzliche Bestätigung der antitumoralen Wirkung von 6A10 konnte ich in diesem Versuch zudem ein deutlich längeres Überleben der behandelten Tiere beobachten. Da, wie oben erwähnt, NSG-Mäuse schwerste Immundefekte haben und immunologische Funktionen wie ADCC oder CDC praktisch nicht vorhanden sind, sind die beobachteten 6A10-Effekte mit hoher Wahrscheinlichkeit eine direkte Folge der Hemmung der Carboanhydrase XII. Weitere Versuche, die dies eindeutig abklären sollen, sind geplant. So soll der 6A10-Antikörper auch in enzymatisch deglykosilierter Form einge-

setzt werden, der nicht mehr FcγRI-, FcγRII-, FcγRIII- und C1q vermittelte Effektorfunktionen des Immunsystems induzieren kann (Jefferis 2009).

Die Tumor-assoziierte Expression der CA XII ermöglicht es prinzipiell auch, den 6A10-Antikörper für diagnostische Zwecke zu verwenden. Um die spezifische Bindung von 6A10 an Tumorzellen in vivo zu visualisieren, habe ich den AK mit dem infraroten Fluorochrom 800CW konjugiert. In dieser Arbeit konnte ich zeigen, dass sich Infrarot-Imaging in NSG-Mäusen, trotz ihres lichtstreuenden weißen Fells, prinzipiell zur Verlaufskontrolle eignet. Ich konnte so zeigen, dass 6A10-800CW spezifisch an die Tumoren bindet und sich die IR-Signale sehr schön mit den BLI-Signalen deckten. Mit einer Emissionswellenlänge von 800 nm befindet sich der verwendete Farbstoff im sogenannten "diagnostischen Fenster", das für Fluoreszenz-basierte optische Bildgebung geeignet ist, weil im Bereich von 700-900 nm die Absorptionskoeffizienten von Körperflüssigkeiten an ihrem Minimum sind (Lim et al. 2003) und die Gewebe weniger Autofluoreszenz ausstrahlen. Gleichzeitig können Photonen aus tieferen Gewebeschichten abstrahlen, da endogene Absorber, wie z.B. Oxyhemoglobin, Deoxyhemoglobin, Lipide und Wasser das Licht nur wenig stören (Contag et al. 2000, Aswathy et al. 2010).

Da CA IX und XII Hypoxie-assoziiert sind, würde es sich anbieten, entsprechende Antikörper mit Hypoxie-aktivierbaren Chemikalien, wie Cyanin-gekoppeltem 2-Nitroimidazole zu konjugieren. Solche Farbstoffe ergeben erst in einer hypoxischen Mikroumgebung ein fluoreszierendes Signal und könnten bildgebend zur Verlaufskontrolle einer Tumorerkrankung und Ansprechen auf eine Therapie verwendet werden (Nagasawa 2011). Erste Erfolge mit Fluoreszenz-basierter Bildgebung konnten in der Diagnostik von Mammakarzinomen bereits erzielt werden. Dass die CA IX und die CA XII hierfür sinnvolle spezifische Zielstrukturen sind, haben Tafreshi und Kollegen kürzlich gezeigt (Tafreshi et al. 2012). Für die CA XII gilt aber nach wie vor, dass man über ihre Expression auf verschiedenen Tumoren noch zu wenig weiß. Zukünftige Arbeiten werden sich daher auch dieser Fragestellung widmen. Auch erscheint eine Echtzeit-Fluoreszenz-unterstützte Tumoresektion mit 6A10 grundsätzlich denkbar. Damit könnten auch kleine Gruppen von Tumorzellen in Echtzeit visualisiert und operativ entfernt werden. Entsprechende CCD-Kameras werden derzeit klinisch getestet (Tromberg et al. 2008, Keereweer et al. 2011).

4.3 Zwei auf Onkosomen-basierte Immunisierungs-Methoden zur Generierung neuer Tumor-reaktiver monoklonaler Antikörper

Es ist ein für Tumorzellen typisches Phänomen, Proteine, die in normalen Zellen nur intrazellulär vorkommen, an oder in der Zellmembran zu lokalisieren (Weidle et al. 2011). Mikrovesikel aus Tumorzellen tragen daher einige dieser Proteine auf ihrer Oberfläche. Zusätzlich befinden sich in der Membran von Mikrovesikeln viele Proteine, die in den Zellen überexprimiert werden. Das belegen auch die durch eine Immunisierung mit Mikrovesikeln generierten und in dieser Arbeit beschriebenen Antikörper. Alle diese Antikörper erkennen Tumor-assoziierte Integrine oder Chaperone, deren Überexpression meist einen negativen prognostischen klinischen Marker darstellt.

Tabelle 4.1 bietet eine Übersicht über die identifizierten Antigene. Alle sechs identifizierten Antikörper erkennen bekannte Tumor-assoziierte Antigene, zu denen aktiv vor-klinische und klinische Forschung betrieben wird. Sie sind besonders stark auf Tumortypen exprimiert, von denen auch die Zelllinien und Mikrovesikel stammten, die für die Immunisierungen verwendet wurden. Außerdem erkannten alle Antikörper offenbar ihr Antigen konformationsspezifisch, da sie sich sehr gut zur durchflusszytometrischen Analyse eigneten, während sie denaturiertes Protein nicht erkannten (Daten nicht gezeigt).

Besonders in Melanomzellen wurden zahlreiche Adhäsionsmoleküle, wie α_v -, α_3 - und β_3 -Integrin und MelCAM stark überexprimiert, was ihre große Bedeutung für Melanomzellen widerspiegelt (Melnikova and Bar-Eli 2006). Integrine bilden Heterodimere aus α - und β -Integrinen, deren Funktion wie die Bindung verschiedener Liganden, von der Kombination der verschiedenen Untereinheiten abhängt. Da die Kombination des α_v -Integrins mit verschiedenen β -Integrinen bestimmt, ob eine Zelle in einer bestimmten Tumor-Mikroumgebung adhären kann, ist deren Funktion insbesondere während der angiogenen Umgestaltung des Gewebes essenziell (Weis and Cheresh 2011a).

Tab. 4.1 Klinisch relevante Tumor-assoziierte Antigene, die von Tumor-reaktiven Antikörpern aus der reversen Immunisierungsmethode erkannt werden

Antikörper-Klon	13C8	3A10	2A4	23E12	12E12	8F2
Immunisierung mit Onkosomen aus Zelllinien	Melanom/ SK Mel23	Melanom/ SK Mel23	Melanom/ SK Mel23	Melanom/ Sr1 Mel	Mesotheliom/ MSTO 211H	Lungenkarzinom/ A549
Identifiziertes Antigen, Synonyme	MeICAM, MCAM, CD146	Integrin $\beta 3$, CD61 oder CD51/CD61	Integrin αV , CD51	Hsp90	14-3-3 ζ	CD49c, VLA-3 α -Kette, Integrin $\alpha 3$
Überexprimiert in genannten Tumorarten	Melanom ¹ , Magenkarzinom ² , Mesotheliom ³ , Ovarkarzinom ⁴ , Mammakarzinom ⁵ nicht-kleinzelliges Lungenkarzinom ⁶	Melanom, Mamma-, Pankreas-, Ovar-, Zervixkarzinom, Glioblastom ^{7,8}	Verschiedene Krebsarten besonders in Kombination mit $\beta 3$, $\beta 5$, $\beta 6$ und $\beta 1$ ^{7,8}	Mammakarzinom ⁹ , Lungenkarzinom und hämatopoetische Krebsformen ^{10,11}	Mamma ¹² , Lungenkarzinom ¹³ , Kopfhals ¹⁴ , Pankreas-, Kolon-, Ösophagus-, Magenkarzinom, orales Karzinom, Urothelial-, Nierenkarzinom, Gehirntumor (Astrozytom, Meningioma), CML, diffuses großes B-Zell Lymphom, Papillomavirus-induziertes Karzinom ¹⁵	In Kombination mit $\beta 1$ in SCC und in Mammakarzinom ¹⁶
Im Rahmen dieser Arbeit detektierte Expression auf Tumor-Zelllinien	Verschiedene Melanome, versch. Glioblastome, Lungenkarzinom	Verschiedene Melanome, versch. Glioblastome, Lungenkarzinom	Verschiedene Melanome, versch. Glioblastome, Lungenkarzinom	Verschiedene Melanome, Lungenkarzinom, Mammakarzinome, Glioblastom	Mesotheliome, Melanom, Glioblastome, Medulloblastom, Lungenkarzinom	Glioblastome, Mesotheliome, Melanom, Lungenkarzinom
Molekülklasse/Funktion	Zelladhäsion	Integrin, Zelladhäsion, Angiogenese	Integrin, Zelladhäsion, Angiogenese	Chaperon	Regulation anderer (onkogener) Proteine durch Bindung an phosphorylierte Serin/Threonin-Bindungsstellen	Integrin, Zelladhäsion
Tumor-Biomarker/Prognose	Schlechte Prognose ^{1,2,3,4,5}	Schlechte Prognose ^{7,8}	Schlechte Prognose ^{7,8} durch Ligand an β -Isoformen 3, 5, 6 und 1	Kein eindeutiger prognostischer Zusammenhang	Schlechte Prognose ^{12,13,14}	Kaum untersucht
Referenzen	1) (Lehmann et al. 1989), 2) (Liu et al. 2012), 3) (Bidlingmaier et al. 2009), 4) (Aldovini et al. 2006), 5) (Zabouo et al. 2009), 6) (Kristiansen et al. 2003), 7) (Desgrosellier and Cheresch 2010), 8) (Weis and Cheresch 2011a), 9) (Calderwood and Gong 2012), 10) (Joly et al. 2010), 11) (Mjahed et al. 2012), 12) (Neal et al. 2009), 13) (Fan et al. 2007), 14) (Matta et al. 2008), 15) (Neal and Yu 2010), 16) (Subbaram and Dipersio 2011)					

Die Integrine $\alpha 3 \beta 1$ und $\alpha v \beta 3$ z.B. können sogar direkt an verschiedene Isoformen des angiogenen Wachstumsfaktors VEGF binden (Hutchings et al. 2003, Rahman et al. 2005). αv -Integrine, wie $\alpha v \beta 3$ sind außerdem besonders hoch auf angiogenen Endothelzellen exprimiert, nicht aber auf normalen Endothelzellen (Weis and Cheresch 2011a). $\alpha v \beta 3$ -Integrin ist also eine besonders attraktive Zielstruktur für Therapie und

Diagnostik, da es sowohl auf Tumorzellen als auch auf angiogenen Endothelzellen überexprimiert ist (Weis and Cheresh 2011a) und ihre Inhibition mit der Neoangiogenese interferiert (Tucker 2006, Weis and Cheresh 2011a, Weis and Cheresh 2011b). Die Tatsache, dass aus der reversen Immunisierungsmethode mit Onkosomen hauptsächlich Antikörper gegen Integrine und andere Adhäsionsmoleküle hervorgingen, ist ein Zeichen für deren Überexpression und Immunogenität.

Dem Hsp90-spezifischen Antikörper 23E12 könnte neben therapeutischen und diagnostischen Möglichkeiten noch eine zusätzliche Bedeutung zukommen. Da Hsp90 auf der Oberfläche vieler Tumoren und auf Mikrovesikeln verschiedenster Art vorhanden ist, könnte es sich auch für die affinitätschromatographische Aufreinigung von Exosomen eignen. Eine solche Fraktionierung könnte helfen zu klären, welche verschiedenen Vesikel-Subtypen in Onkosomen-Präparationen oder auch in Patientenmaterialien wie Seren vorhanden sind, welche für die hohe Immunogenität der Onkosomen verantwortlich sind und welche verschiedenen immunologischen Funktionen diese Subtypen besitzen.

Wie eingangs erläutert sind viele intrazelluläre Proteine auf den Zytoplasmamembranen von Tumorzellen vorhanden. Hierzu zählt offenbar auch 14-3-3 ζ , ein Protein, das normalerweise im Zytoplasma und im Zellkern zu finden ist. Dort kann 14-3-3 ζ als Homo- oder Heterodimer mit anderen 14-3-3-Isoformen an Zielproteine binden und durch Induktion ihrer Phosphorylierung an Serin bzw. Threonin oder eine Konformationsänderung auch wichtige karzinogene Prozesse regulieren (van Hemert et al. 2004). 14-3-3 ζ ist also, wie alle anderen in dieser Arbeit identifizierten Proteine, als Tumor-assoziiertes Marker bekannt. Die Überexpression in Mammakarzinom-Zelllinien fördert kontaktunabhängiges Wachstum und inhibiert Stress-induzierte Apoptose, wohingegen die Herunterregulierung von 14-3-3 ζ entgegengesetzte Effekte hat und das Tumorstadium in vivo reduziert (Neal and Yu 2010).

Durch die reverse Immunisierungsmethode konnte ich erstmals eine Oberflächenexpression des 14-3-3 ζ -Proteins auf verschiedenen Tumor-Zelllinien nachweisen. Dieses höchst unerwartete Ergebnis kam durch die Erkennung und Präzipitation durch den 12E12-Antikörper zustande. Um dieses hoch-interessante Ergebnis zu bestätigen, sind, trotz der 55 %-igen und damit außerordentlich hohen Sequenzabdeckung bei der massenspektrometrischen Identifizierung des Zielantigens, weitere Experimente geplant, um die Spezifität des Antikörpers eindeutig zu bestimmen. Im Falle einer positiven Bestätigung wäre dies die Erstbeschreibung eines neuen Tumor-assoziierten membranständigen Antigens, das auch eine bisher unbekannte Funktion dieses Proteins in der Zellmembran nahelegt.

Die erfolgreiche Generierung von monoklonalen Antikörpern gegen die CA IX mittels

der in dieser Arbeit etablierten zielgerichteten Onkosomen-Immunisierungs-Methode zeigte schließlich, dass sich Onkosomen nicht nur für die Generierung tumorreaktiver und konformationsspezifischer Antikörper durch die reverse Immunisierungsmethode eignen, sondern dass auch eine gezielte Generierung von Antikörpern bekannter Spezifität möglich ist. Dabei könnte sich diese Art der Immunisierung als geeignet dafür erweisen, sonst nur schwer zu erhaltende funktionelle Antikörper zu etablieren. Darüber hinaus könnte einer dieser CA IX-gerichteten Antikörper, wie auch der 6A10-Antikörper, eine inhibitorische Wirkung auf die Aktivität der CA IX haben. Dies würde unsere Antikörper besonders attraktiv für eine zielgerichtete CA-spezifische Therapie machen.

5 ZUSAMMENFASSUNG

In dieser Arbeit wurden Mikrovesikel, die von Tumor-Zelllinien in hohen Konzentrationen sekretiert wurden, zur Immunisierung von Ratten verwendet, um auf diese Weise monoklonale Antikörper gegen membranständige Proteine zu generieren, die auf Tumorzellen vorhanden sind. Der Grund für diesen Ansatz ist, dass Mikrovesikel verschiedenste Membranproteine enthalten, die in Tumorzellen in hohem Maße exprimiert werden. Diese Mikrovesikel sind etwa hundertfach kleiner als die Zellen, denen sie entstammen und daher deutlich weniger komplex. Gleichzeitig enthalten sie aber überproportional viele Membranproteine. Viele, aber nicht alle dieser Proteine sind in der Onkologie und Tumorimmunologie bereits als Tumor-assoziierte Antigene bekannt, weshalb diese Mikrovesikel hier als Onkosomen bezeichnet werden. Es hat sich herausgestellt, dass sich Onkosomen hervorragend zur Immunisierung verwenden lassen und durch ihre Immunogenität die Möglichkeit bieten, monoklonale Antikörper gegen zunächst unbekannte, aber onkologisch relevante Membranproteine zu generieren.

Aus solchen Immunisierungen war in der Arbeitsgruppe der Antikörper 6A10 hervorgegangen, der mit hoher Spezifität und Effizienz die Tumor-assoziierte Carboanhydrase XII (CA XII) erkennt und inhibiert. CA XII ist ein membranständiges Enzym, das auf einer Vielzahl hypoxischer Tumoren exprimiert ist und für die Homöostase des leicht alkalischen intrazellulären pH-Wertes vieler Tumorzellen entscheidend ist. Mit dem inhibitorischen Antikörper 6A10 konnte ich in dieser Arbeit zeigen, dass eine spezifische Hemmung der CA XII-Enzymaktivität zu einem verzögerten Wachstum dreidimensionaler Tumorzellverbände *in vitro* und *in vivo* führt. Bei den *in-vivo*-Versuchen konnte ich dabei das Wachstum von Luziferase-exprimierenden Tumoren in immundefekten NSG-Mäusen durch Biolumineszenz-basierte Bildgebung (BLI) über lange Zeiträume exakt verfolgen und quantifizieren. Mittels Fluoreszenz-basierter Bildgebung konnte ich zudem die spezifische Bindung eines 6A10-Infrarotfarbstoff-Konjugates an Tumorzellen *in vivo* visualisieren. Da es zuvor keinen spezifischen Inhibitor gegen die CA XII gab, waren dies die ersten Untersuchungen, die speziell die CA XII als Zielstruktur behandelten und für die klinische Onkologie als relevantes Tumor-assoziiertes Antigen validieren konnten.

In einem zweiten Teil meiner Arbeit ermittelte ich die Spezifität weiterer Tumor-reaktiver Antikörper, die aus Immunisierungen mit Onkosomen hervorgegangen sind. Diese Antikörper erkannten nativ gefaltete Antigene auf der Oberfläche von Tumorzellen und könnten zur Beantwortung verschiedener onkologischer Fragestellungen Verwendung finden. Neben dieser unspezifischen „reversen“ Immunisierungsmethode, verwendete ich Onkosomen erfolgreich auch zur gezielten Generierung von Antikörpern gegen ein definiertes membranständiges Protein, die humane Carboanhydrase IX. Die CA IX ist ein weiteres bekanntes membranständiges Tumor-assoziiertes Antigen, das oft mit der Carboanhydrase XII auf invasiven soliden Tumoren koexprimiert ist. Damit konnte ich belegen, dass sich Mikrovesikel nicht nur für die Generierung neuartiger Tumor-reaktiver Antikörper, sondern auch für die Entwicklung von Antikörpern gegen ein Molekül der Wahl eignen. Die Immunisierung mit nativ gefalteten Proteinen im Kontext immunogener Mikrovesikel könnte sich zukünftig als Möglichkeit zur Generierung von Antikörpern erweisen, die mit klassischen Immunisierungsmethode nicht oder nur schwer zu erhalten sind.

SUMMARY

Tumours and established tumour cell lines constitutively secrete high amounts of microvesicles (MVs) less than 200 nm in diameter. These vesicles display various proteins in their membranes, which are frequently found to be strongly upregulated in the cells of origin. MVs used in this work are roughly a hundred times smaller than cells and less complex because they contain predominantly membrane-bound proteins, many of them being well known to oncologists and tumour immunologists as tumour-associated antigens. Therefore, these particles are hereinafter referred to as oncosomes. Previous work of our group has identified oncosomes derived from different tumour cell lines as excellent tools for immunizations aiming at the generation of monoclonal antibodies against initially unknown, but oncologically relevant proteins.

A monoclonal antibody (6A10) that specifically inhibits CA XII activity was recently generated in my group with the help of such microvesicles. In this work, using the 6A10 antibody, I was able to demonstrate that blocking CA XII-enzyme activity interferes with the growth of three-dimensional tumour cell clusters both *in vitro* and *in vivo*. In severely immunocompromised NSG mice, the growth rates of luciferase-expressing tumor xenografts were monitored and precisely quantified by whole-body bioluminescence-based imaging (BLI) over the entire duration of the experiment. Additionally, specific binding of 6A10 conjugated to an infrared dye to tumour cells *in vivo* was visualized by means of fluorescence-based imaging.

Because no specific inhibitor of CA XII was available so far, this work represents the first study on CA XII as a target for an immunotherapeutic intervention, proving the enzyme as a relevant tumour-associated antigen for clinical oncology.

As a second project, I made use of the unique composition and high immunogenicity of oncosomes in that I utilized them as tools for the generation of new tumour-reactive monoclonal antibodies, which I subsequently characterized and determined the specificities of some of them using immunoprecipitations and mass spectrometry. Interestingly, the majority of antibodies obtained from immunizations recognized natively folded protein antigens, which were found to be strongly expressed on the surface of a variety of tumour cell lines and thus may find use in diagnostic or even therapeutic approaches.

Besides their application in this rather random immunization strategy, I successfully used recombinant oncosomes for the targeted generation of antibodies against a particular protein (membrane-associated carbonic anhydrase IX). Here, CA IX was chosen as a membrane-tethered tumour-associated antigen, which is often co-expressed

alongside with carbonic anhydrase XII on various invasive solid cancers types. CA IX is another membrane-bound enzyme expressed on a variety of hypoxic tumours and critical to the homeostasis of the slightly alkaline intracellular pH of many tumour cells.

This approach proves that microvesicles not only are suitable for the identification of novel tumour-reactive antigens and generation of antibodies, but also for selective production of antibodies specific to a molecule of choice. Thus, microvesicles engineered to carry a specific protein as natively folded immunogen can be used to generate antibodies with particular features, i.e. recognition of proteins in their native tertiary structure – a prerequisite for functional antibodies.

6 ANHANG

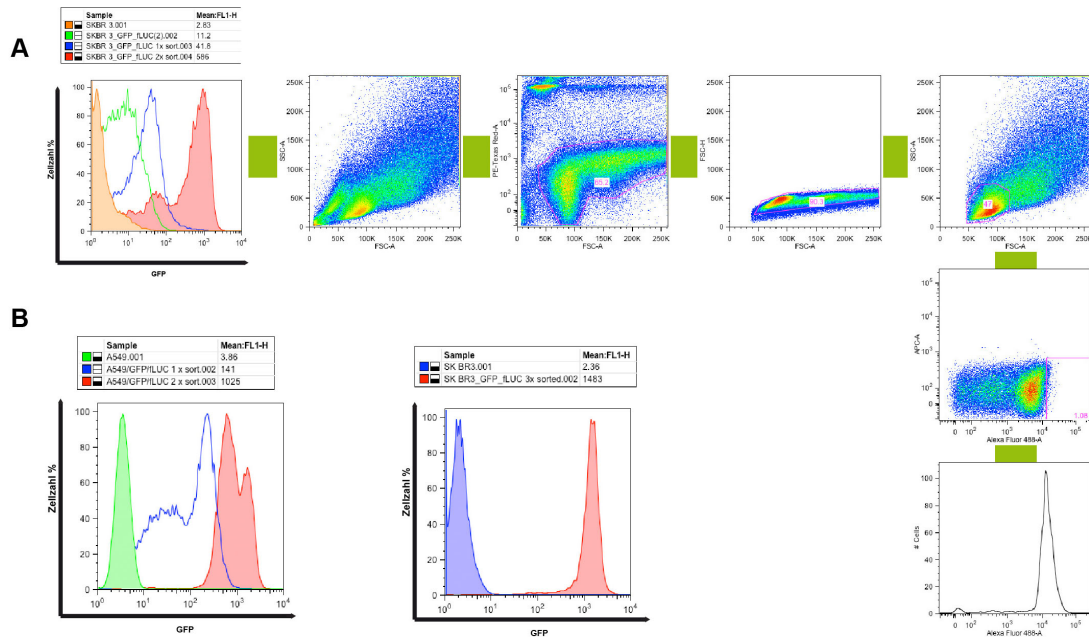


Abb. 6.1 Starke Anreicherung der Firefly-Luziferase-exprimierenden Zellen durch Zell-Sortierungen zweier CA XII-positiver Zelllinien für zukünftige Experimente

(A) Von links nach rechts (Zunahme der Expression des Reportergens GFP) sind Histogramme der untransduzierten, transduzierten, einmalig sortierten und zweimalig sortierten SKBR3-Zellen abgebildet. Die jeweils linke Population wurde expandiert und in die Sortierung eingesetzt bis das rote Histogramm erhalten wurde. Diese Population wurde erneut expandiert und in eine dritte Sortierung eingesetzt um die am stärksten GFP-exprimierenden SKBR3/GFP/fLUC-Zellen anzureichern. Beispielfhaft für alle Sortierungen sind entlang des grünen Streifens von links nach rechts unten, alle Schritte eingeblendet um die gewünschte Population einzugrenzen. Das letzte Histogramm stellt eine Reanalyse der erhaltenen Population unmittelbar nach erfolgter Sortierung dar. (B) Die jeweils roten Histogramme stellen das Endergebnis nach erfolgter Expansion dar. Links A549/GFP/fLUC nach 2 Sortierungen. Rechts SKBR3/GFP/fLUC nach 3 Sortierungen.

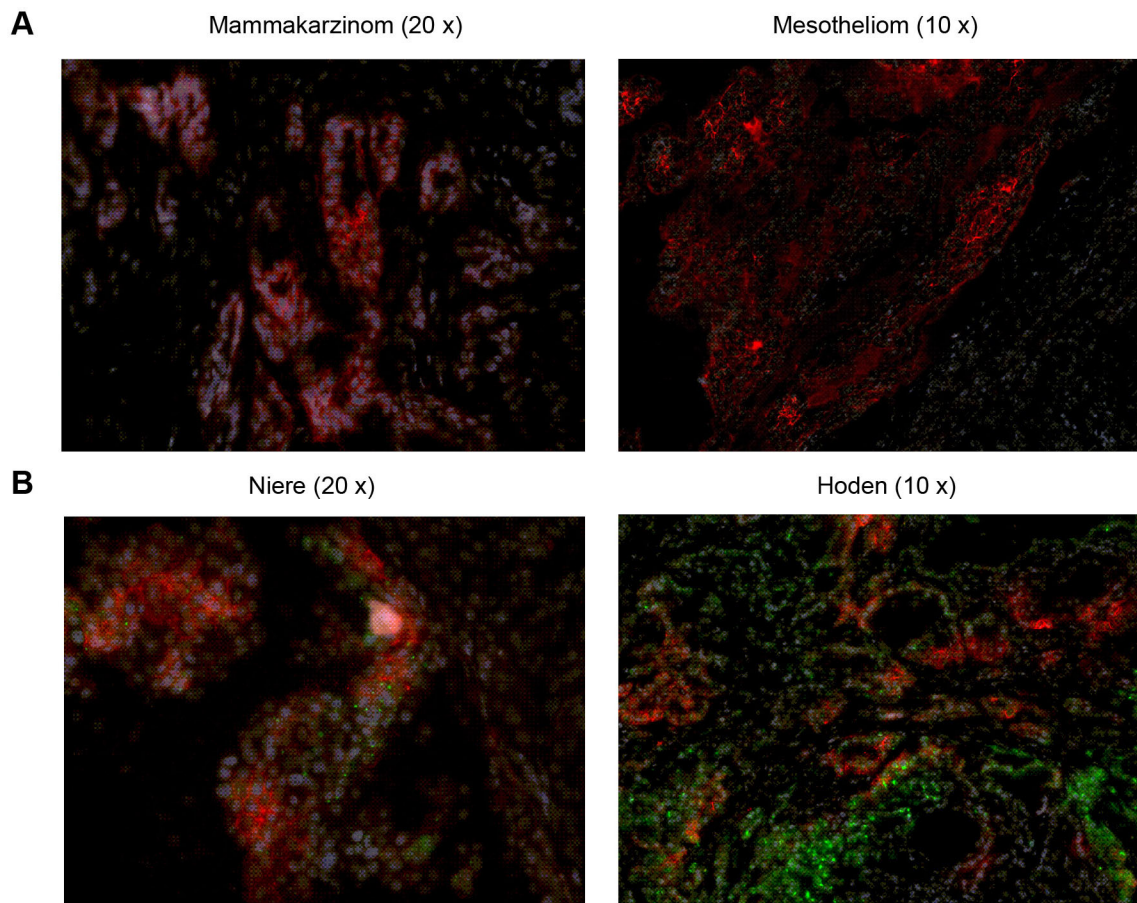


Abb. 6.2 Immunfluoreszenz-Aufnahmen von CA XII-exprimierenden Geweben

(A) Gefrierschnitte von humanen Geweben (Mammarkarzinom und Mesotheliom) wurden mit 6A10 und einem Cy3-konjugierten anti-Ratten-Antikörper visualisiert. **(B)** Gefrierschnitte von Nieren- und Hodengewebe aus männlichen Ratten des Tierversuch 3 (A549/GFP/gLUC) der Gruppe B, die wöchentlich mit 100 µg 6A10 behandelt worden war, wurden nur mit einem Cy3-konjugierten anti-Ratten-Antikörper inkubiert um die Gewebedurchdringung des 6A10 zu visualisieren. Aufnahmen erstellt von Ulrike Buchholz, Institut für Pathologie, HMGU Neuherberg

7 LITERATURVERZEICHNIS

Aktipis, C. A., V. S. Kwan, K. A. Johnson, S. L. Neuberg and C. C. Maley (2011). "Overlooking evolution: a systematic analysis of cancer relapse and therapeutic resistance research." PLoS One **6**(11): e26100.

Aldovini, D., F. Demichelis, C. Doglioni, D. Di Vizio, E. Galligioni, S. Brugnara, B. Zeni, C. Griso, C. Pegoraro, M. Zannoni, M. Gariboldi, E. Balladore, D. Mezzanzanica, S. Canevari and M. Barbareschi (2006). "M-CAM expression as marker of poor prognosis in epithelial ovarian cancer." Int J Cancer **119**(8): 1920-1926.

Alterio, V., M. Hilvo, A. Di Fiore, C. T. Supuran, P. Pan, S. Parkkila, A. Scaloni, J. Pastorek, S. Pastorekova, C. Pedone, A. Scozzafava, S. M. Monti and G. De Simone (2009). "Crystal structure of the catalytic domain of the tumor-associated human carbonic anhydrase IX." Proc Natl Acad Sci U S A **106**(38): 16233-16238.

Andreola, G., L. Rivoltini, C. Castelli, V. Huber, P. Perego, P. Deho, P. Squarcina, P. Accornero, F. Lozupone, L. Lugini, A. Stringaro, A. Molinari, G. Arancia, M. Gentile, G. Parmiani and S. Fais (2002). "Induction of lymphocyte apoptosis by tumor cell secretion of FasL-bearing microvesicles." J Exp Med **195**(10): 1303-1316.

Aswathy, R. G., Y. Yoshida, T. Maekawa and D. S. Kumar (2010). "Near-infrared quantum dots for deep tissue imaging." Anal Bioanal Chem **397**(4): 1417-1435.

Barnett, D. H., S. Sheng, T. H. Charn, A. Waheed, W. S. Sly, C. Y. Lin, E. T. Liu and B. S. Katzenellenbogen (2008). "Estrogen receptor regulation of carbonic anhydrase XII through a distal enhancer in breast cancer." Cancer Res **68**(9): 3505-3515.

Bartosova, M., S. Parkkila, K. Pohlodek, T. J. Karttunen, S. Galbavy, V. Mucha, A. L. Harris, J. Pastorek and S. Pastorekova (2002). "Expression of carbonic anhydrase IX in breast is associated with malignant tissues and is related to overexpression of c-erbB2." J Pathol **197**(3): 314-321.

Baselga, J. (2001). "Phase I and II clinical trials of trastuzumab." Ann Oncol **12 Suppl 1**: S49-55.

Baselga, J., L. Norton, J. Albanell, Y. M. Kim and J. Mendelsohn (1998). "Recombinant humanized anti-HER2 antibody (Herceptin) enhances the antitumor activity of paclitaxel and doxorubicin against HER2/neu overexpressing human breast cancer xenografts." Cancer Res **58**(13): 2825-2831.

Battke, C., E. Kremmer, J. Mysliwicz, G. Gondi, C. Dumitru, S. Brandau, S. Lang, D. Vullo, C. Supuran and R. Zeidler (2011). "Generation and characterization of the first inhibitory antibody targeting tumour-associated carbonic anhydrase XII." Cancer Immunol Immunother **60**(5): 649-658.

Bauvois, B. (2012). "New facets of matrix metalloproteinases MMP-2 and MMP-9 as cell surface transducers: outside-in signaling and relationship to tumor progression." Biochim Biophys Acta **1825**(1): 29-36.

Berg, J. M., J. L. Tymoczko and L. Stryer (2003). Biochemie. Heidelberg u.a., Spektrum.

Bertout, J. A., S. A. Patel and M. C. Simon (2008). "The impact of O₂ availability on human cancer." Nat Rev Cancer **8**(12): 967-975.

Bidlingmaier, S., J. He, Y. Wang, F. An, J. Feng, D. Barbone, D. Gao, B. Franc, V. C. Broaddus and B. Liu (2009). "Identification of MCAM/CD146 as the target antigen of a human monoclonal antibody that recognizes both epithelioid and sarcomatoid types of mesothelioma." Cancer Res **69**(4): 1570-1577.

Bobrie, A., M. Colombo, G. Raposo and C. Thery (2011). "Exosome secretion: molecular mechanisms and roles in immune responses." Traffic **12**(12): 1659-1668.

Bonner, J. A., P. M. Harari, J. Giralt, N. Azarnia, D. M. Shin, R. B. Cohen, C. U. Jones, R. Sur, D. Raben, J. Jassem, R. Ove, M. S. Kies, J. Baselga, H. Youssoufian, N. Amellal, E. K. Rowinsky and K. K. Ang (2006). "Radiotherapy plus cetuximab for squamous-cell carcinoma of the head and neck." N Engl J Med **354**(6): 567-578.

Brown, J. M. (2007). "Tumor hypoxia in cancer therapy." Methods Enzymol **435**: 297-321.

Cairns, J. (1975). "Mutation selection and the natural history of cancer." Nature **255**(5505): 197-200.

Calcinotto, A., P. Filipazzi, M. Grioni, M. Iero, A. De Milito, A. Ricupito, A. Cova, R. Canese, E. Jachetti, M. Rossetti, V. Huber, G. Parmiani, L. Generoso, M. Santinami, M. Borghi, S. Fais, M. Bellone and L. Rivoltini (2012). "Modulation of microenvironment acidity reverses anergy in human and murine tumor-infiltrating T lymphocytes." Cancer Res **72**(11): 2746-2756.

Calderwood, S. K. and J. Gong (2012). "Molecular chaperones in mammary cancer growth and breast tumor therapy." J Cell Biochem **113**(4): 1096-1103.

Cardone, R. A., V. Casavola and S. J. Reshkin (2005). "The role of disturbed pH dynamics and the Na⁺/H⁺ exchanger in metastasis." Nat Rev Cancer **5**(10): 786-795.

Chen, C., J. Skog, C. H. Hsu, R. T. Lessard, L. Balaj, T. Wurdinger, B. S. Carter, X. O. Breakefield, M. Toner and D. Irimia (2010). "Microfluidic isolation and transcriptome analysis of serum microvesicles." Lab Chip **10**(4): 505-511.

Chen, J., C. Rocken, J. Hoffmann, S. Kruger, U. Lendeckel, A. Rocco, S. Pastorekova, P. Malfertheiner and M. P. Ebert (2005). "Expression of carbonic anhydrase 9 at the invasion front of gastric cancers." Gut **54**(7): 920-927.

Chen, X., Y. Ba, L. Ma, X. Cai, Y. Yin, K. Wang, J. Guo, Y. Zhang, J. Chen, X. Guo, Q. Li, X. Li, W. Wang, Y. Zhang, J. Wang, X. Jiang, Y. Xiang, C. Xu, P. Zheng, J. Zhang, R. Li, H. Zhang, X. Shang, T. Gong, G. Ning, J. Wang, K. Zen, J. Zhang and C. Y. Zhang (2008). "Characterization of microRNAs in serum: a novel class of biomarkers for diagnosis of cancer and other diseases." Cell Res **18**(10): 997-1006.

Chen, Y. and L. Hu (2009). "Design of anticancer prodrugs for reductive activation." Med Res Rev **29**(1): 29-64.

Chiche, J., M. C. Brahimi-Horn and J. Pouyssegur (2010a). "Tumour hypoxia induces a metabolic shift causing acidosis: a common feature in cancer." J Cell Mol Med **14**(4): 771-794.

Chiche, J., K. Ilc, M. C. Brahimi-Horn and J. Pouyssegur (2010b). "Membrane-bound carbonic anhydrases are key pH regulators controlling tumor growth and cell migration." Adv Enzyme Regul **50**(1): 20-33.

Chiche, J., K. Ilc, J. Laferriere, E. Trottier, F. Dayan, N. M. Mazure, M. C. Brahimi-Horn and J. Pouyssegur (2009). "Hypoxia-inducible carbonic anhydrase IX and XII promote tumor cell growth by counteracting acidosis through the regulation of the intracellular pH." Cancer Res **69**(1): 358-368.

Clayton, A., J. P. Mitchell, J. Court, S. Linnane, M. D. Mason and Z. Tabi (2008). "Human tumor-derived exosomes down-modulate NKG2D expression." J Immunol **180**(11): 7249-7258.

Clayton, A., J. P. Mitchell, J. Court, M. D. Mason and Z. Tabi (2007). "Human tumor-derived exosomes selectively impair lymphocyte responses to interleukin-2." Cancer Res **67**(15): 7458-7466.

Cocucci, E., G. Racchetti and J. Meldolesi (2009). "Shedding microvesicles: artefacts no more." Trends Cell Biol **19**(2): 43-51.

Contag, C. H., D. Jenkins, P. R. Contag and R. S. Negrin (2000). "Use of reporter genes for optical measurements of neoplastic disease in vivo." Neoplasia **2**(1-2): 41-52.

Counillon, L. and J. Pouyssegur (2000). "The expanding family of eucaryotic Na(+)/H(+) exchangers." J Biol Chem **275**(1): 1-4.

Curran, D., J. Giralt, P. M. Harari, K. K. Ang, R. B. Cohen, M. S. Kies, J. Jassem, J. Baselga, E. K. Rowinsky, N. Amellal, S. Comte and J. A. Bonner (2007). "Quality of life in head and neck cancer patients after treatment with high-dose radiotherapy alone or in combination with cetuximab." J Clin Oncol **25**(16): 2191-2197.

D'Ambrosio, K., R. M. Vitale, J. M. Dogne, B. Masereel, A. Innocenti, A. Scozzafava, G. De Simone and C. T. Supuran (2008). "Carbonic anhydrase inhibitors: bioreductive nitro-containing sulfonamides with selectivity for targeting the tumor associated isoforms IX and XII." J Med Chem **51**(11): 3230-3237.

D'Asti, E., D. Garnier, T. H. Lee, L. Montermini, B. Meehan and J. Rak (2012). "Oncogenic extracellular vesicles in brain tumor progression." Front Physiol **3**: 294.

De Simone, G. and C. T. Supuran (2010). "Carbonic anhydrase IX: Biochemical and crystallographic characterization of a novel antitumor target." Biochim Biophys Acta **1804**(2): 404-409.

De Simone, G., R. M. Vitale, A. Di Fiore, C. Pedone, A. Scozzafava, J. L. Montero, J. Y. Winum and C. T. Supuran (2006). "Carbonic anhydrase inhibitors: Hypoxia-activatable sulfonamides incorporating disulfide bonds that target the tumor-associated isoform IX." J Med Chem **49**(18): 5544-5551.

Demko, S., J. Summers, P. Keegan and R. Pazdur (2008). "FDA drug approval summary: alemtuzumab as single-agent treatment for B-cell chronic lymphocytic leukemia." Oncologist **13**(2): 167-174.

Desgrosellier, J. S. and D. A. Cheresh (2010). "Integrins in cancer: biological implications and therapeutic opportunities." Nat Rev Cancer **10**(1): 9-22.

Desjarlais, J. R. and G. A. Lazar (2011). "Modulation of antibody effector function." Exp Cell Res **317**(9): 1278-1285.

Doyen, J., S. K. Parks, S. Marcie, J. Pouyssegur and J. Chiche (2012). "Knock-down of hypoxia-induced carbonic anhydrases IX and XII radiosensitizes tumor cells by increasing intracellular acidosis." Front Oncol **2**: 199.

Fan, T., R. Li, N. W. Todd, Q. Qiu, H. B. Fang, H. Wang, J. Shen, R. Y. Zhao, N. P. Caraway, R. L. Katz, S. A. Stass and F. Jiang (2007). "Up-regulation of 14-3-3zeta in lung cancer and its implication as prognostic and therapeutic target." Cancer Res **67**(16): 7901-7906.

Ferrajoli, A., S. O'Brien and M. J. Keating (2001). "Alemtuzumab: a novel monoclonal antibody." Expert Opin Biol Ther **1**(6): 1059-1065.

Franklin, I. and R. C. Lewontin (1970). "Is the gene the unit of selection?" Genetics **65**(4): 707-734.

Friedrich, J., R. Ebner and L. A. Kunz-Schughart (2007). "Experimental anti-tumor therapy in 3-D: spheroids--old hat or new challenge?" Int J Radiat Biol **83**(11-12): 849-871.

Gatenby, R. A. and R. J. Gillies (2004). "Why do cancers have high aerobic glycolysis?" Nat Rev Cancer **4**(11): 891-899.

Gatenby, R. A. and R. J. Gillies (2008). "A microenvironmental model of carcinogenesis." Nat Rev Cancer **8**(1): 56-61.

Gerlinger, M. and C. Swanton (2010). "How Darwinian models inform therapeutic failure initiated by clonal heterogeneity in cancer medicine." Br J Cancer **103**(8): 1139-1143.

Giatromanolaki, A., M. I. Koukourakis, E. Sivridis, J. Pastorek, C. C. Wykoff, K. C. Gatter and A. L. Harris (2001). "Expression of hypoxia-inducible carbonic anhydrase-9 relates to angiogenic pathways and independently to poor outcome in non-small cell lung cancer." Cancer Res **61**(21): 7992-7998.

Gieling, R. G. and K. J. Williams (2012). "Carbonic anhydrase IX as a target for metastatic disease." Bioorg Med Chem.

Gigante, M., G. Li, C. Ferlay, D. Perol, E. Blanc, S. Paul, A. Zhao, J. Tostain, B. Escudier, S. Negrier and C. Genin (2012). "Prognostic Value of Serum CA9 in Patients with Metastatic Clear Cell Renal Cell Carcinoma under Targeted Therapy." Anticancer Res **32**(12): 5447-5451.

Gillies, R. J., I. Robey and R. A. Gatenby (2008). "Causes and consequences of increased glucose metabolism of cancers." J Nucl Med **49 Suppl 2**: 24S-42S.

Gillies, R. J., D. Verduzco and R. A. Gatenby (2012). "Evolutionary dynamics of carcinogenesis and why targeted therapy does not work." Nat Rev Cancer **12**(7): 487-493.

Giusti, R. M., M. H. Cohen, P. Keegan and R. Pazdur (2009). "FDA review of a panitumumab (Vectibix) clinical trial for first-line treatment of metastatic colorectal cancer." Oncologist **14**(3): 284-290.

Giusti, R. M., K. A. Shastri, M. H. Cohen, P. Keegan and R. Pazdur (2007). "FDA drug approval summary: panitumumab (Vectibix)." Oncologist **12**(5): 577-583.

Glunde, K., S. E. Guggino, M. Solaiyappan, A. P. Pathak, Y. Ichikawa and Z. M. Bhujwalla (2003). "Extracellular acidification alters lysosomal trafficking in human breast cancer cells." Neoplasia **5**(6): 533-545.

Grabmaier, K., A. d. W. MC, G. W. Verhaegh, J. A. Schalken and E. Oosterwijk (2004). "Strict regulation of CAIX(G250/MN) by HIF-1alpha in clear cell renal cell carcinoma." Oncogene **23**(33): 5624-5631.

Grivennikov, S. I., F. R. Greten and M. Karin (2010). "Immunity, inflammation, and cancer." Cell **140**(6): 883-899.

Guler, O. O., G. De Simone and C. T. Supuran (2010). "Drug design studies of the novel antitumor targets carbonic anhydrase IX and XII." Curr Med Chem **17**(15): 1516-1526.

Haapasalo, J., M. Hilvo, K. Nordfors, H. Haapasalo, S. Parkkila, A. Hyrskyluoto, I. Rantala, A. Waheed, W. S. Sly, S. Pastorekova, J. Pastorek and A. K. Parkkila (2008). "Identification of an alternatively spliced isoform of carbonic anhydrase XII in diffusely infiltrating astrocytic gliomas." Neuro Oncol **10**(2): 131-138.

Hagen, H., P. Marzenell, E. Jentsch, F. Wenz, M. R. Veldwijk and A. Mokhir (2012). "Aminoferrocene-based prodrugs activated by reactive oxygen species." J Med Chem **55**(2): 924-934.

Hanahan, D. (1983). "Studies on transformation of Escherichia coli with plasmids." J Mol Biol **166**(4): 557-580.

Hanahan, D. and R. A. Weinberg (2011). "Hallmarks of cancer: the next generation." Cell **144**(5): 646-674.

Harguindeguy, S., J. L. Arranz, M. L. Wahl, G. Orive and S. J. Reshkin (2009). "Proton transport inhibitors as potentially selective anticancer drugs." Anticancer Res **29**(6):

2127-2136.

Hilvo, M., L. Baranauskiene, A. M. Salzano, A. Scaloni, D. Matulis, A. Innocenti, A. Scozzafava, S. M. Monti, A. Di Fiore, G. De Simone, M. Lindfors, J. Janis, J. Valjakka, S. Pastorekova, J. Pastorek, M. S. Kulomaa, H. R. Nordlund, C. T. Supuran and S. Parkkila (2008). "Biochemical characterization of CA IX, one of the most active carbonic anhydrase isozymes." *J Biol Chem* **283**(41): 27799-27809.

Hsieh, M. J., K. S. Chen, H. L. Chiou and Y. S. Hsieh (2010). "Carbonic anhydrase XII promotes invasion and migration ability of MDA-MB-231 breast cancer cells through the p38 MAPK signaling pathway." *Eur J Cell Biol* **89**(8): 598-606.

Hulikova, A., R. D. Vaughan-Jones and P. Swietach (2011). "Dual role of CO₂/HCO₃⁻ buffer in the regulation of intracellular pH of three-dimensional tumor growths." *J Biol Chem* **286**(16): 13815-13826.

Hurwitz, H. (2004). "Integrating the anti-VEGF-A humanized monoclonal antibody bevacizumab with chemotherapy in advanced colorectal cancer." *Clin Colorectal Cancer* **4 Suppl 2**: S62-68.

Hutchings, H., N. Ortega and J. Plouet (2003). "Extracellular matrix-bound vascular endothelial growth factor promotes endothelial cell adhesion, migration, and survival through integrin ligation." *FASEB J* **17**(11): 1520-1522.

Hynninen, P., L. Vaskivuo, J. Saarnio, H. Haapasalo, J. Kivela, S. Pastorekova, J. Pastorek, A. Waheed, W. S. Sly, U. Puistola and S. Parkkila (2006). "Expression of transmembrane carbonic anhydrases IX and XII in ovarian tumours." *Histopathology* **49**(6): 594-602.

Ilie, M. I., V. Hofman, C. Ortholan, R. E. Ammadi, C. Bonnetaud, K. Havet, N. Venissac, J. Mouroux, N. M. Mazure, J. Pouyssegur and P. Hofman (2011). "Overexpression of carbonic anhydrase XII in tissues from resectable non-small cell lung cancers is a biomarker of good prognosis." *Int J Cancer* **128**(7): 1614-1623.

Ito, M., H. Hiramatsu, K. Kobayashi, K. Suzue, M. Kawahata, K. Hioki, Y. Ueyama, Y. Koyanagi, K. Sugamura, K. Tsuji, T. Heike and T. Nakahata (2002). "NOD/SCID/gamma(c)(null) mouse: an excellent recipient mouse model for engraftment of human cells." *Blood* **100**(9): 3175-3182.

Ivanov, S., S. Y. Liao, A. Ivanova, A. Danilkovitch-Miagkova, N. Tarasova, G. Weirich, M. J. Merrill, M. A. Proescholdt, E. H. Oldfield, J. Lee, J. Zavada, A. Waheed, W. Sly, M. I. Lerman and E. J. Stanbridge (2001). "Expression of hypoxia-inducible cell-surface transmembrane carbonic anhydrases in human cancer." *Am J Pathol* **158**(3): 905-919.

Jarvela, S., S. Parkkila, H. Bragge, M. Kahkonen, A. K. Parkkila, Y. Soini, S. Pastorekova, J. Pastorek and H. Haapasalo (2008). "Carbonic anhydrase IX in oligodendroglial brain tumors." *BMC Cancer* **8**: 1.

Jefferis, R. (2009). "Glycosylation as a strategy to improve antibody-based therapeutics." *Nat Rev Drug Discov* **8**(3): 226-234.

Joly, A. L., G. Wettstein, G. Mignot, F. Ghiringhelli and C. Garrido (2010). "Dual role of

heat shock proteins as regulators of apoptosis and innate immunity." J Innate Immun **2**(3): 238-247.

Jones, S., W. D. Chen, G. Parmigiani, F. Diehl, N. Beerenwinkel, T. Antal, A. Traulsen, M. A. Nowak, C. Siegel, V. E. Velculescu, K. W. Kinzler, B. Vogelstein, J. Willis and S. D. Markowitz (2008). "Comparative lesion sequencing provides insights into tumor evolution." Proc Natl Acad Sci U S A **105**(11): 4283-4288.

Juhasz, M., J. Chen, U. Lendeckel, U. Kellner, H. U. Kasper, Z. Tulassay, S. Pastorekova, P. Malfertheiner and M. P. Ebert (2003). "Expression of carbonic anhydrase IX in human pancreatic cancer." Aliment Pharmacol Ther **18**(8): 837-846.

Keereweer, S., J. D. Kerrebijn, P. B. van Driel, B. Xie, E. L. Kaijzel, T. J. Snoeks, I. Que, M. Hutteman, J. R. van der Vorst, J. S. Mieog, A. L. Vahrmeijer, C. J. van de Velde, R. J. Baatenburg de Jong and C. W. Lowik (2011). "Optical image-guided surgery--where do we stand?" Mol Imaging Biol **13**(2): 199-207.

Kipps, T. J., P. Parham, J. Punt and L. A. Herzenberg (1985). "Importance of immunoglobulin isotype in human antibody-dependent, cell-mediated cytotoxicity directed by murine monoclonal antibodies." J Exp Med **161**(1): 1-17.

Kirkwood, J. M., L. H. Butterfield, A. A. Tarhini, H. Zarour, P. Kalinski and S. Ferrone (2012). "Immunotherapy of cancer in 2012." CA Cancer J Clin **62**(5): 309-335.

Klein, C. A. (2009). "Parallel progression of primary tumours and metastases." Nat Rev Cancer **9**(4): 302-312.

Kobayashi, M., T. Matsumoto, S. Ryuge, K. Yanagita, R. Nagashio, Y. Kawakami, N. Goshima, S. X. Jiang, M. Saegusa, A. Iyoda, Y. Satoh, N. Masuda and Y. Sato (2012). "CAXII Is a sero-diagnostic marker for lung cancer." PLoS One **7**(3): e33952.

Kohler, G. and C. Milstein (1975). "Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity." Nature **256**(5517): 495-497.

Kristiansen, G., Y. Yu, K. Schluns, C. Sers, M. Dietel and I. Petersen (2003). "Expression of the cell adhesion molecule CD146/MCAM in non-small cell lung cancer." Anal Cell Pathol **25**(2): 77-81.

Kuus-Reichel, K., L. S. Grauer, L. M. Karavodin, C. Knott, M. Krusemeier and N. E. Kay (1994). "Will immunogenicity limit the use, efficacy, and future development of therapeutic monoclonal antibodies?" Clin Diagn Lab Immunol **1**(4): 365-372.

Laemmli, U. K. (1970). "Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4." Nature **227**(5259): 680-685.

Laird, P. W. (2005). "Cancer epigenetics." Hum Mol Genet **14 Spec No 1**: R65-76.

Lardner, A. (2001). "The effects of extracellular pH on immune function." J Leukoc Biol **69**(4): 522-530.

Latif, F., K. Tory, J. Gnarr, M. Yao, F. M. Duh, M. L. Orcutt, T. Stackhouse, I. Kuzmin,

W. Modi, L. Geil and et al. (1993). "Identification of the von Hippel-Lindau disease tumor suppressor gene." Science **260**(5112): 1317-1320.

Lau, K. W., Y. M. Tian, R. R. Raval, P. J. Ratcliffe and C. W. Pugh (2007). "Target gene selectivity of hypoxia-inducible factor-alpha in renal cancer cells is conveyed by post-DNA-binding mechanisms." Br J Cancer **96**(8): 1284-1292.

Lee, T. H., E. D'Asti, N. Magnus, K. Al-Nedawi, B. Meehan and J. Rak (2011). "Microvesicles as mediators of intercellular communication in cancer--the emerging science of cellular 'debris'." Semin Immunopathol **33**(5): 455-467.

Lehmann, J. M., G. Riethmuller and J. P. Johnson (1989). "MUC18, a marker of tumor progression in human melanoma, shows sequence similarity to the neural cell adhesion molecules of the immunoglobulin superfamily." Proc Natl Acad Sci U S A **86**(24): 9891-9895.

Li, J., X. Sun, Z. Wang, L. Chen, D. Li, J. Zhou and M. Liu (2012). "Regulation of vascular endothelial cell polarization and migration by Hsp70/Hsp90-organizing protein." PLoS One **7**(4): e36389.

Liao, S. Y., S. Ivanov, A. Ivanova, S. Ghosh, M. A. Cote, K. Keefe, M. Coca-Prados, E. J. Stanbridge and M. I. Lerman (2003). "Expression of cell surface transmembrane carbonic anhydrase genes CA9 and CA12 in the human eye: overexpression of CA12 (CAXII) in glaucoma." J Med Genet **40**(4): 257-261.

Lim, Y. T., S. Kim, A. Nakayama, N. E. Stott, M. G. Bawendi and J. V. Frangioni (2003). "Selection of quantum dot wavelengths for biomedical assays and imaging." Mol Imaging **2**(1): 50-64.

Lindner, D. and D. Raghavan (2009). "Intra-tumoural extra-cellular pH: a useful parameter of response to chemotherapy in syngeneic tumour lines." Br J Cancer **100**(8): 1287-1291.

Liu, C., S. Yu, K. Zinn, J. Wang, L. Zhang, Y. Jia, J. C. Kappes, S. Barnes, R. P. Kimberly, W. E. Grizzle and H. G. Zhang (2006). "Murine mammary carcinoma exosomes promote tumor growth by suppression of NK cell function." J Immunol **176**(3): 1375-1385.

Liu, W. F., S. R. Ji, J. J. Sun, Y. Zhang, Z. Y. Liu, A. B. Liang and H. Z. Zeng (2012). "CD146 Expression Correlates with Epithelial-Mesenchymal Transition Markers and a Poor Prognosis in Gastric Cancer." Int J Mol Sci **13**(5): 6399-6406.

Loeb, L. A. (1991). "Mutator phenotype may be required for multistage carcinogenesis." Cancer Res **51**(12): 3075-3079.

Loeb, L. A. (2011). "Human cancers express mutator phenotypes: origin, consequences and targeting." Nat Rev Cancer **11**(6): 450-457.

Lou, Y., P. C. McDonald, A. Oloumi, S. Chia, C. Ostlund, A. Ahmadi, A. Kyle, U. Auf dem Keller, S. Leung, D. Huntsman, B. Clarke, B. W. Sutherland, D. Waterhouse, M. Bally, C. Roskelley, C. M. Overall, A. Minchinton, F. Pacchiano, F. Carta, A. Scozzafava, N. Touisni, J. Y. Winum, C. T. Supuran and S. Dedhar (2011). "Targeting

tumor hypoxia: suppression of breast tumor growth and metastasis by novel carbonic anhydrase IX inhibitors." Cancer Res **71**(9): 3364-3376.

Luketic, L., J. Delanghe, P. T. Sobol, P. Yang, E. Frotten, K. L. Mossman, J. Gauldie, J. Bramson and Y. Wan (2007). "Antigen presentation by exosomes released from peptide-pulsed dendritic cells is not suppressed by the presence of active CTL." J Immunol **179**(8): 5024-5032.

Madan, E., R. Gogna, M. Bhatt, U. Pati, P. Kuppusamy and A. A. Mahdi (2011). "Regulation of glucose metabolism by p53: emerging new roles for the tumor suppressor." Oncotarget **2**(12): 948-957.

Maley, C. C., P. C. Galipeau, X. Li, C. A. Sanchez, T. G. Paulson and B. J. Reid (2004). "Selectively advantageous mutations and hitchhikers in neoplasms: p16 lesions are selected in Barrett's esophagus." Cancer Res **64**(10): 3414-3427.

Maloney, D. G., A. J. Grillo-Lopez, D. J. Bodkin, C. A. White, T. M. Liles, I. Royston, C. Varns, J. Rosenberg and R. Levy (1997). "IDEC-C2B8: results of a phase I multiple-dose trial in patients with relapsed non-Hodgkin's lymphoma." J Clin Oncol **15**(10): 3266-3274.

Maresca, A., C. Temperini, L. Pochet, B. Masereel, A. Scozzafava and C. T. Supuran (2010). "Deciphering the mechanism of carbonic anhydrase inhibition with coumarins and thiocoumarins." J Med Chem **53**(1): 335-344.

Maresca, A., C. Temperini, H. Vu, N. B. Pham, S. A. Poulsen, A. Scozzafava, R. J. Quinn and C. T. Supuran (2009). "Non-zinc mediated inhibition of carbonic anhydrases: coumarins are a new class of suicide inhibitors." J Am Chem Soc **131**(8): 3057-3062.

Martinez-Zaguilan, R., R. M. Lynch, G. M. Martinez and R. J. Gillies (1993). "Vacuolar-type H(+)-ATPases are functionally expressed in plasma membranes of human tumor cells." Am J Physiol **265**(4 Pt 1): C1015-1029.

Martinez-Zaguilan, R., E. A. Seftor, R. E. Seftor, Y. W. Chu, R. J. Gillies and M. J. Hendrix (1996). "Acidic pH enhances the invasive behavior of human melanoma cells." Clin Exp Metastasis **14**(2): 176-186.

Mathivanan, S. and R. J. Simpson (2009). "ExoCarta: A compendium of exosomal proteins and RNA." Proteomics **9**(21): 4997-5000.

Matta, A., L. V. DeSouza, N. K. Shukla, S. D. Gupta, R. Ralhan and K. W. Siu (2008). "Prognostic significance of head-and-neck cancer biomarkers previously discovered and identified using iTRAQ-labeling and multidimensional liquid chromatography-tandem mass spectrometry." J Proteome Res **7**(5): 2078-2087.

Melnikova, V. O. and M. Bar-Eli (2006). "Bioimmunotherapy for melanoma using fully human antibodies targeting MCAM/MUC18 and IL-8." Pigment Cell Res **19**(5): 395-405.

Merlo, L. M., J. W. Pepper, B. J. Reid and C. C. Maley (2006). "Cancer as an evolutionary and ecological process." Nat Rev Cancer **6**(12): 924-935.

- Mitchell, P. S., R. K. Parkin, E. M. Kroh, B. R. Fritz, S. K. Wyman, E. L. Pogosova-Agadjanyan, A. Peterson, J. Noteboom, K. C. O'Briant, A. Allen, D. W. Lin, N. Urban, C. W. Drescher, B. S. Knudsen, D. L. Stirewalt, R. Gentleman, R. L. Vessella, P. S. Nelson, D. B. Martin and M. Tewari (2008). "Circulating microRNAs as stable blood-based markers for cancer detection." Proc Natl Acad Sci U S A **105**(30): 10513-10518.
- Mjahed, H., F. Girodon, M. Fontenay and C. Garrido (2012). "Heat shock proteins in hematopoietic malignancies." Exp Cell Res **318**(15): 1946-1958.
- Morita, T., T. Nagaki, I. Fukuda and K. Okumura (1992). "Clastogenicity of low pH to various cultured mammalian cells." Mutat Res **268**(2): 297-305.
- Morris, J. C., J. Chiche, C. Grellier, M. Lopez, L. F. Bornaghi, A. Maresca, C. T. Supuran, J. Pouyssegur and S. A. Poulsen (2011). "Targeting hypoxic tumor cell viability with carbohydrate-based carbonic anhydrase IX and XII inhibitors." J Med Chem **54**(19): 6905-6918.
- Muhammad, E., N. Leventhal, G. Parvari, A. Hanukoglu, I. Hanukoglu, V. Chalifa-Caspi, Y. Feinstein, J. Weinbrand, H. Jacoby, E. Manor, T. Nagar, J. C. Beck, V. C. Sheffield, E. HersHKovitz and R. Parvari (2011). "Autosomal recessive hyponatremia due to isolated salt wasting in sweat associated with a mutation in the active site of Carbonic Anhydrase 12." Hum Genet **129**(4): 397-405.
- Murri-Plesko, M. T., A. Hulikova, E. Oosterwijk, A. M. Scott, A. Zortea, A. L. Harris, G. Ritter, L. Old, S. Bauer, P. Swietach and C. Renner (2011). "Antibody inhibiting enzymatic activity of tumour-associated carbonic anhydrase isoform IX." Eur J Pharmacol **657**(1-3): 173-183.
- Nagasawa, H. (2011). "Pathophysiological response to hypoxia - from the molecular mechanisms of malady to drug discovery: drug discovery for targeting the tumor microenvironment." J Pharmacol Sci **115**(4): 446-452.
- Neal, C. L., J. Yao, W. Yang, X. Zhou, N. T. Nguyen, J. Lu, C. G. Danes, H. Guo, K. H. Lan, J. Ensor, W. Hittelman, M. C. Hung and D. Yu (2009). "14-3-3zeta overexpression defines high risk for breast cancer recurrence and promotes cancer cell survival." Cancer Res **69**(8): 3425-3432.
- Neal, C. L. and D. Yu (2010). "14-3-3zeta as a prognostic marker and therapeutic target for cancer." Expert Opin Ther Targets **14**(12): 1343-1354.
- Nelson, A. L., E. Dhimolea and J. M. Reichert (2010). "Development trends for human monoclonal antibody therapeutics." Nat Rev Drug Discov **9**(10): 767-774.
- Neri, D. and C. T. Supuran (2011). "Interfering with pH regulation in tumours as a therapeutic strategy." Nat Rev Drug Discov **10**(10): 767-777.
- Niemela, A. M., P. Hynninen, J. P. Mecklin, T. Kuopio, A. Kokko, L. Aaltonen, A. K. Parkkila, S. Pastorekova, J. Pastorek, A. Waheed, W. S. Sly, T. F. Orntoft, M. KruHoffer, H. Haapasalo, S. Parkkila and A. J. Kivela (2007). "Carbonic anhydrase IX is highly expressed in hereditary nonpolyposis colorectal cancer." Cancer Epidemiol Biomarkers Prev **16**(9): 1760-1766.

Nimmerjahn, F. and J. V. Ravetch (2012). "Translating basic mechanisms of IgG effector activity into next generation cancer therapies." Cancer Immun **12**: 13.

Nishimura, S. and K. Watanabe (2006). "The discovery of modified nucleosides from the early days to the present: a personal perspective." J Biosci **31**(4): 465-475.

Nowell, P. C. (1976). "The clonal evolution of tumor cell populations." Science **194**(4260): 23-28.

Ober, R. J., C. G. Radu, V. Ghetie and E. S. Ward (2001). "Differences in promiscuity for antibody-FcRn interactions across species: implications for therapeutic antibodies." Int Immunol **13**(12): 1551-1559.

Ord, J. J., E. H. Streeter, I. S. Roberts, D. Cranston and A. L. Harris (2005). "Comparison of hypoxia transcriptome in vitro with in vivo gene expression in human bladder cancer." Br J Cancer **93**(3): 346-354.

Orlowski, A., V. C. De Giusti, P. E. Morgan, E. A. Aiello and B. V. Alvarez (2012). "Binding of carbonic anhydrase IX to extracellular loop 4 of the NBCe1 Na⁺/HCO₃⁻ cotransporter enhances NBCe1-mediated HCO₃⁻ influx in the rat heart." Am J Physiol Cell Physiol **303**(1): C69-80.

Pantuck, A. J., G. Zeng, A. S. Beldegrun and R. A. Figlin (2003). "Pathobiology, prognosis, and targeted therapy for renal cell carcinoma: exploiting the hypoxia-induced pathway." Clin Cancer Res **9**(13): 4641-4652.

Parkkila, S., A. K. Parkkila, J. Saarnio, J. Kivela, T. J. Karttunen, K. Kaunisto, A. Waheed, W. S. Sly, O. Tureci, I. Virtanen and H. Rajaniemi (2000). "Expression of the membrane-associated carbonic anhydrase isozyme XII in the human kidney and renal tumors." J Histochem Cytochem **48**(12): 1601-1608.

Parks, S. K., J. Chiche and J. Pouyssegur (2011). "pH control mechanisms of tumor survival and growth." J Cell Physiol **226**(2): 299-308.

Pastorekova, S., J. Kopacek and J. Pastorek (2007). "Carbonic anhydrase inhibitors and the management of cancer." Curr Top Med Chem **7**(9): 865-878.

Pastorekova, S., S. Parkkila, A. K. Parkkila, R. Opavsky, V. Zelnik, J. Saarnio and J. Pastorek (1997). "Carbonic anhydrase IX, MN/CA IX: analysis of stomach complementary DNA sequence and expression in human and rat alimentary tracts." Gastroenterology **112**(2): 398-408.

Pastorekova, S., M. Zatovicova and J. Pastorek (2008). "Cancer-associated carbonic anhydrases and their inhibition." Curr Pharm Des **14**(7): 685-698.

Pastorekova, S. and J. Zavada (2004). "Carbonic anhydrase IX (CA IX) as a potential target for cancer therapy." Cancer Therapy **2**: 245-262.

Pelletier, J., F. Dayan, J. Durivault, K. Ilc, E. Pecou, J. Pouyssegur and N. M. Mazure (2012). "The asparaginyl hydroxylase factor-inhibiting HIF is essential for tumor growth through suppression of the p53-p21 axis." Oncogene **31**(24): 2989-3001.

Perez-Sayans, M., A. Garcia-Garcia, A. Scozzafava and C. T. Supuran (2012). "Inhibition of V-ATPase and carbonic anhydrases as interference strategy with tumor acidification processes." *Curr Pharm Des* **18**(10): 1407-1413.

Pienta, K. J., N. McGregor, R. Axelrod and D. E. Axelrod (2008). "Ecological therapy for cancer: defining tumors using an ecosystem paradigm suggests new opportunities for novel cancer treatments." *Transl Oncol* **1**(4): 158-164.

Plosker, G. L. and D. P. Figgitt (2003). "Rituximab: a review of its use in non-Hodgkin's lymphoma and chronic lymphocytic leukaemia." *Drugs* **63**(8): 803-843.

Pollard, J. A., T. A. Alonzo, M. Loken, R. B. Gerbing, P. A. Ho, I. D. Bernstein, S. C. Raimondi, B. Hirsch, J. Franklin, R. B. Walter, A. Gamis and S. Meshinchi (2012). "Correlation of CD33 expression level with disease characteristics and response to gemtuzumab ozogamicin containing chemotherapy in childhood AML." *Blood* **119**(16): 3705-3711.

Potter, C. and A. L. Harris (2004). "Hypoxia inducible carbonic anhydrase IX, marker of tumour hypoxia, survival pathway and therapy target." *Cell Cycle* **3**(2): 164-167.

Proescholdt, M. A., C. Mayer, M. Kubitz, T. Schubert, S. Y. Liao, E. J. Stanbridge, S. Ivanov, E. H. Oldfield, A. Brawanski and M. J. Merrill (2005). "Expression of hypoxia-inducible carbonic anhydrases in brain tumors." *Neuro Oncol* **7**(4): 465-475.

Rahman, S., Y. Patel, J. Murray, K. V. Patel, R. Sumathipala, M. Sobel and E. S. Wijelath (2005). "Novel hepatocyte growth factor (HGF) binding domains on fibronectin and vitronectin coordinate a distinct and amplified Met-integrin induced signalling pathway in endothelial cells." *BMC Cell Biol* **6**(1): 8.

Rak, J. and A. Guha (2012). "Extracellular vesicles--vehicles that spread cancer genes." *Bioessays* **34**(6): 489-497.

Rechavi, O., I. Goldstein and Y. Kloog (2009). "Intercellular exchange of proteins: the immune cell habit of sharing." *FEBS Lett* **583**(11): 1792-1799.

Reichert, J. M. (2010). "Antibodies to watch in 2010." *MAbs* **2**(1): 84-100.

Reichert, J. M., C. J. Rosensweig, L. B. Faden and M. C. Dewitz (2005). "Monoclonal antibody successes in the clinic." *Nat Biotechnol* **23**(9): 1073-1078.

Reshkin, S. J., A. Bellizzi, R. A. Cardone, M. Tommasino, V. Casavola and A. Paradiso (2003). "Paclitaxel induces apoptosis via protein kinase A- and p38 mitogen-activated protein-dependent inhibition of the Na⁺/H⁺ exchanger (NHE) NHE isoform 1 in human breast cancer cells." *Clin Cancer Res* **9**(6): 2366-2373.

Rich, I. N., D. Worthington-White, O. A. Garden and P. Musk (2000). "Apoptosis of leukemic cells accompanies reduction in intracellular pH after targeted inhibition of the Na⁺/H⁺ exchanger." *Blood* **95**(4): 1427-1434.

Robert-Koch-Institut, Gesellschaft der Epidemiologischen Krebsregister in Deutschland, D. C. S. D. K. Dr. Peter Kaatsch, Kapitel 4), D. S. H. G. Prof. Dr.

Alexander Katalinic, Kapitel 1.2, 1.3, Anhang GEKID), D. K. Mitarbeiterinnen und Mitarbeiter des Krebsinformationsdienstes, T. z. R. u. F. h. i. K. 3), D. B. B. Nadja Baras, Dr. Joachim Bertz, Dr. Stefan Dahm, Dr. Jörg Haberland, A. L. Dr. Klaus Kraywinkel, Dr. Ute Wolf (RKI), R. Mitarbeit and M. R. Stefan Meisegeier, Ina Schönfeld, Manuela Stöcker (RKI) (2012). Krebs in Deutschland 2007-2008 Häufigkeiten und Trends. Berlin.

Robey, I. F., B. K. Baggett, N. D. Kirkpatrick, D. J. Roe, J. Dosesco, B. F. Sloane, A. I. Hashim, D. L. Morse, N. Raghunand, R. A. Gatenby and R. J. Gillies (2009). "Bicarbonate increases tumor pH and inhibits spontaneous metastases." Cancer Res **69**(6): 2260-2268.

Saarnio, J., S. Parkkila, A. K. Parkkila, A. Waheed, M. C. Casey, X. Y. Zhou, S. Pastorekova, J. Pastorek, T. Karttunen, K. Haukipuro, M. I. Kairaluoma and W. S. Sly (1998). "Immunohistochemistry of carbonic anhydrase isozyme IX (MN/CA IX) in human gut reveals polarized expression in the epithelial cells with the highest proliferative capacity." J Histochem Cytochem **46**(4): 497-504.

Salminen, A. and K. Kaarniranta (2010). "Insulin/IGF-1 paradox of aging: regulation via AKT/IKK/NF-kappaB signaling." Cell Signal **22**(4): 573-577.

Sauvant, C., M. Nowak, C. Wirth, B. Schneider, A. Riemann, M. Gekle and O. Thews (2008). "Acidosis induces multi-drug resistance in rat prostate cancer cells (AT1) in vitro and in vivo by increasing the activity of the p-glycoprotein via activation of p38." Int J Cancer **123**(11): 2532-2542.

Scott, A. M., J. P. Allison and J. D. Wolchok (2012). "Monoclonal antibodies in cancer therapy." Cancer Immun **12**: 14.

Semenza, G. L. (2003). "Targeting HIF-1 for cancer therapy." Nat Rev Cancer **3**(10): 721-732.

Shawler, D. L., R. M. Bartholomew, L. M. Smith and R. O. Dillman (1985). "Human immune response to multiple injections of murine monoclonal IgG." J Immunol **135**(2): 1530-1535.

Shultz, L. D., F. Ishikawa and D. L. Greiner (2007). "Humanized mice in translational biomedical research." Nat Rev Immunol **7**(2): 118-130.

Siegel, R., D. Naishadham and A. Jemal (2012). "Cancer statistics, 2012." CA Cancer J Clin **62**(1): 10-29.

Silva, A. S., Y. Kam, Z. P. Khin, S. E. Minton, R. J. Gillies and R. A. Gatenby (2012). "Evolutionary approaches to prolong progression-free survival in breast cancer." Cancer Res **72**(24): 6362-6370.

Smith, J. M. and J. Haigh (1974). "The hitch-hiking effect of a favourable gene." Genet Res **23**(1): 23-35.

Soleimani, M. and C. E. Burnham (2000). "Physiologic and molecular aspects of the Na⁺:HCO₃⁻ cotransporter in health and disease processes." Kidney Int **57**(2): 371-384.

Stearns, S. C. (2012). "Evolutionary medicine: its scope, interest and potential." Proc Biol Sci **279**(1746): 4305-4321.

Stillebroer, A. B., P. F. Mulders, O. C. Boerman, W. J. Oyen and E. Oosterwijk (2010). "Carbonic anhydrase IX in renal cell carcinoma: implications for prognosis, diagnosis, and therapy." Eur Urol **58**(1): 75-83.

Stock, C. and A. Schwab (2009). "Protons make tumor cells move like clockwork." Pflugers Arch **458**(5): 981-992.

Stossi, F., D. H. Barnett, J. Frasar, B. Komm, C. R. Lyttle and B. S. Katzenellenbogen (2004). "Transcriptional profiling of estrogen-regulated gene expression via estrogen receptor (ER) alpha or ERbeta in human osteosarcoma cells: distinct and common target genes for these receptors." Endocrinology **145**(7): 3473-3486.

Stratton, M. R., P. J. Campbell and P. A. Futreal (2009). "The cancer genome." Nature **458**(7239): 719-724.

Subbaram, S. and C. M. Dipersio (2011). "Integrin alpha3beta1 as a breast cancer target." Expert Opin Ther Targets **15**(10): 1197-1210.

Subra, C., K. Laulagnier, B. Perret and M. Record (2007). "Exosome lipidomics unravels lipid sorting at the level of multivesicular bodies." Biochimie **89**(2): 205-212.

Supuran, C. T. (2008). "Carbonic anhydrases: novel therapeutic applications for inhibitors and activators." Nat Rev Drug Discov **7**(2): 168-181.

Supuran, C. T. (2010). "Carbonic anhydrase inhibitors." Bioorg Med Chem Lett **20**(12): 3467-3474.

Svastova, E., A. Hulikova, M. Rafajova, M. Zat'ovicova, A. Gibadulinova, A. Casini, A. Cecchi, A. Scozzafava, C. T. Supuran, J. Pastorek and S. Pastorekova (2004). "Hypoxia activates the capacity of tumor-associated carbonic anhydrase IX to acidify extracellular pH." FEBS Lett **577**(3): 439-445.

Svastova, E., W. Witariski, L. Csaderova, I. Kosik, L. Skvarkova, A. Hulikova, M. Zatovicova, M. Barathova, J. Kopacek, J. Pastorek and S. Pastorekova (2012). "Carbonic anhydrase IX interacts with bicarbonate transporters in lamellipodia and increases cell migration via its catalytic domain." J Biol Chem **287**(5): 3392-3402.

Swietach, P., S. Wigfield, P. Cobden, C. T. Supuran, A. L. Harris and R. D. Vaughan-Jones (2008). "Tumor-associated carbonic anhydrase 9 spatially coordinates intracellular pH in three-dimensional multicellular growths." J Biol Chem **283**(29): 20473-20483.

Szajnik, M., M. Czystowska, M. J. Szczepanski, M. Mandapathil and T. L. Whiteside (2010). "Tumor-derived microvesicles induce, expand and up-regulate biological activities of human regulatory T cells (Treg)." PLoS One **5**(7): e11469.

Tafreshi, N. K., M. M. Bui, K. Bishop, M. C. Lloyd, S. A. Enkemann, A. S. Lopez, D. Abrahams, B. W. Carter, J. Vagner, S. R. Grobmyer, R. J. Gillies and D. L. Morse

(2012). "Noninvasive detection of breast cancer lymph node metastasis using carbonic anhydrases IX and XII targeted imaging probes." Clin Cancer Res **18**(1): 207-219.

Takacova, M., M. Bartosova, L. Skvarkova, M. Zatovicova, I. Vidlickova, L. Csaderova, M. Barathova, J. Breza, Jr., P. Bujdak, J. Pastorek, J. Breza, Sr. and S. Pastorekova (2013). "Carbonic anhydrase IX is a clinically significant tissue and serum biomarker associated with renal cell carcinoma." Oncol Lett **5**(1): 191-197.

Teicher, B. A. and R. V. Chari (2011). "Antibody conjugate therapeutics: challenges and potential." Clin Cancer Res **17**(20): 6389-6397.

Thery, C., S. Amigorena, G. Raposo and A. Clayton (2006). "Isolation and characterization of exosomes from cell culture supernatants and biological fluids." Curr Protoc Cell Biol **Chapter 3**: Unit 3 22.

Thiry, A., C. T. Supuran, B. Masereel and J. M. Dogne (2008). "Recent developments of carbonic anhydrase inhibitors as potential anticancer drugs." J Med Chem **51**(11): 3051-3056.

Trajkovic, K., C. Hsu, S. Chiantia, L. Rajendran, D. Wenzel, F. Wieland, P. Schwille, B. Brugger and M. Simons (2008). "Ceramide triggers budding of exosome vesicles into multivesicular endosomes." Science **319**(5867): 1244-1247.

Tromberg, B. J., B. W. Pogue, K. D. Paulsen, A. G. Yodh, D. A. Boas and A. E. Cerussi (2008). "Assessing the future of diffuse optical imaging technologies for breast cancer management." Med Phys **35**(6): 2443-2451.

Tucker, G. C. (2006). "Integrins: molecular targets in cancer therapy." Curr Oncol Rep **8**(2): 96-103.

Tureci, O., U. Sahin, E. Vollmar, S. Siemer, E. Gottert, G. Seitz, A. K. Parkkila, G. N. Shah, J. H. Grubb, M. Pfreundschuh and W. S. Sly (1998). "Human carbonic anhydrase XII: cDNA cloning, expression, and chromosomal localization of a carbonic anhydrase gene that is overexpressed in some renal cell cancers." Proc Natl Acad Sci U S A **95**(13): 7608-7613.

Ulmasov, B., A. Waheed, G. N. Shah, J. H. Grubb, W. S. Sly, C. Tu and D. N. Silverman (2000). "Purification and kinetic analysis of recombinant CA XII, a membrane carbonic anhydrase overexpressed in certain cancers." Proc Natl Acad Sci U S A **97**(26): 14212-14217.

Valente, V., S. A. Teixeira, L. Neder, O. K. Okamoto, S. M. Oba-Shinjo, S. K. Marie, C. A. Scrideli, M. L. Paco-Larson and C. G. Carlotti, Jr. (2009). "Selection of suitable housekeeping genes for expression analysis in glioblastoma using quantitative RT-PCR." BMC Mol Biol **10**: 17.

van Hemert, M. J., M. Niemantsverdriet, T. Schmidt, C. Backendorf and H. P. Spaink (2004). "Isoform-specific differences in rapid nucleocytoplasmic shuttling cause distinct subcellular distributions of 14-3-3 sigma and 14-3-3 zeta." J Cell Sci **117**(Pt 8): 1411-1420.

van Sluis, R., Z. M. Bhujwalla, N. Raghunand, P. Ballesteros, J. Alvarez, S. Cerdan, J.

P. Galons and R. J. Gillies (1999). "In vivo imaging of extracellular pH using ^1H MRSI." Magn Reson Med **41**(4): 743-750.

Vlassov, A. V., S. Magdaleno, R. Setterquist and R. Conrad (2012). "Exosomes: current knowledge of their composition, biological functions, and diagnostic and therapeutic potentials." Biochim Biophys Acta **1820**(7): 940-948.

Wakabayashi, S., T. Ikeda, T. Iwamoto, J. Pouyssegur and M. Shigekawa (1997). "Calmodulin-binding autoinhibitory domain controls "pH-sensing" in the Na^+/H^+ exchanger NHE1 through sequence-specific interaction." Biochemistry **36**(42): 12854-12861.

Warburg, O. (1956). "On the origin of cancer cells." Science **123**(3191): 309-314.

Watson, P. H., S. K. Chia, C. C. Wykoff, C. Han, R. D. Leek, W. S. Sly, K. C. Gatter, P. Ratcliffe and A. L. Harris (2003). "Carbonic anhydrase XII is a marker of good prognosis in invasive breast carcinoma." Br J Cancer **88**(7): 1065-1070.

Weidle, U. H., D. Maisel, S. Klostermann, C. Schiller and E. H. Weiss (2011). "Intracellular proteins displayed on the surface of tumor cells as targets for therapeutic intervention with antibody-related agents." Cancer Genomics Proteomics **8**(2): 49-63.

Weis, S. M. and D. A. Cheresh (2011a). " αV integrins in angiogenesis and cancer." Cold Spring Harb Perspect Med **1**(1): a006478.

Weis, S. M. and D. A. Cheresh (2011b). "Tumor angiogenesis: molecular pathways and therapeutic targets." Nat Med **17**(11): 1359-1370.

Whittington, D. A., A. Waheed, B. Ulmasov, G. N. Shah, J. H. Grubb, W. S. Sly and D. W. Christianson (2001). "Crystal structure of the dimeric extracellular domain of human carbonic anhydrase XII, a bitopic membrane protein overexpressed in certain cancer tumor cells." Proc Natl Acad Sci U S A **98**(17): 9545-9550.

Winum, J. Y., J. M. Dogne, A. Casini, X. de Leval, J. L. Montero, A. Scozzafava, D. Vullo, A. Innocenti and C. T. Supuran (2005). "Carbonic anhydrase inhibitors: synthesis and inhibition of cytosolic/membrane-associated carbonic anhydrase isozymes I, II, and IX with sulfonamides incorporating hydrazino moieties." J Med Chem **48**(6): 2121-2125.

Woelber, L., K. Kress, J. F. Kersten, M. Choschzick, E. Kilic, U. Herwig, C. Lindner, J. Schwarz, F. Jaenicke, S. Mahner, K. Milde-Langosch, V. Mueller and M. Ihnen (2011). "Carbonic anhydrase IX in tumor tissue and sera of patients with primary cervical cancer." BMC Cancer **11**: 12.

Wojtkowiak, J. W., D. Verduzco, K. J. Schramm and R. J. Gillies (2011). "Drug resistance and cellular adaptation to tumor acidic pH microenvironment." Mol Pharm **8**(6): 2032-2038.

Wu, W., Y. Luo, C. Sun, Y. Liu, P. Kuo, J. Varga, R. Xiang, R. Reisfeld, K. D. Janda, T. S. Edgington and C. Liu (2006). "Targeting cell-impermeable prodrug activation to tumor microenvironment eradicates multiple drug-resistant neoplasms." Cancer Res **66**(2): 970-980.

Wykoff, C. C., N. J. Beasley, P. H. Watson, K. J. Turner, J. Pastorek, A. Sibtain, G. D. Wilson, H. Turley, K. L. Talks, P. H. Maxwell, C. W. Pugh, P. J. Ratcliffe and A. L. Harris (2000). "Hypoxia-inducible expression of tumor-associated carbonic anhydrases." Cancer Res **60**(24): 7075-7083.

Xu, G. and H. L. McLeod (2001). "Strategies for enzyme/prodrug cancer therapy." Clin Cancer Res **7**(11): 3314-3324.

Zabouo, G., A. M. Imbert, J. Jacquemier, P. Finetti, T. Moreau, B. Esterni, D. Birnbaum, F. Bertucci and C. Chabannon (2009). "CD146 expression is associated with a poor prognosis in human breast tumors and with enhanced motility in breast cancer cell lines." Breast Cancer Res **11**(1): R1.

8 ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

A	Ampere	L	Liter
Abb.	Abbildung	LUC	Luziferase
ABC	Avidin-Biotin-Komplex	m	Milli-
ADCC	Antibody dependent cellular cytotoxicity (Antikörperabhängige zelluläre Zytotoxizität)	mm	Millimeter
		M	Molar
APC	Allophycocyanin	min	Minute
APS	Ammoniumpersulfat	mRNA	<i>Messenger RNA</i>
BCA	Bicinchoninsäure	n	Nano
BLI	<i>Bioluminescent imaging</i>	NHS	N-hydroxysuccinimid
bp	Basenpaar	NIR	Nah-Infrarot
BSA	Bovines Serumalbumin	NK-Zelle	Natürliche Killerzelle
CA	Carboanhydrase	NSG	NOD-scid IL2Rgamma null
cDNA	Complementary DNA	oD	Optische Dichte
CD	<i>Cluster of differentiation</i>	PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
CTB	Choleratoxin Untereinheit B	PBMC	<i>Peripheral blood mononuclear cells</i>
Cy	Cyanin	PBS	<i>Phosphate buffered saline</i>
Da	Dalton	PCR	<i>Polymerase Chain Reaktion</i>
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol	PEG	Polyethylenglykol
DMEM	<i>Dulbeccos's Modified Eagle Medium</i>	PFA	Paraformaldehyd
DMP	Dimethylpimelimidat	pH	Maß für die H ⁺ -Konzentration einer Lösung
DMSO	Dimethylsulfoxid	pHi	Intrazellulärer pH-Wert
DNA	<i>Desoxyribonucleic acid</i>	pHe	Extrazellulärer pH-Wert
DTT	Dithiotreitol	poly.	Polyklonal
ECL	<i>Enhanced chemiluminescence</i>	qPCR	<i>Real-Time-quantitative-PCR</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat	RNA	<i>Ribonucleic acid</i>
ELISA	<i>Enzyme Linked Immunosorbent Assay</i>	ROI	<i>Region of interest</i>
et al.	et alii (lt. und andere)	RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute Medium</i>
Exo	Exosomen	RT	Raumtemperatur
F	Faraday (Einheit für Ladungsmenge)	s	Sekunde
FACS	<i>Fluorescence activated cell sorter</i>	SDS	<i>Sodium dodecylsulfate</i>
fLUC	<i>Firefly</i> Luziferase	SPF	<i>Specific pathogen free</i>
FKS	Fötales Kälberserum	sr	Steradian
Fc	Konstanter Teil des Antikörpers (crystallisable fragment)	Tab.	Tabelle
g	Gramm; Konstante für Erdbeschleunigung	TAE	Tris-Acetat-EDTA
G	Gauge	TBS	Tris buffered saline
gLUC	Gaussia Luziferase	TBST	TBS mit Tween
GFP	Grün fluoreszierendes Protein	TEMED	N,N,N',N',T etramethyl-Ethylendiamin
GST	Glutathion-S-Transferase	Tris	Tris (hydroxymethyl-) aminomethan
h	Stunde	TSG101	<i>Tumor susceptibility gene 101</i>
H+L	Schwere und leichte Kette	U	Enzymeinheit (unit)
HBSS	<i>Hanks' balanced salt solution</i>	ÜN	Über Nacht
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure	Upm	Umdrehungen pro Minute
HRP	Meerrettichperoxidase	V	Volt
Ig	Immunglobulin	v/v	Volumenprozent
IL	Interleukin	w/v	Massenprozent
IP	Immunpräzipitation	z.B.	Zum Beispiel
i.p.	Intraperitoneal	°C	Grad Celsius
IR	Infrarot	μ	Mikro
k	Kilo		

9 LEBENS LAUF

Persönliche Angaben

Name: Gábor Gondi
Geboren: Kiskunfélegyháza in Ungarn
Staatsangehörigkeit: ungarisch
Familienstand: verheiratet

Ausbildung, Weiterbildung und berufliche Tätigkeit

09/1989 - 07/1993 Grundschohle Wilhelmschohle München
09/1993 - 06/2002 Willi-Graf-Gymnasium München
10/2002 - 06/2007 Studium der Biologie an der Universität Erlangen-Nürnberg
07/2007 - 05/2008 Diplomarbeit bei Prof. Dr. Oscar León in der Abteilung für Virologie an der Universidad de Chile
09/2008 - 09/2009 Wissenschaftlicher Mitarbeiter bei Dr. Puri Fortes am Zentrum für Angewandte Biomedizinische Forschung (CIMA) an der Universidad de Navarra
10/2009 - 10/2013 Promotion am Helmholtz Zentrum München bei Prof. Dr. Reinhard Zeidler (Doktorvater: PD. Dr. Josef Mautner/ LMU)

Wissenschaftliche Veröffentlichungen

Sobrevals, L., C. Rodriguez, J. L. Romero-Treveje, **G. Gondi**, I. Monreal, A. Paneda, N. Juanarena, S. Arcelus, N. Razquin, L. Guembe, G. Gonzalez-Aseguinolaza, J. Prieto and P. Fortes (2010). "Insulin-like growth factor I gene transfer to cirrhotic liver induces fibrolysis and reduces fibrogenesis leading to cirrhosis reversion in rats." Hepatology **51**(3): 912-921.

Battke, C., E. Kremmer, J. Mysliwietz, **G. Gondi**, C. Dumitru, S. Brandau, S. Lang, D. Vullo, C. Supuran and R. Zeidler (2011). "Generation and characterization of the first inhibitory antibody targeting tumour-associated carbonic anhydrase XII." Cancer Immunol Immunother **60**(5): 649-658.

Priglinger, C. S., C. M. Szober, S. G. Priglinger, J. Merl, K. N. Euler, M. Kernt, **G. Gondi**, J. Behler, A. Geerlof, A. Kampik, M. Ueffing and S. M. Hauck (2013). "Galectin-3 induces clustering of CD147 and integrin-beta1 transmembrane glycoprotein receptors on the RPE cell surface." PLoS One **8**(7): e70011.

Gondi, G., J. Mysliwietz, A. Hulikova, J. P. Jen, P. Swietach, E. Kremmer and R. Zeidler (2013). "Antitumor efficacy of a monoclonal antibody that inhibits the activity of cancer-associated carbonic anhydrase XII." Cancer Res.

Poster-Präsentation auf der Biovaria München 2012

Gabor Gondi, Elisabeth Kremmer, Reinhard Zeidler „Antibody against carbonic anhydrase XII“

10 DANKSAGUNG

An erster Stelle möchte ich mich bei Prof. Dr. Reinhard Zeidler dafür bedanken, dass er mir die Möglichkeit gab mich neu zu orientieren und mir das notwendige Vertrauen und die Unterstützung entgegenbrachte, um dieses interessante Projekt zu seinem Erfolg zu verhelfen. Ich danke ihm herzlich für die Betreuung meiner Arbeit, seine stete Bereitschaft zur wissenschaftlichen Diskussion, die wertvollen Ratschläge und das geduldige Korrekturlesen dieser Arbeit. Ich danke ihm auch dafür, dass er in schwierigen Zeiten ein offenes Ohr für Privates hatte und mir so sein Vertrauen und seine Unterstützung aussprach.

Ein herzliches Dankeschön geht an Dr. Josef Mysliwietz, der sowohl bei der Erledigung des ungeliebten „Papierkrams“, der fachlichen Zerteilung der Maus, der freundlichen Assistenz beim Imaging und bei den Sortiervorgängen hervorragende Arbeit geleistet hat und auch sonst immer für gute Laune gesorgt hat. Seine sympathischen Scherze und Anekdoten über vergangene Zeiten, seine Erfahrung und die Gelassenheit, die er ausstrahlte trugen dazu bei, dass ich mit Freude und Selbstsicherheit in meine neuen Aufgaben hineinwuchs.

Bei Dr. Josef Mautner möchte ich mich für sein Interesse, seine hilfreichen Korrekturvorschläge und die Vertretung der Arbeit an der biologischen Fakultät bedanken.

Auch den Tierpfleger(inne)n gilt mein Dank. Sie haben dafür gesorgt, dass meine Tiere gut versorgt waren. Besonders Michael und Franzl stachen durch ihre Freundlichkeit und positive Ausstrahlung heraus.

Ich danke Dr. Irmela Jeremias für die Bereitstellung ihres Luziferase-Systems und Volker Groß für einige hilfreiche Tipps fürs Imaging und der reibungslosen Abstimmung der Messzeiten.

Vielen Dank auch an Dr. Elisabeth Kremmer und ihrer Arbeitsgruppe für die Durchführung der Immunisierungen und Herstellung der Antikörper.

Ich danke den Mitarbeitern der Abteilung Genvektoren für die angenehme und kollegiale Zusammenarbeit. Besonders Leah, Xiaoling, Larissa, Judith, Viet A und Andreas, die durch ihr Interesse und den freundschaftlichen, oftmals philosophischen Gedankenaustausch für gute Laune sorgten.

Mein besonderer Dank gilt meiner Frau Francisca. Sie war mein moralischer Beistand. Sie glaubte von Anfang an an meine Fähigkeiten. Sie ermutigte mich stets und verhalf mir über mich hinauszuwachsen. Sie begleitete mich durch all diese beruflichen und privaten Höhen und Tiefen, die meine Zeit als Doktorand ausmachten. Ihr sonniges Gemüt, ihre Geduld und ihre bedingungslose Loyalität und Liebe gaben mir so viel Kraft.