

GEORG SPEYER HAUS
CHEMOTHERAPEUTISCHES FORSCHUNGSMITTEL



„Bispezifische transmembrane Antikörperfragmente zur Inhibierung von
ErbB-Wachstumsfaktor-Rezeptoren“

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Naturwissenschaften

vorgelegt beim Fachbereich 14
der Johann Wolfgang Goethe -Universität
in Frankfurt am Main

von
Nina Carola Angelika Müller
aus Offenbach am Main

Frankfurt 2013
(D 30)

vom Fachbereich 14 der

Johann Wolfgang Goethe - Universität als Dissertation angenommen.

Dekan: Prof. Dr. Thomas Prisner

Gutachter : Prof. Dr. Volker Dötsch

Prof. Dr. Winfried Wels

Datum der Disputation :

ERKLÄRUNG

Ich erkläre hiermit, dass ich mich bisher keiner Doktorprüfung unterzogen habe.

Frankfurt am Main, den.....

(Unterschrift)

Eidesstattliche Versicherung

Ich erkläre hiermit an Eides Statt, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Titel

„Bispezifische transmembrane Antikörperfragmente zur Inhibierung von ErbB-Wachstumsfaktor-Rezeptoren“

selbständig angefertigt und mich anderer Hilfsmittel als der in ihr angegebenen nicht bedient habe, insbesondere, dass alle Entlehnungen aus anderen Schriften mit Angabe der betreffenden Schrift gekennzeichnet sind.

Ich versichere, nicht die Hilfe einer kommerziellen Promotionsvermittlung in Anspruch genommen zu haben

Frankfurt am Main, den.....

(Unterschrift)

Meiner Familie

Zusammenfassung

Der epidermale Wachstumsfaktor-Rezeptor (EGFR) und das ErbB2 Molekül sind Mitglieder der ErbB-Rezeptortyrosinkinase-Familie. Die Bindung von Peptidliganden an die extrazelluläre Domäne (ECD) von EGFR führt zu einer Konformationsänderung, die den Dimerisierungs-kompetenten Zustand des Rezeptors stabilisiert und eine Homodimerisierung oder Heterodimerisierung mit anderen ErbB-Rezeptoren erlaubt. ErbB2 liegt dagegen ohne Ligandenbindung dauerhaft in einer Dimerisierungs-kompetenten Konformation vor. Die Rezeptordimerisierung stimuliert die intrazelluläre Kinaseaktivität, was zu einer Autophosphorylierung distinkter Tyrosine im C-terminalen Schwanz der Rezeptoren führt. Diese Phosphotyrosine dienen als Bindungsstellen unterschiedlicher intrazellulärer Substrate und Adaptorproteine, die Zellwachstums-, Migrations- und Überlebens-fördernde Signalkaskaden auslösen. Eine Über- oder Fehlfunktion dieser Rezeptoren wurde in vielen Karzinomen epithelialen Ursprungs sowie in Glioblastomen beschrieben und mit einem aggressiven Krankheitsverlauf in Verbindung gebracht.

Der therapeutische Antikörper Cetuximab inhibiert das Tumorwachstum, indem er an die ECD von EGFR bindet und dabei die Ligandenbindung und Rezeptoraktivierung unterbindet. Dieselben Eigenschaften weist das *single chain fragment variable* (scFv) 225 auf, das die gleiche Antigenbindungsdomäne besitzt. Ein weiteres scFv-Antikörperfragment, scFv(30), wurde in vorangegangenen Arbeiten der Gruppe aus einer scFv-Bibliothek isoliert und bindet als zytoplasmatisch stabil exprimierbares Molekül an die intrazelluläre Domäne (ICD) des EGFR.

Im ersten Teil dieser Arbeit wurde das bislang unbekannte Epitop des scFv(30) Antikörperfragments mittels Peptid-Spotting Experimenten bestimmt. Die Bindungsstelle des scFv(30) Proteins wurde dabei am C-terminalen Ende der EGFR Sequenz lokalisiert und umfasst die Aminosäuresequenz GIFKGSTAE (AS 1161-1169 des reifen EGFR Proteins).

Die Expression von Antikörperfragmenten als sogenannte Intrabodies in Tumorzellen stellt einen wirkungsvollen Ansatz zur selektiven Interferenz mit wichtigen physiologischen und pathophysiologischen Prozessen dar. Im zweiten Teil der vorgelegten Arbeit wurde das EGFR-ECD-spezifische Antikörperfragment scFv(225) über eine Transmembrandomäne und eine flexible Gelenkregion mit dem EGFR-ICD-spezifischen scFv(30) Molekül zu einem neuartigen bispezifischen Antikörper verbunden. Die konstitutive Expression dieses 225.TM.30 Intrabodies und der monospezifischen Variante 225.TM nach lentiviraler Transduktion von EGFR-überexprimierenden MDA-MB468 und A431 Tumorzellen resultierte in einer substantiellen Reduktion der EGFR-Oberflächenexpression und einer Blockierung der Liganden-induzierten EGFR-Autophosphorylierung, begleitet von einer deutlichen Inhibition des Zellwachstums. Eine weitere Analyse der 225.TM.30-induzierten molekularen

Prozesse in diesen Tumorzellen im Vergleich zu den beiden monospezifischen Varianten 225.TM und TM.30 erfolgte mittels eines Tetracyclin-induzierbaren Expressionssystems. Dazu wurden A431, MDA-MB468 und EGFR-negative MDA-MB453 Zellen zunächst mit retroviralen Vektorpartikeln transduziert, die für den optimierten reversen Tetracyclin-kontrollierten Transaktivator (M2) kodieren. Anschließend erfolgte die Transduktion mit retroviralen transmembranen Antikörperkonstrukten, kontrolliert von einem Tetracyclin-induzierbaren Promoter (T6). Die Doxycyclin (Dox)-induzierte Expression von 225.TM.30 und 225.TM bestätigte die im konstitutiven Expressionssystem beobachteten Ergebnisse. TM.30-exprimierende Zellen zeigten dagegen keinen Unterschied in der Oberflächenexpression oder Aktivierbarkeit von EGFR zu parentalen Zellen, wiesen aber dennoch eine deutliche Inhibition des Wachstums auf. Konfokale Laserscanning Mikroskopie Studien zeigten eine Co-Lokalisation von 225.TM und EGFR hauptsächlich an der Zelloberfläche, während 225.TM.30 und TM.30 im endoplasmatischen Retikulum detektiert wurden und EGFR in diesem Kompartiment festhielten. Die TM.30/EGFR-Komplexe im ER könnten eine ER-Stress-Antwort auslösen und damit das reduzierte Wachstum TM.30-exprimierender Zellen erklären. Tatsächlich wurden in MDA-MB468/M2/iTM.30 und A431/M2/iTM.30 Zellen erhöhte Proteindisulfidisomerase (PDI) und teilweise GRP78/BiP Proteinmengen detektiert, die auf eine ER-Stress-Antwort hindeuten. Das bispezifische 225.TM.30 Molekül vereinte die Eigenschaften der monospezifischen Antikörpervarianten. Es hielt wie TM.30 Anteile des EGFR im ER zurück und war wie 225.TM in der Lage, die EGFR-Oberflächenexpression zu reduzieren und die EGFR-Autophosphorylierung zu inhibieren.

Die Expression der drei transmembranen Antikörper in EGFR-negativen MDA-MB453/M2 Zellen hatte dagegen keinen Einfluss auf das Wachstum dieser Zellen, was die EGFR-Spezifität der vorgestellten Moleküle unterstreicht.

Im letzten Teil der vorgelegten Arbeit wurde die scFv(225) Domäne in 225.TM.30 gegen das ErbB2-ECD-spezifische scFv(FRP5) Molekül ausgetauscht, und somit ein ErbB2-ECD- und EGFR-ICD-spezifischer Intrabody generiert (5.TM.30). Nach der Dox-induzierten Expression des 5.TM.30 Moleküls in EGFR- und/oder ErbB2-exprimierenden Tumorzellen wurde die Funktionalität beider Bindungsdomänen verifiziert. Die 5.TM.30 Expression resultierte dabei in ErbB2-positiven Tumorzellen in einer verringerten Oberflächen- und Gesamtexpression von ErbB2 und in EGFR-positiven Zellen in einer Reduktion der EGFR-Gesamtproteinmenge. Dies lässt auf eine erhöhte, 5.TM.30-induzierte Degradation der beiden Rezeptoren schließen. Die Expression des 5.TM.30 Proteins führte zudem zu einer Inhibition des Wachstums EGFR- und/oder ErbB2-positiver Zellen. Weiterhin wurde auch in 5.TM.30-exprimierenden MDA-MB468/M2 Zellen, wie für 225.TM.30 und TM.30 beschrieben, eine Co-Lokalisation des transmembranen Antikörperfragments mit EGFR im ER gezeigt.

Die in dieser Arbeit vorgestellten Ergebnisse weisen erstmals die Funktionalität von membranverankerten mono- und bispezifischen Antikörpermolekülen als Intrabodies nach, und zeigen ihr Potenzial zur gerichteten Interferenz mit der Wachstumsfaktor-abhängigen Signaltransduktion. Durch den Austausch der extra- und intrazellulären Antikörperdomänen könnte diese Strategie ebenso zur Analyse oder Blockade weiterer Signalmoleküle und Signalkomplexe eingesetzt werden.

Inhaltsverzeichnis

Deckblatt

Eidesstattliche Erklärung

Zusammenfassung

Inhaltsverzeichnis

Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Entstehung von Krebs	1
1.2	Die Bedeutung von ErbB-Rezeptoren bei der Tumorentstehung	5
1.2.1	Die ErbB-Rezeptortyrosinkinase-Familie und ihre Liganden	5
1.2.2	Struktureller Aufbau und Aktivierungsmechanismus der ErbB-Rezeptoren	7
1.2.3	EGFR- und ErbB2-aktivierte Signaltransduktion	10
1.2.4	Dysregulation von EGFR und ErbB2 in Tumorzellen	12
1.3	Inhibition der onkogenen EGFR- und ErbB2-Signaltransduktion	17
1.3.1	Tyrosinkinase-Inhibitoren	17
1.3.2	Monoklonale Antikörper	18
1.4	Intrazelluläre scFv-Antikörperfragmente (Intrabodies)	20
1.5	Ziel dieser Arbeit	21
2	Material und Methoden	23
2.1	Materialien	23
2.1.1	Chemikalien und Verbrauchsmaterialien	23
2.1.2	Antikörper	24
2.1.3	Plasmide	26
2.1.4	Zelllinien und Kulturbedingungen	27
2.1.5	Bakterienstämme	28
2.1.6	Oligonukleotide	28
2.2	Methoden	30
2.2.1	Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)	30
2.2.2	Hybridisierung von DNA-Fragmenten	31
2.2.3	Elektrophoretische Auftrennung von DNA-Fragmenten mittels Agarosegel	31
2.2.4	Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen	31
2.2.5	Restriktionsverdau von Plasmid-DNA und DNA-Fragmenten	31
2.2.6	Dephosphorylierung linearisierter Plasmide	32
2.2.7	Ligation von Plasmid-DNA und DNA-Fragmenten	32
2.2.8	Herstellung chemokompetenter Bakterien	33
2.2.9	Transformation von Plasmid-DNA in <i>E. coli</i>	33
2.2.10	Isolierung von Plasmid-DNA aus <i>E. coli</i>	34
2.2.11	Isolierung von genomischer DNA aus humanen Zellen	34
2.2.12	DNA-Sequenzierung	34
2.2.13	scFv(30) Antikörperfragment Epitop-Mapping	34

2.2.14	Produktion von lenti- oder γ -retroviralen Vektorpartikeln in 293T Zellen	35
2.2.15	Bestimmung des Vektortiters	36
2.2.16	Virale Transduktion nach der Spinfection Methode	36
2.2.17	Herstellung von Zelllysaten	36
2.2.18	SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	37
2.2.19	Immunoblot Analyse (Westernblot und Alkalische Phosphatase Blot)	38
2.2.20	Co-Immunpräzipitation	40
2.2.21	Durchflusszytometrische Analyse (FACS)	40
2.2.22	MTT-Proliferationstest	41
2.2.23	Kristallviolett-Assay	41
2.2.24	Immunfluoreszenzfärbungen und konfokale Laserscanning Mikroskopie	42
3	Ergebnisse	43
3.1	Bestimmung der Bindungsstelle des EGFR-spezifischen Antikörperfragments scFv(30)	44
3.2	Ableitung der EGFR-bindenden mono- und bispezifischen Antikörperfragmente 225.TM und 225.TM.30	47
3.2.1	Konstruktion und Expression von 225.TM.30 und 225.TM	48
3.2.2	Einfluss der Proteine 225.TM und 225.TM.30 auf die Expression und Phosphorylierung von EGFR	52
3.2.3	Einfluss der konstitutiven Expression von 225.TM.30 und 225.TM auf das Wachstum EGFR-positiver Zellen	56
3.2.4	Zusammenfassung der Abschnitte 3.2.1-3.2.3	58
3.3	Etablierung eines Tetracyclin-induzierbaren γ-retroviralen Expressionssystems	59
3.3.1	Funktionsprinzip	59
3.3.2	Generierung induzierbarer Zelllinien	60
3.3.3	Bestimmung der Dox-Konzentration für maximale Induktion	63
3.3.4	Analyse der An- und Abschaltkinetik des Systems	64
3.3.5	Zusammenfassung der Abschnitte 3.3.1-3.3.4	65
3.4	Einfluss der induzierbaren Expression transmembraner Antikörperfragmente auf EGFR-exprimierende Zellen	66
3.4.1	Generierung des monospezifischen transmembranen Antikörperfragments TM.30	66
3.4.2	Induzierte Expression der Proteine 225.TM, 225.TM.30 und TM.30	67
3.4.3	Bindung von 225.TM, 225.TM.30 und TM.30 an EGFR	69
3.4.4	Einfluss der transmembranen Antikörperfragmente auf die EGFR Expression	71
3.4.5	Einfluss der Expression von 225.TM, 225.TM.30 und TM.30 auf das Wachstum EGFR-positiver Tumorzellen	76
3.4.6	Intrazelluläre Lokalisierung von EGFR und transmembranen Antikörperfragmenten	82

3.4.7	Auslösung einer ER-Stress-Antwort der Zelle nach Expression transmembraner Antikörperfragmente	87
3.4.8	Zusammenfassung der Abschnitte 3.4.1-3.4.7	89
3.5	Generierung eines EGFR- und ErbB2-bindenden bispezifischen transmembranen Antikörperfragments	90
3.5.1	Konstruktion des Antikörperfragments 5.TM.30	91
3.5.2	Induzierte Expression von 5.TM.30 und Bindung an EGFR	92
3.5.3	Einfluss von 5.TM.30 auf die Expression von EGFR und ErbB2	94
3.5.4	Einfluss der Expression von 5.TM und 5.TM.30 auf das Wachstum EGFR- und ErbB2-positiver Zellen	97
3.5.5	Lokalisierung von 5.TM.30 und EGFR in Tumorzellen	100
3.5.6	Zusammenfassung der Abschnitte 3.5.1-3.5.5	103
4	Diskussion	104
4.1	Bestimmung der Bindungsstelle des EGFR-spezifischen Antikörperfragments scFv(30)	105
4.2	Generierung von Tumorzellen, die EGFR-mono- und -bispezifische transmembrane Antikörperfragmente konstitutiv exprimieren	106
4.3	Einfluss der konstitutiven Expression von transmembranen Antikörperfragmenten auf EGFR und das Wachstum von Tumorzellen	108
4.4	Generierung von Tumorzellen zur induzierbaren Expression transmembraner Antikörperfragmente	111
4.5	Einfluss der induzierten Expression EGFR-spezifischer transmembraner Antikörperfragmente auf Tumorzellen	113
4.6	Einfluss der induzierbaren Expression eines EGFR- und ErbB2-bindenden bispezifischen transmembranen Antikörperfragments auf Tumorzellen	120
4.7	Ausblick	124
5	Literaturverzeichnis	127
6	Abkürzungsverzeichnis	138
Danksagung/Veröffentlichungen/Lebenslauf		

Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

Abbildung	Titel	Seite
Abb. 1.1.1	„Hallmarks of Cancer“.	2
Abb. 1.2.1	Schematische Darstellung der ErbB-Rezeptortyrosinkinasen und ihrer Liganden.	7
Abb. 1.2.2	Schematische Darstellung des Aufbaus und der Aktivierung von EGFR und ErbB2.	9
Abb. 1.2.3	EGFR-Signalweiterleitung.	10
Abb. 1.2.4	Mechanismen, die zur onkogenen Signalweiterleitung von EGFR führen.	13
Abb. 3.1.1	Bindung von rekombinatem scFv(30) Protein an EGFR aus Zelllysaten.	45
Abb. 3.1.2	Untersuchung der minimalen EGFR-Bindungsstelle von scFv(30).	46
Abb. 3.1.3	Schematische Darstellung der scFv(30) Bindungsstelle im EGFR.	47
Abb. 3.2.1	Schematische Darstellung des Aufbaus und der Bindungsstellen der mono- und bispezifischen transmembranen Antikörperfragmente 225.TM und 225.TM.30.	48
Abb. 3.2.2	Ableitung der 225.TM.30 und 225.TM Konstrukte aus der bereits vorhandenen Sequenz 225.TM.28.z.	49
Abb. 3.2.3	Schematische Darstellung der Generierung lentiviral transduzierter Zellen.	50
Abb. 3.2.4	Nachweis der Expression von 225.TM.30 und 225.TM Proteinen in Karzinomzellen.	51
Abb. 3.2.5	Untersuchung der EGFR Expression in 225.TM.30- oder 225.TM-exprimierenden Zellen.	53
Abb. 3.2.6	Untersuchung der ErbB2-Expression in 225.TM.30- oder 225.TM-exprimierenden MDA-MB453 Zellen.	54
Abb. 3.2.7	Untersuchung der EGFR-Aktivierung in 225.TM.30- bzw. 225.TM-exprimierenden A431 und MDA-MB468 Zellen.	55
Abb. 3.2.8	Analyse der Proliferation von 225.TM.30- und 225.TM-exprimierenden Zellen.	57
Abb. 3.2.9	Analyse des Anteils EGFP-positiver Zellen in kontinuierlicher Kultur.	58
Abb. 3.3.1	Schematische Darstellung des Tetracyclin (Dox)-induzierbaren Systems.	61
Abb. 3.3.2	Nachweis der Insertion des M2-Gens in die genomische DNA ES.1-2(M2N)p transduzierter Zellen.	61
Abb. 3.3.3	Nachweis der Funktionalität des M2 Proteins in retroviral transduzierten Zellen.	62
Abb. 3.3.4	Expression von Luz-EGFP in MDA-MB468/M2/Img* Zellen in Abhängigkeit von der Dox-Konzentration.	63
Abb. 3.3.5	Untersuchung der Anschließkinetik der Dox-induzierten Proteinexpression.	64
Abb. 3.3.6	Untersuchung der Abschaltkinetik der Dox-induzierten Proteinexpression.	65
Abb. 3.4.1	Ableitung der TM.30 Sequenz aus dem Konstrukt pMA-225.TM.30.	67
Abb. 3.4.2	Nachweis der Dox-induzierten Expression mono- und bispezifischer transmembraner Antikörpermoleküle.	68
Abb. 3.4.3	Nachweis der Dox-induzierten Oberflächenexpression von 225.TM (links) und 225.TM.30 (rechts) Antikörpermolekülen auf MDA-MB453/M2 Zellen.	69
Abb. 3.4.4	Bindung mono- und bispezifischer transmembraner Antikörperfragmente an EGFR.	70
Abb. 3.4.5	Untersuchung der EGFR-Expression in 225.TM.30-, 225.TM- und TM.30-exprimierenden Zellen.	72
Abb. 3.4.6	Untersuchung der ErbB2-Expression in 225.TM.30-, 225.TM- und TM.30-exprimierenden Zellen.	73
Abb. 3.4.7	Analyse der EGFR-Aktivierung in A431/M2 (A/B) bzw. MDA-MB468/M2 (C) Zellen nach Induktion der Expression transmembraner Antikörperfragmente.	75
Abb. 3.4.8	Proliferation EGFR-überexprimierender Zellen nach Induktion der Expression transmembraner Antikörperfragmente.	77
Abb. 3.4.9	Langzeitwachstum EGFR-überexprimierender Zellen nach Induktion der Expression transmembraner Antikörperfragmente.	78
Abb. 3.4.10	Proliferation EGFR-negativer Tumorzellen nach Induktion der Expression transmembraner Antikörperfragmente.	79

Abb. 3.4.11	Anteil apoptotischer Zellen nach Induktion der Expression transmembraner Antikörperfragmente.	80
Abb. 3.4.12	Apoptose- und Proliferationsanalyse von A431/M2/Img* und A431/M2/iscFv(30) Kontrollzellen.	82
Abb. 3.4.13	Lokalisierung von transmembranen Antikörperfragmenten und EGFR in MDA-MB468/M2 Zellen.	84
Abb. 3.4.14	Lokalisierung von transmembranen Antikörperfragmenten in EGFR-negativen MDA-MB453/M2 Zellen.	85
Abb. 3.4.15	Lokalisierung von EGFR nach Expression transmembraner Antikörperfragmente in MDA-MB468/M2 Zellen.	86
Abb. 3.4.16	ER-Stress-Analyse in A431/M2 (A), MDA-MB468/M2 (B) und MDA-MB453/M2 (C) Zellen nach Induktion der Expression transmembraner Antikörperfragmente.	88
Abb. 3.5.1	Schematische Darstellung des Aufbaus und der Bindungsstellen der mono- und bispezifischen transmembranen Antikörperfragmente 5.TM und 5.TM.30.	91
Abb. 3.5.2	Ableitung der 5.TM.30 und 5.TM Konstrukte.	92
Abb. 3.5.3	Nachweis der induzierten Oberflächenexpression der 5.TM und 5.TM.30 Proteine.	93
Abb. 3.5.4	Nachweis der 5.TM.30 Bindung an EGFR in A431/M2/i5.TM.30 und MDA-MB468/M2/i5.TM.30 Zellen.	94
Abb. 3.5.5	Analyse der EGFR- und ErbB2-Expression in Tumorzellen nach induzierter Expression der Antikörperfragmente 5.TM und 5.TM.30.	96
Abb. 3.5.6	Proliferation von Tumorzellen nach Induktion der Expression transmembraner Antikörperfragmente.	97
Abb. 3.5.7	Langzeitwachstum von Tumorzellen nach Induktion der Expression von 5.TM.30 und 5.TM.	98
Abb. 3.5.8	Untersuchung des Anteils apoptotischer Zellen nach Induktion der 5.TM.30 und 5.TM Proteinexpression.	99
Abb. 3.5.9	Intrazelluläre Lokalisation der 5.TM.30 oder 5.TM Moleküle.	101
Abb. 3.5.10	ER-Stress-Analyse in 5.TM.30-exprimierenden Tumorzellen.	102
Abb. 4.5.1	Mögliche Funktionsweise der mono- und bispezifischen transmembranen Antikörperfragmente.	117
Tabelle	Titel	Seite
Tab. 1.2.1	Überblick über EGFR- und ErbB2-Mutationen.	14/15
Tab. 1.2.2	Dysregulation von EGFR und ErbB2 in Tumorzellen.	16/17
Tab. 2.1	Zusammensetzung verschiedener Trenngele	37
Tab. 2.2	Zusammensetzung verschiedener Sammelgele	38

1 Einleitung

1.1 Entstehung von Krebs

Als Krebs werden bösartige (maligne) Gewebeausbildungen (Tumoren, Neoplasien) bezeichnet, deren Entstehung u.a. auf unkontrollierte Zellproliferation zurückzuführen ist. Ferner bilden maligne Tumoren oftmals Metastasen in entfernten Körperregionen aus. Im Gegensatz dazu sind gutartige (benigne) Neoplasien nicht in der Lage, zerstörend in andere Gewebe einzuwachsen oder zu metastasieren (<http://www.krebsinformationsdienst.de>). Krebs ist nach Herz-Kreislauferkrankungen die zweithäufigste Todesursache in industrialisierten Ländern. Im Jahr 2008 erkrankten etwa 470000 Patienten in Deutschland neu an Krebs, für das Jahr 2012 wurden etwa 490000 Neudiagnosen prognostiziert (Krebs in Deutschland 2007/2008, <http://www.krebsdaten.de>).

Aktuell werden vornehmlich zwei, sich nicht unbedingt ausschließende Modelle der Krebsentstehung diskutiert: Das Prinzip der „klonalen Evolution“, das bereits 1976 von Peter Nowell aufgebracht wurde (Nowell, 1976), und die „Krebsstammzell“-Hypothese, die bereits 1875 zum ersten Mal postuliert wurde (Cohnheim, 1875). Das Modell der „klonalen Evolution“ beschreibt Krebs, parallel zur Darwin'schen natürlichen Selektion, als einen evolutionären Prozess, der durch schrittweise somatische Zellmutationen und sequenzielle, subklonale Selektion getrieben wird (Greaves und Maley, 2012). Krebscharakteristika, wie phänotypische Heterogenität, genetische Instabilität und die Entwicklung von Resistenzen gegenüber Chemotherapeutika können mit diesem Modell problemlos beschrieben werden (Hanahan und Weinberg, 2000; Shah und Sawyers, 2003; Marusyk *et al.*, 2009). Im Gegensatz zur „klonalen Evolutions“-Theorie, die jeder einzelnen Zelle im Tumor das gleiche Potential zuspricht den Tumor zu erhalten und Metastasen auszubilden, sind laut „Krebsstammzell“-Theorie nur Zellen dazu in der Lage, die spezielle Stammzeleigenschaften aufweisen (Pietras, 2011). Diese Krebsstammzellen oder Tumor-initiiierenden Zellen haben u.a. unbegrenztes Proliferationspotential und können sich zu ausdifferenzierten Krebszellen entwickeln (Mani *et al.*, 2008).

Krebs entsteht durch einen mehrschrittigen Prozess, in dem normale Zellen durch „*gain-of-function*“ Mutationen, Amplifikation und/oder Überexpression von Onkogenen, sowie durch „*loss-of-function*“ Mutationen, Deletion und/oder epigenetisches Abschalten von Tumorsuppressorgenen, spezielle Merkmale erlangen, die zur (malignen) Transformation beitragen (Hahn, 2002). Diese speziellen Merkmale wurden von Hanahan und Weinberg als „*Hallmarks of Cancer*“ (Abb. 1.1.1) zusammengefasst und beinhalten: Die Entwicklung von Resistenzen gegenüber Wachstumsinhibitoren sowie apoptotischen Signalen und Immunzellen, die Fähigkeit, sich unabhängig von dem Vorhandensein externer Wachstumssignale unbegrenzt zu teilen und dabei den Energiehaushalt den Bedürfnissen

anzupassen, außerdem die Möglichkeit, Angiogenese auszulösen und Metastasen zu bilden. Diese Kennzeichen ermöglichen es Krebszellen zu überleben, zu proliferieren und sich zu verbreiten. Begünstigt werden diese Charakteristika durch genomische Instabilität (Hanahan und Weinberg, 2000; Hanahan und Weinberg, 2011).

Die natürliche spontane Mutationsrate ist nicht ausreichend, um genetische Veränderungen in Zellen zu akkumulieren, die zur Transformation führen (Cahill *et al.*, 1999). Somit müssen Krebszellen spezielle Eigenschaften entwickelt haben, die eine Erhöhung der Mutationsrate zulässt. Im Vergleich zu gesunden Körperzellen weisen Krebszellen beispielsweise oftmals eine erhöhte Anfälligkeit gegenüber Mutagenen auf, die u.a. auf das Fehlen von Proteinen, die eine wichtige Funktion während der Zellteilung (z.B. p53) oder in der DNA-Reparaturmaschinerie spielen, zurückzuführen ist (Jackson und Bartek, 2009; Negrini *et al.*, 2010).

In den letzten Jahren konnte weiterhin gezeigt werden, dass das Tumorstadium durch die Infiltration mit Zellen des angeborenen Immunsystems begünstigt wird (DeNardo *et al.*, 2010). Dabei werden durch die ausgelöste Entzündungsreaktion Biomoleküle wie Wachstumsfaktoren, proangiogene Faktoren, sowie Enzyme, die die extrazelluläre Matrix modifizieren, ausgeschüttet. Diese wiederum tragen zur Erlangung der bereits erwähnten „Hallmarks“, wie Angiogenese, Metastasierung und anhaltendem Wachstum bei (Grivennikov und Karin, 2010; Qian und Pollard, 2010).

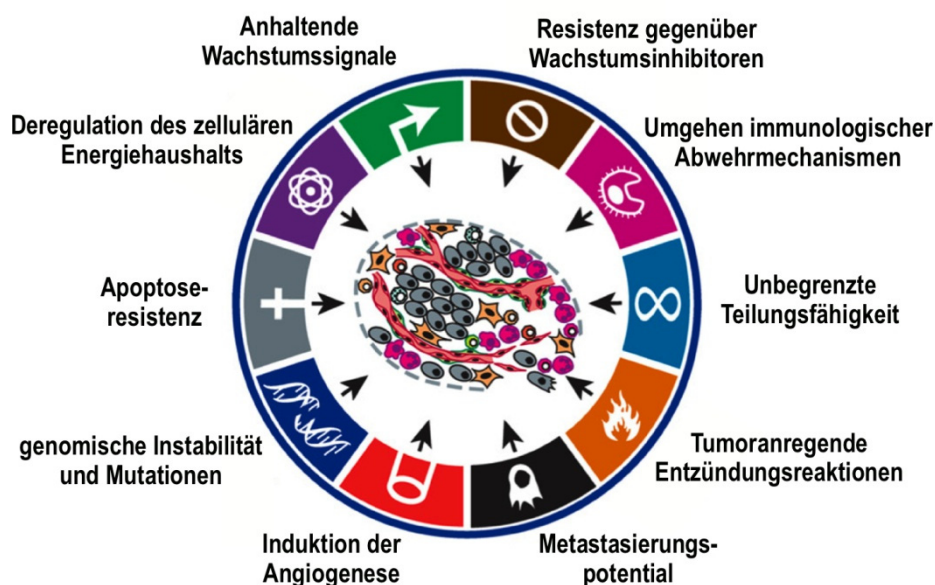


Abbildung 1.1.1 „Hallmarks of Cancer“. Für die maligne Transformation ist der Erwerb verschiedener Charakteristika essentiell, die den meisten, wenn nicht sogar allen malignen, entarteten Zellen gemein sind. Dies geschieht durch unterschiedliche Mechanismen und in unterschiedlicher Chronologie (verändert nach (Hanahan und Weinberg, 2011)). Nähere Erläuterungen siehe Text.

Normale Zellen benötigen mitogene Wachstumssignale, um proliferieren zu können. Zur Aufrechterhaltung homöostatischer Zellzahlen und damit der Gewebearchitektur, ist die Produktion und Sekretion dieser Faktoren strengstens reguliert. Krebszellen hingegen haben Mechanismen entwickelt, die sie von exogenen Wachstumssignalen unabhängig machen. Dazu zählt die autokrine Produktion von Wachstumsfaktoren oder von Molekülen, die benachbarte Zellen zur Sekretion dieser Wachstumssignale anregen (Bhowmick *et al.*, 2004; Cheng *et al.*, 2008). Weiterhin können erhöhte Mengen an Wachstumsfaktor-Rezeptoren, wie ErbB-Rezeptoren, exprimiert werden (Fedi, 1997). Ebenso funktionieren MAPK- bzw. PI3K-Signalwege durch Mutationen in Wachstumsfaktor-Rezeptoren oder in intrazellulären Signalmolekülen, wie B-Raf oder PI3K, Wachstumsfaktor-unabhängig (Jiang und Liu, 2009; Davies und Samuels, 2010). Auch Defekte in negativen Regulationsmolekülen, wie Ras, dessen normale Funktion sicherstellt, dass proliferative Signale nur transient weitergeleitet werden, oder der PTEN Phosphatase als Gegenspieler der PI-3-Kinase, führen zur gesteigerten Proliferation in Krebszellen (Yuan und Cantley, 2008; Jiang und Liu, 2009).

Neben der Unabhängigkeit von Wachstumssignalen sind Krebszellen oft auch resistent gegenüber Wachstumsinhibitoren. Dabei spielen „*loss-of-function*“ Mutationen u.a. der beiden Tumorsuppressorproteine Retinoblastoma-assoziiertes Protein (pRb) und p53 die größte Rolle. Hypophosphoryliertes pRb sequestriert die E2F Transkriptionsfaktoren und inhibiert damit den Fortlauf des Zellzyklus (Weinberg, 1995). Das p53 Protein detektiert Stresssignale: Bei zu starken Schäden an der zu replizierenden DNA oder zu niedrigem Glukose-, Nukleotid- oder Sauerstoffniveau, hält p53 den Zellzyklus kurzzeitig an, was entweder die Reparatur des DNA-Strangs ermöglicht oder die Zelle in die Apoptose treibt (Sherr und McCormick, 2002). Weiterhin wurde gezeigt, dass der eigentlich anti-proliferative TGF β -Signalweg in fortgeschrittenen Tumoren *epithelial-to-mesenchymal transition* (EMT) auslöst, durch die transformierte, epitheliale Tumorzellen die Fähigkeiten erlangen, in anliegende Gewebe einzudringen und sich über die Lymph- und Blutbahnen zu verbreiten (Invasion und Metastasierung) (Klymkowsky und Savagner, 2009). Im Prozess der Invasion und Metastasierung spielen vor allem der Verlust von Zelladhäsionsmolekülen (CAMs), Cadherinen und Integrinen, sowie die Expression und Aktivierung von extrazellulären Proteasen, die die extrazelluläre Matrix abbauen, eine wichtige Rolle (Johnson, 1991; Coussens und Werb, 1996; Varner und Cheresch, 1996; Aplin *et al.*, 1998).

Ein weiteres Kennzeichen von Krebszellen ist die Resistenz gegenüber apoptotischen Signalen. Der häufigste Mechanismus ist der Funktionsverlust des p53 Proteins. Alternativ überexprimieren maligne Zellen antiapoptotische Regulatoren, wie Bcl-2 bzw. Bcl-x_L, oder Überlebenssignale, wie IGF1/2. Weitere Möglichkeiten sind die Herunterregulation proapoptotischer Faktoren, wie Bax, Bim und Puma, bzw. die Inhibition der extrinsischen

Apoptosewege (Hueber *et al.*, 1997). Dazu führen u.a. der Funktionsverlust des Fas/FasL Rezeptorsystems, mittels Herunterregulierung des Rezeptors auf Krebszellen, sowie die fehlerhafte Expression von zytosolischen Komponenten der Todes-Rezeptor-vermittelten Apoptose-Signaltransduktion (Caspasen, FADD, c-FLIP) (Plati *et al.*, 2008).

Für eine unbegrenzte Teilungsfähigkeit sind eine gesteigerte Proliferationsrate und Apoptoseresistenz allein nicht ausreichend. Nicht-immortalisierte Zellen haben nur ein begrenztes Teilungsvermögen, bevor sie in die Seneszenz übergehen oder durch Apoptose sterben (Hayflick, 1997). Bei diesem Mechanismus spielen u.a. Telomere, Tandem-Hexanukleotid-Wiederholungen, die das Ende des Chromosoms schützen, eine wichtige Rolle. Bei jeder Zellteilung verkürzen sich die Telomere, bis sie die schützende Funktion verlieren und es zu End/End-Fusionen der Chromosomen und im Folgenden zum Zelltod kommt (Counter *et al.*, 1992). Neunzig Prozent immortalisierter Zellen exprimieren eine Polymerase (Telomerase), die Telomer-Wiederholungssegmente an das Ende der telomeren DNA anhängt und somit die Erosion der Telomere, und damit Seneszenz bzw. Apoptose, verhindert (Bryan *et al.*, 1995).

Um die erhöhte Proliferationsrate aufrecht zu erhalten und die Versorgung aller Zellen der Tumormasse mit genügend Nährstoffen und Sauerstoff zu gewährleisten, müssen neoplastische Zellen ausreichend Energie aufbringen. In Krebszellen wird daher häufig eine Überexpression von Glukosetransportern (v.a. GLUT1) beobachtet (DeBerardinis *et al.*, 2008; Hsu und Sabatini, 2008; Jones und Thompson, 2009). Diese sorgen für eine erhöhte Aufnahme von Glukose in das Zytoplasma, die dort hauptsächlich über die Glykolyse (aerobe Glykolyse; Warburg Effekt) verstoffwechselt wird (Warburg, 1956). Die Hochregulation der Glykolyse wird dabei entweder durch das Ras Onkoprotein oder die in Tumoren oft vorherrschende Hypoxie ausgelöst, die beide unabhängig voneinander die Mengen an HIF1 α und HIF2 α Transkriptionsfaktoren erhöhen können (Semenza, 2010). Um die Versorgung aller Zellen mit ausreichend Nährstoffen und Sauerstoff zu gewährleisten, sekretieren Tumorzellen proangiogene Faktoren, die die Bildung neuer Blutgefäße (Angiogenese) in der Tumormasse induzieren (Hanahan *et al.*, 1996).

Laut des Prinzips der *immune surveillance* kontrolliert das Immunsystem fortlaufend Zellen und Gewebe und ist in der Lage transformierte Zellen, die sogenannte tumorassoziierte Antigene (TAA) über MHC-Klasse I-Moleküle oder Immunzell-aktivierende Rezeptoren an der Zelloberfläche präsentieren, zu zerstören (Burnet, 1957; Old und Boyse, 1964; Vesely *et al.*, 2011). Dennoch entwickeln sich solide Tumoren, was darauf schließen lässt, dass sich diese Krebszellen der Kontrolle und Eliminierung durch das Immunsystem entziehen („*immune evasion*“) (Dunn *et al.*, 2002). Dazu tragen verschiedene Mechanismen bei. Zum einen exprimieren diese Krebszellen meist keine TAA und kein MHC I mehr oder sie haben

Fehlfunktionen in der Antigenprozessierungsmaschinerie entwickelt (Schreiber *et al.*, 2011). Zum anderen sekretieren Krebszellen immunsuppressive Zytokine, wie TGF β (Weber *et al.*, 2005). Weiterhin wurden regulatorische T-Zellen und myeloide Suppressorzellen im Tumorgewebe gefunden, die zur Inaktivierung anderer Immunzellen beitragen können (Du und Wang, 2011). Die sogenannte „*immunoediting*“ Hypothese hebt die dualen Wirtschützenden und Tumor-anregenden Eigenschaften des Immunsystems hervor (Schreiber *et al.*, 2011). Das „*immunoediting*“ verläuft in drei Phasen: Eliminierung, Gleichgewicht und *escape*. In der ersten Phase zerstören das angeborene und adaptive Immunsystem entstehende Tumoren bevor sie klinisch nachweisbar werden. Teilweise gibt es Krebszellen, die in der Eliminierungsphase nicht zerstört werden können, diese gehen dann in die Gleichgewichtsphase über, in der das klinische Auswachsen des Tumors durch verschiedene immunologische Mechanismen des adaptiven Immunsystems unterdrückt wird. Dieses Gleichgewicht kann möglicherweise lange aufrecht erhalten werden. Jedoch wirkt auf die genetisch instabilen Krebszellen in der Gleichgewichtsphase ein ständiger Selektionsdruck. Aus diesem können Tumorzellen entstehen, die nicht mehr durch das adaptive Immunsystem erkannt werden, gegenüber den Immuneffektormechanismen insensitiv werden oder einen immunsuppressives Milieu im Tumorumfeld induzieren. Diese Tumorzellen können dann in die *escape*-Phase eintreten und zu einer klinisch nachweisbaren Erkrankung auswachsen (Schreiber *et al.*, 2011).

1.2 Die Bedeutung von ErbB-Rezeptoren bei der Tumorentstehung

EGFR und die übrigen Mitglieder der ErbB-Rezeptor-Familie spielen eine essentielle Rolle bei der Regulation zahlreicher zellulärer Prozesse, wie Proliferation, Überleben und Migration. Die Dysregulation der Rezeptoraktivität und ein Ungleichgewicht im EGFR-Ligand-System sind häufig an der Entstehung von Tumoren epithelialen Ursprungs beteiligt. Krebspatienten mit veränderter EGFR-Aktivität im Tumor zeigen oft einen aggressiveren Krankheitsverlauf verbunden mit einer schlechten klinischen Prognose (Zandi *et al.*, 2007).

1.2.1 Die ErbB-Rezeptortyrosinkinase-Familie und ihre Liganden

Die ErbB-Rezeptor-Familie setzt sich aus vier Typ I Rezeptortyrosinkinasen (RTK) zusammen, dem epidermalen Wachstumsfaktor-Rezeptor (EGFR/ErbB/HER), ErbB2/Neu/HER2, ErbB3/HER3 und ErbB4/HER4 (siehe Abb. 1.2.1). Alle ErbB-Rezeptoren bestehen aus einer extrazellulären Ligandenbindungsdomäne, einer einzelnen α -helikalen Transmembrandomäne und einer zytoplasmatischen Domäne, die die enzymatische Kinasedomäne sowie eine C-terminale regulatorische Region (C-terminaler Schwanz) beinhaltet (Hynes *et al.*, 2001). Eine Ausnahme bildet dabei der ErbB3-Rezeptor, dessen

enzymatische Kinasedomäne inaktiv ist (Guy *et al.*, 1994). ErbB-Rezeptoren werden in einer Vielzahl von epithelialen, mesenchymalen oder neuronalen Geweben exprimiert (Yano *et al.*, 2003). Dort kommt ihnen eine wichtige Rolle bei der Entwicklung, Proliferation und Differenzierung des Gewebes, sowie zellulärer Migration und Überleben zu (Hynes *et al.*, 2001; Holbro und Hynes, 2004). Dysregulierte Expression von ErbB-Rezeptoren, besonders von EGFR und ErbB2, trägt kausal zur malignen Transformation zahlreicher humaner Tumoren epithelialen Ursprungs, z.B. bei Brust- oder Lungenkrebs, oder des Gehirns, z.B. Glioblastomen, bei (vgl. Tab. 1.2.2) (Andersson *et al.*, 2004; Holbro und Hynes, 2004; Zandi *et al.*, 2007).

Die Aktivierung der ErbB-RTKs erfolgt durch Ligandenbindung an die extrazelluläre Domäne, die zu Homo- oder Heterodimerisierung der Rezeptoren und anschließender Autophosphorylierung von Tyrosinen in der C-terminalen regulatorischen Rezeptordomäne führt (Burgess *et al.*, 2003; Burgess, 2008). Die Liganden sind Mitglieder der Familie der EGF-ähnlichen Wachstumsfaktoren und besitzen sechs Cysteinreste, die drei konservierte Disulfidbrücken bilden. Dies führt zu einer Unterteilung in den A-, B- und C-Loop (Ogiso *et al.*, 2002). Die EGF-ähnliche Domäne ist Teil eines transmembranen Vorläuferproteins, das durch Metalloproteasen gespalten wird, wodurch der lösliche Ligand freigesetzt wird. Expression und Prozessierung der Vorläuferproteine sind streng reguliert (Massague und Pandiella, 1993).

Die ErbB-Liganden können im Hinblick auf ihre Rezeptorspezifität in drei Gruppen unterteilt werden (siehe Abb. 1.2.1): die erste Gruppe bilden der epidermale Wachstumsfaktor (EGF), der transformierende Wachstumsfaktor α (TGF α) und Amphiregulin (AR), die ausschließlich an EGFR binden. Die zweite Gruppe beinhaltet Betacellulin (BTC), den Heparin-bindenden EGF-ähnlichen Wachstumsfaktor (HB-EGF) und Epiregulin (EPR), die sowohl spezifisch an EGFR als auch an ErbB4 binden. Die dritte Gruppe setzt sich aus den Neuregulinen (NRGs) zusammen und bildet, basierend auf der Bindungsspezifität für ErbB3 und ErbB4 (NRG1 und NRG2) oder nur ErbB4 (NRG3 und NRG4), zwei Untergruppen. Für ErbB2 ist kein natürlicher Ligand bekannt (Riese und Stern, 1998; Hynes *et al.*, 2001).

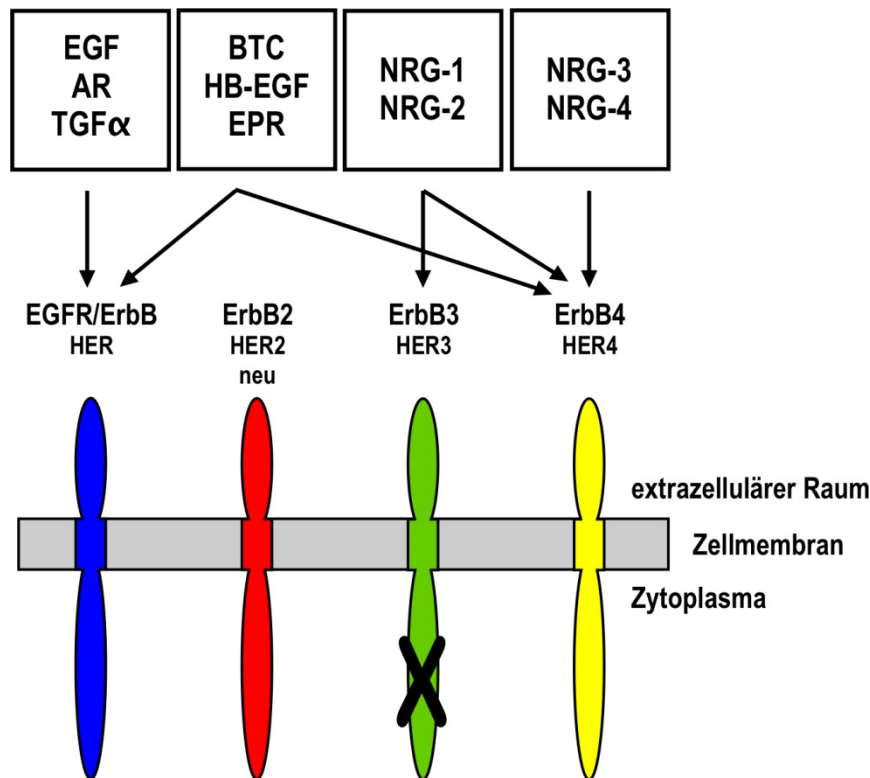


Abbildung 1.2.1 Schematische Darstellung der ErbB-Rezeptortyrosinkinasen und ihrer Liganden. Für ErbB2 ist kein natürlicher Ligand bekannt. Die enzymatisch inaktive Kinasedomäne von ErbB3 ist durch ein Kreuz gekennzeichnet. EGF = epidermaler Wachstumsfaktor; AR = Amphiregulin; TGF α = transformierender Wachstumsfaktor α ; BTC = Betacellulin; HB-EGF = Heparinbindender EGF-ähnlicher Wachstumsfaktor; EPR = Epiregulin; NRG = Neuregulin.

1.2.2 Struktureller Aufbau und Aktivierungsmechanismus der ErbB-Rezeptoren

Der epidermale Wachstumsfaktor-Rezeptor wurde als erste RTK entdeckt (Carpenter *et al.*, 1978). Die Identifizierung des Neu Proto-Onkogens in der Ratte und anschließend des dazu homologen humanen ErbB2/Her2 Gens folgten einige Jahre später (Schechter *et al.*, 1984; Coussens *et al.*, 1985). Die meisten Prinzipien und Paradigmen der Funktionsweise von RTKs wurden ursprünglich an EGFR untersucht und etabliert (Carpenter *et al.*, 1978; Schlessinger, 2000). Auch viele Mechanismen der Aktivierung und Rekrutierung intrazellulärer Signalwege wurden erstmals in Studien der EGFR-Signalleitung erforscht (Pawson *et al.*, 1993).

EGFR und ErbB2 sind stark glykosylierte Membranproteine mit einem Molekulargewicht von 170 bzw. 185 kDa. ErbB2 ist, nach Abspaltung des Signalpeptids, aus einer einzigen Polypeptidkette mit 1233 Aminosäuren aufgebaut, und besteht aus einer extrazellulären Domäne (ECD, AS 1-630), einer einzelnen Transmembrandomäne (TMD, AS 631-654) und einer zytosolischen Domäne (ICD, AS 655-1233) (UniProt P04626). EGFR besteht ohne Signalpeptid aus 1186 Aminosäuren (UniProt P00533: ECD AS 1-621, TMD AS 622-

644 und ICD AS 645-1186). Die ICD ist in eine konservierte Tyrosinkinasedomäne und flankierende regulatorische Bereiche (juxtamembranes Segment und C-terminaler Schwanz) unterteilt (Jura *et al.*, 2009). Die ECD wird in vier Subdomänen aufgeteilt: I, II, III und IV (bzw. L1, CR1, L2 und CR2) (siehe Abb. 1.2.2A) und liegt für EGFR, ErbB3 und ErbB4, ohne gebundenen Liganden, in einer autoinhibierten, nicht dimerisierbaren, *tethered* (= geschlossenen) Konformation vor (Ferguson *et al.*, 2003). Strukturanalysen der ErbB2-ECD ergaben allerdings eine nicht autoinhibierte *extended* (= offene) Konformation, in der die Dimerisierungsdomäne auch ohne Ligandenbindung frei zugänglich ist (Cho *et al.*, 2003; Alvarado *et al.*, 2009). Wie für EGF und TGF α in Co-Kristallisationsstudien mit EGFR gezeigt, ist die Bindungsstelle für Liganden der EGF-Familie in den Subdomänen I und III lokalisiert (Garrett *et al.*, 2002; Ogiso *et al.*, 2002). Die Ligandenbindung induziert eine Konformationsänderung, die dazu führt, dass der inaktivierende intramolekulare Kontakt zwischen dem Dimerisierungsarm II und der Ektodomäne IV (in der *tethered* Konformation) gelöst wird (Ferguson *et al.*, 2003). Damit ist der Dimerisierungsarm frei (*extended* Konformation) für die Bildung eines Homodimers mit einem weiteren EGFR Molekül oder eines Heterodimers mit einem anderen Mitglied der ErbB-Rezeptor-Familie, vorzugsweise ErbB2 (siehe Abb. 1.2.2A) (Graus-Porta *et al.*, 1997).

Ein kritischer Schritt in der EGFR-Aktivierung besteht in der Ausbildung eines asymmetrischen Kinasedimers, in dem die Interaktion des C-terminalen *lobe* der Aktivatorkinasedomäne und des N-terminalen *lobe* der Empfängerkinase zu einer Stabilisierung der aktiven Form der Empfängerkinase führt (Abb. 1.2.2A) (Zhang *et al.*, 2006). Die Ligandenbindungs-induzierte Rezeptordimerisierung resultiert in einer Konformationsänderung der trans- und juxtamembranen (TM bzw. JM) Abschnitte. Diese löst die autoinhibierenden Kontakte der JM-A Domäne mit der Zellmembran, wodurch schließlich das aktive asymmetrische Kinasedimer ausgebildet und stabilisiert wird (Jura *et al.*, 2009; Endres *et al.*, 2011; Arkhipov *et al.*, 2013; Endres *et al.*, 2013). Damit verbunden ist die ATP-abhängige intermolekulare Autophosphorylierung von mehreren Tyrosinresten im C-terminalen Schwanz (siehe Abb. 1.2.2B). Diese Phosphotyrosine (pTyr) dienen als Bindungsstellen für unterschiedliche Adaptormoleküle (siehe Abb. 1.2.2B) mit Src Homologie 2 (SH2)- oder Phosphotyrosinbindungsdomänen (PTB). Diese leiten die Aktivierung unterschiedlicher Signaltransduktionswege ein und fördern somit Zellmigration, -proliferation und -überleben (vgl. Abschnitt 1.2.3) (Olayioye *et al.*, 2000; Yarden und Sliwkowski, 2001; Schlessinger, 2004; Hynes und Lane, 2005; Schulze *et al.*, 2005; Wilson *et al.*, 2009). Weitere Tyrosine im C-terminalen Schwanz, darunter auch Tyr845, das in der EGFR-Aktivierungsschleife liegt, können durch Nicht-RTKs, wie beispielsweise die Sarcoma (Src) Kinase phosphoryliert werden (siehe Abb. 1.2.2B) (Sato *et al.*, 1995; Stover *et al.*, 1995).

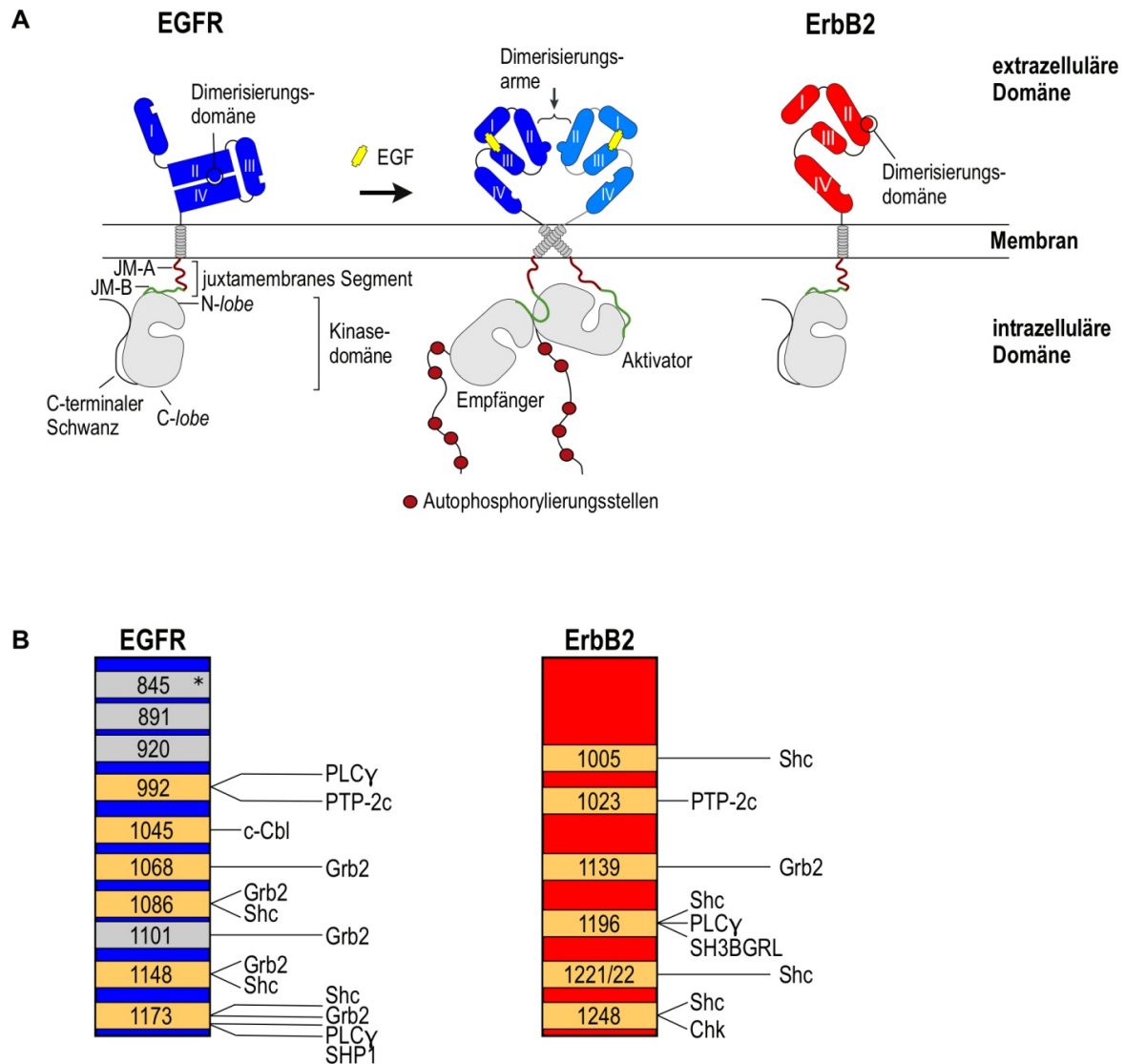


Abbildung 1.2.2 Schematische Darstellung des Aufbaus und der Aktivierung von EGFR und ErbB2. (A) Ligandenbindungs-induzierter Aktivierungsmechanismus. Die ErbB-Rezeptoren sind aus einer extrazellulären Ligandenbindungs- und Dimerisierungsdomäne, die über eine Transmembrandomäne und das juxtamembrane Segment (JM-A und JM-B) mit der C-terminalen Tyrosinkinase- und regulatorischen Domäne verbunden ist, aufgebaut. EGFR (wie ErbB3 und ErbB4) liegt zunächst in der sog. *tethered* (geschlossenen) Konformation vor, die keine Dimerisierung zulässt, während ErbB2 eine *extended* (offene) Konformation hat und damit immer zur Dimerisierung bereit ist. Nach Ligandenbindung kann EGFR homo- oder heterodimerisieren und sich ein aktives, asymmetrisches Kinasedimer bilden. Letzteres entsteht durch die Interaktion des N-lobes der Empfängerkinase mit dem C-lobe der Aktivator kinase. Dies resultiert in der Autophosphorylierung verschiedener Tyrosine im C-terminalen Schwanz. (modifiziert nach (Baselga und Swain, 2009; Jura *et al.*, 2009). **(B) Schematische Darstellung der autophosphorylierbaren Tyrosine und deren Bindungspartner in den C-terminalen Domänen von EGFR und ErbB2.** Tyrosine, die autophosphoryliert werden, sind gelb und durch die Src Kinase phosphorylierte Tyrosine sind hellblau unterlegt. pTyr845* liegt in der EGFR Aktivierungsschleife (modifiziert nach (Olayioye *et al.*, 2000; Hynes und Lane, 2005; Schulze *et al.*, 2005; Wilson *et al.*, 2009)).

1.2.3 EGFR- und ErbB2-aktivierte Signaltransduktion

Durch die Autophosphorylierung mehrerer Tyrosine am C-Terminus von EGFR und ErbB2 wird die Bindung unterschiedlicher Adaptormoleküle ermöglicht. Damit werden mehrere intrazelluläre Signalprozesse aktiviert, die untereinander verbunden sind. Abbildung 1.2.3 zeigt eine Auswahl der durch EGFR aktivierten Signaltransduktionswege.

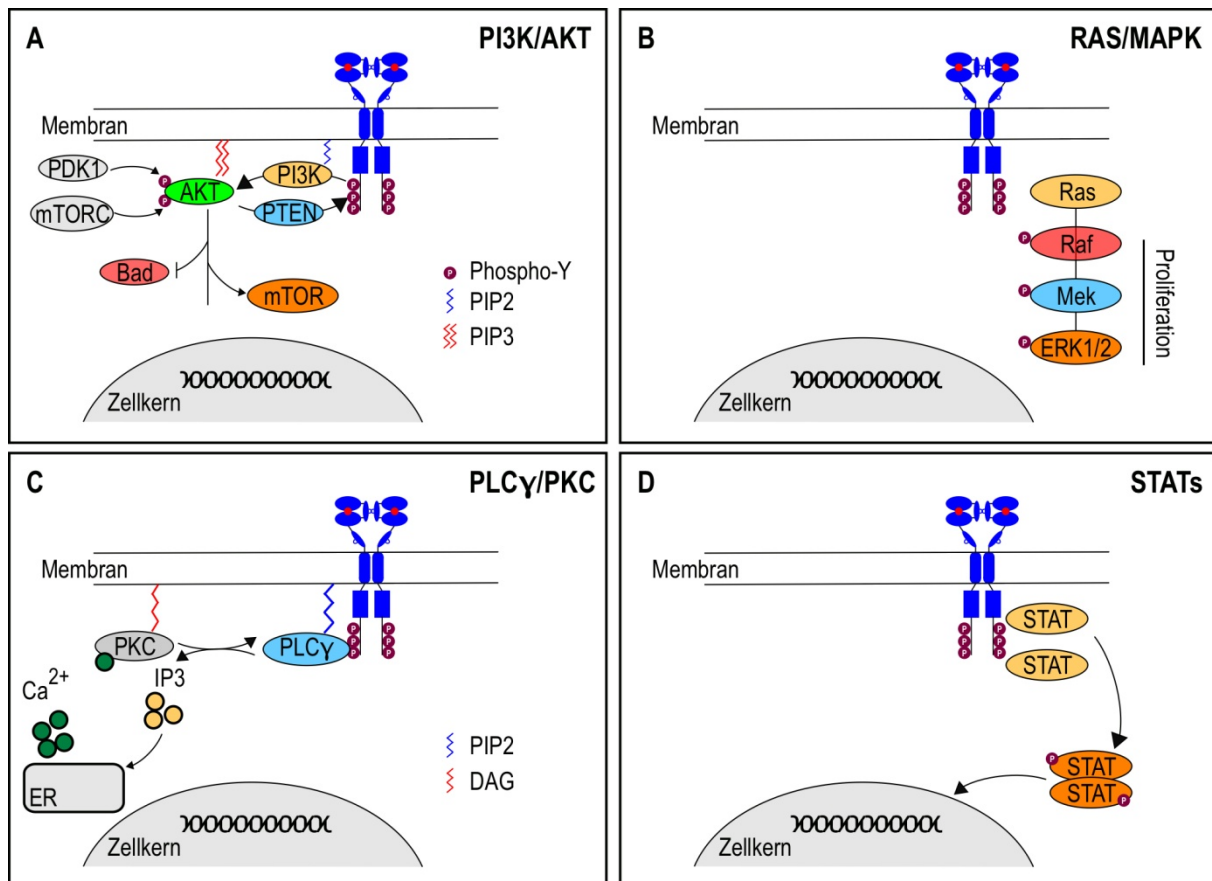


Abbildung 1.2.3 EGFR-Signalweiterleitung. Die Ligandenbindung an EGFR führt zur Rezeptordimerisierung, der Ausbildung aktiver, asymmetrischer Kinasedimere, Autophosphorylierung und Aktivierung einer Vielzahl weiterführender Signaltransduktionswege. Eine Auswahl dieser Signalwege ist hier gezeigt (modifiziert nach (Brand *et al.*, 2011)). Weitere Erläuterungen im Text. Verwendete Abkürzungen: PI3K: Phosphoinositid-3-Kinase; PIP2: Phosphatidylinositol-4,5-Bisphosphat; PIP3: Phosphatidylinositol-3,4,5-Triphosphat; Akt = PKB: Proteinkinase B; mTOR: *mammalian target of Rapamycin*; PTEN: *Phosphatase und Tensin homolog*; PDK1: *Phosphoinositide-dependent kinase 1*; mTORC: *mammalian target of Rapamycin Complex 1*; Bad: *Bcl-2-associated death promoter*; STAT: *signal transducers and activators of transcription*, PLCγ: Phospholipase C γ; IP₃: Inositol-1,4,5-trisphosphat; DAG: Diacylglycerin; PKC: Proteinkinase C; ER: endoplasmatisches Retikulum; Ras: *Rat sarcoma*; Raf: *rapidly growing fibrosarcoma*; MEK: *mitogen-activated protein kinase kinase*; ERK: *extracellular-signal regulated kinases*.

Eine von fast allen RTKs induzierte Signalkaskade ist der *Rat sarcoma/mitogen-activated protein kinase* (Ras/MAPK) Signalweg (Abb. 1.2.3B). *Growth factor receptor binding protein 2* (Grb2) ist konstitutiv an *son-of-sevenless* (SOS), einen Ras Austauschfaktor, gebunden

und im Zytosol lokalisiert. Grb2 kann entweder direkt (pTyr1068 oder pTyr1086 von EGFR, siehe Abb. 1.2.2B) oder indirekt über phosphoryliertes *Src homologous and collagen* Protein (Shc) (pTyr1148 oder pTyr1173 von EGFR, siehe Abb. 1.2.2B) mit EGFR assoziieren. Die Lokalisation des Grb/SOS-Komplexes am EGFR erleichtert die Interaktion von SOS mit Ras, was zum Austausch von Ras-gebundenem GDP zu GTP und damit zur Ras und dann *rapidly growing fibrosarcoma* (Raf, *rat fibrosarcoma*) Aktivierung führt. Diese induziert über mehrere weitere Signalkaskadenschritte die Phosphorylierung, Aktivierung und Translokation der MAPK *extracellular-signal regulated kinase* (ERK)-1 und ERK-2, welche die Phosphorylierung von Transkriptionsfaktoren katalysieren (Johnson und Vaillancourt, 1994). Die hoch konservierte MAPK-Kaskade spielt eine wichtige Rolle in der Kontrolle metabolischer Prozesse, des Zellzyklus, der Zellmigration, sowie bei der Zellproliferation und Differenzierung (Schlessinger, 2000; Jorissen *et al.*, 2003).

EGF-Stimulierung führt außerdem zu einer schnellen Phosphorylierung und Translokation von *signal transducers and activators of transcription* (STAT)1, 3 und 5 in den Zellkern. Dadurch werden bestimmte Zielgene transkribiert (Abb. 1.2.3D). Es gibt Hinweise darauf, dass die Signaltransduktion über STAT3 zur ErbB-induzierten onkogenen Transformation beiträgt (Schlessinger, 2000).

Ein weiteres Substrat, das an EGFR pTyr992 oder pTyr1173 bindet und daraufhin phosphoryliert wird, ist Phospholipase C γ (PLC γ) (siehe Abb. 1.2.3C) (Chattopadhyay *et al.*, 1999). Aktivierte PLC γ katalysiert die Hydrolyse von Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PIP₂), wodurch die Botenstoffe Diacylglycerin (DAG) und Inositol-1,4,5-trisphosphat (IP₃) entstehen. IP₃ induziert die Freisetzung von Kalzium aus intrazellulären Vesikeln und beeinflusst damit Kalzium-abhängige Enzyme. DAG ist Co-Faktor für die Aktivierung der Serin/Threonin-Kinase Proteinkinase C (PKC). Durch diese beiden Botenstoffe kann EGFR Kalzium-abhängige Signalwege, wie den NF κ B-Weg, und über PKC den MAPK- und Januskinase (JNK)-Weg aktivieren (Jorissen *et al.*, 2003; Schlessinger, 2004).

Auch Phosphoinositid-3-Kinase (PI3K) (Abb. 1.2.3A) kann, u.a. durch EGFR/ErbB3 Heterodimerisierung oder, durch Src phosphorylierte pTyrs, aktiviert werden (Jorissen *et al.*, 2003). Weiterhin kann die p85 Untereinheit der PI3K über an pTyr1068 und pTyr1086 gebundenes Grb2, das mit Gab1 komplexiert, assoziieren (Schlessinger, 2000). Nur PI3K der Subklasse Ia kann von RTKs aktiviert werden. Diese generiert PIP₃, dessen Zielmolekül die Serin/Threonin-Kinase Akt (Proteinkinase B, PKB) ist (Jones und Kent, 1991). Akt wirkt durch Phosphorylierung und Inaktivierung von Bad antiapoptotisch (Datta *et al.*, 1999). Akt trägt auch zur Aktivierung der p70S6 Kinase bei, die unter anderem Proteintranslation und den Zellzyklus reguliert (Pene *et al.*, 2002). Damit könnte PI3K der Hauptvermittler antiapoptotischer Effekte der EGFR-Aktivierung sein.

ErbB2-Signaltransduktion erfolgt hauptsächlich über die Heterodimerisierung mit anderen Mitgliedern der ErbB-Familie, wobei die Signalwege dieser Heterodimere stärker transformierend wirken als die der ErbB-Homodimere (Yarden und Sliwkowski, 2001).

EGFR und ErbB2 befinden sich aber nicht nur an der Zelloberfläche, sondern wurden auch in Mitochondrien und im Zellkern normaler und transformierter Zellen gefunden (Yao *et al.*, 2010; Han und Lo, 2012). Die C-Termini von EGFR und ErbB2 tragen eine intrinsische Aktivität und funktionieren als transkriptionelle Regulatoren (Xie und Hung, 1994; Lin *et al.*, 2001). Weiterhin scheint nukleärer EGFR bei der Zellproliferation, DNA-Replikation sowie DNA-Reparatur involviert zu sein (Dittmann *et al.*, 2005; Wang *et al.*, 2006; Kim *et al.*, 2007; Wanner *et al.*, 2008). Die Rolle von mitochondrialem EGFR ist noch nicht vollständig geklärt. EGFR könnte dort allerdings bei der Apoptoseinitiierung beteiligt sein (Han und Lo, 2012).

Die Inaktivierung der EGFR-Signaltransduktion erfolgt zum einen durch Ubiquitinierung, anschließende Endozytose und letztendlich lysosomale Degradation. Die E3-Ubiquitin Ligase c-Cbl bindet entweder direkt über pTyr1045 oder indirekt über Grb2 an EGFR und induziert die Monoubiquitinierung mehrerer Aminosäuren des Rezeptors (Multiubiquitinierung) (Sorkin und Goh, 2009). Dieser Prozess steht im Zusammenhang mit der Auslösung der Endozytose des Ligand-Rezeptorkomplexes (Bertelsen *et al.*, 2011). Nur durch weitere Ubiquitinierungsprozesse wird EGFR über *multivesicular bodies* (MVB) in Lysosomen gebracht und dort abgebaut (Levkowitz *et al.*, 1998; Grovdal *et al.*, 2004). Als weiteren Deaktivierungsweg binden zum anderen Phosphatasen, wie *SH2 domain-containing phosphatase-1* (SHP-1) oder Phosphotyrosinphosphatasen (PTPs), an die aktivierten Rezeptoren und entfernen die Phosphatgruppen von den autophosphorylierten Tyrosinen (Eden *et al.*, 2009; Lemmon und Schlessinger, 2010).

1.2.4 Dysregulation von EGFR und ErbB2 in Tumorzellen

In Tumorzellen kann die strenge Regulation des EGFR-Ligand-Systems über unterschiedliche Mechanismen aufgehoben werden. Hierzu gehören erhöhte Ligandenproduktion, Überexpression des Rezeptors oder dessen Mutation, die zu einer konstitutiven Aktivierung führen, Defekte in der EGFR-Herunterregulierung oder -Aktivierung durch Wechselwirkung mit heterologen Rezeptorsystemen (siehe Abb. 1.2.4).

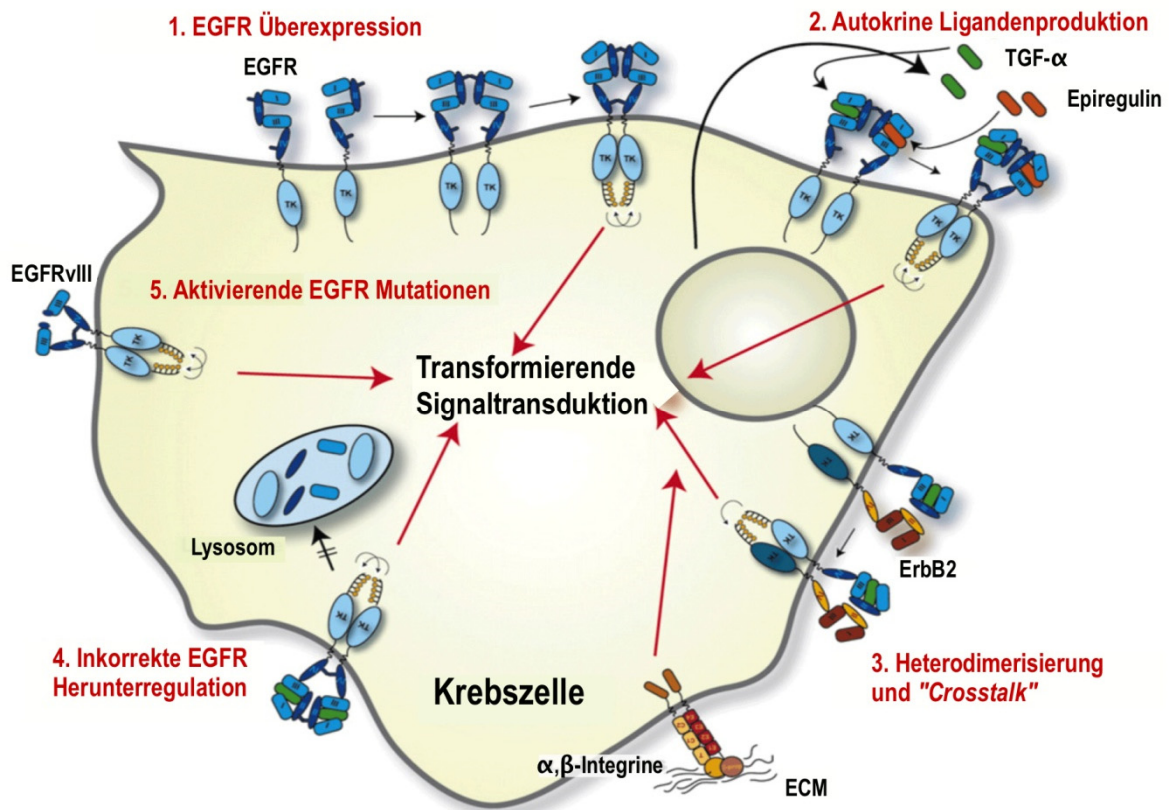


Abbildung 1.2.4 Mechanismen, die zur onkogenen Signalweiterleitung von EGFR führen. 1. erhöhte EGFR Expression, 2. autokrine und/oder parakrine Aktivierung durch Wachstumsfaktoren, 3. Heterodimerisierung mit anderen Mitgliedern der ErbB-Rezeptor-Familie sowie *Crosstalk* mit heterologen Rezeptorsystemen, 4. fehlerhafte Rezeptor Herunterregulierung, 5. Mutationen, die zu konstitutiver Aktivierung führen (modifiziert nach (Zandi *et al.*, 2007)). Weitere Erläuterungen im Text.

TGF α und EGF werden bei unterschiedlichen Krebsarten mit EGFR co-exprimiert und aktivieren durch autokrine bzw. parakrine Stimulation eine übermäßig starke EGFR-Signaltransduktion, die zu unkontrolliertem Zellwachstum führt (Umekita *et al.*, 2000). Die zelluläre Transformation hängt dabei sowohl von der Ligandenkonzentration, als auch von der Menge an EGFR ab. Überexpression von EGFR ist bei Krebsarten wie Kopf- und Hals-Tumoren, Eierstock-, Harnblasen-, Gebärmutterhals- und Ösophaguskarzinomen oft mit einer niedrigen Überlebensrate assoziiert (Nicholson *et al.*, 2001). In Mausfibroblasten führte die Überexpression von EGFR zu Liganden-unabhängiger zellulärer Transformation und erhöhter Zellbeweglichkeit. Dies scheint aufgrund von konstitutiver EGFR-Aktivierung durch hohe lokale EGFR-Konzentration an der Zelloberfläche und spontane Dimerisierung möglich zu sein (Pedersen *et al.*, 2004; Pedersen *et al.*, 2005). EGFR-Überexpression kann verschiedene Ursachen haben: Amplifikation des *erbB* Gens wurde in nicht-kleinzelligen Lungenkarzinomen (NSCLC), Brustkarzinomen und Glioblastomen gefunden. Außerdem ist es möglich, dass der EGFR Promotor übermäßig stark aktiviert ist oder Probleme bei der

Regulation der Translation und posttranslationalen Modifikationen auftreten. Auch eine erhöhte Recyclingrate von EGFR kann zur Überexpression an der Zelloberfläche führen (Zandi *et al.*, 2007). Weiterhin resultiert die Heterodimerisierung mit ErbB2 in verringerter Herunterregulation und konstitutiver Aktivierung des Rezeptorkomplexes (Lenferink *et al.*, 1998; Worthylake *et al.*, 1999; Hartman *et al.*, 2012).

EGFR-Mutationen können im gesamten Rezeptormolekül vorkommen. Deletionen innerhalb der extrazellulären Domäne tragen zur konstitutiven Aktivierung des Rezeptors bei. EGFRvIII ist die häufigste und am besten charakterisierte EGFR-Mutante, die aus einer *in-frame* Deletion der Exons 2-7 resultiert, die die Ektodomäne I und zwei Drittel der Ektodomäne II kodieren (Wong *et al.*, 1992). Somit fehlen dieser Mutante die Aminosäurereste 2-273, und damit der gesamte Teil der Ligandenbindungsdomäne in Ektodomäne I. Dennoch ist der Rezeptor konstitutiv phosphoryliert und trägt zur proliferationsfördernden Signaltransduktion bei. EGFRvIII wird nicht ubiquitiniert und damit nicht über diesen Weg degradiert (Grandal *et al.*, 2007). Weitere Mutationen in extrazellulärer, intrazellulärer und Tyrosinkinase-Domäne von EGFR, die bisher beschrieben wurden, sind in Tabelle 1.2.1 zusammengefasst.

Mutationen (wie EGFR T790M), aber vor allem auch die Lokalisierung des Rezeptors spielen eine wichtige Rolle bei der Ausbildung von Resistenzen gegenüber unterschiedlichen Krebstherapien. So wurde beispielsweise gezeigt, dass nukleärer EGFR zu Insensitivität von Krebszellen gegenüber EGFR-spezifischen monoklonalen Antikörpern (mAk), Tyrosinkinaseinhibitoren (TKI) sowie Radio- und Chemotherapien führt (Li *et al.*, 2009; Dittmann *et al.*, 2010; Huang *et al.*, 2011; Liccardi *et al.*, 2011).

Tabelle 1.2.1 Überblick über EGFR- und ErbB2-Mutationen (ergänzt und modifiziert nach (Zandi *et al.*, 2007)).

Be-reich	Rezeptor	Liganden-abhängig-keit	Mutation	Häufig-keit	Tumorart	Referenz
ECD	EGFR	+	Keine			
	EGFRvI	-	N-terminale Deletion	Selten	GBM	(Wong <i>et al.</i> , 1992)
	EGFRvII	+	Deletion der Exons 14-15	Selten	GBM	(Wong <i>et al.</i> , 1992; Frederick <i>et al.</i> , 2000)
	EGFRvIII	-	Deletion der Exons 2-7	Häufig	GBM, PC, BC, NSCLC, OC, HNC	(Wong <i>et al.</i> , 1992; Moscatello <i>et al.</i> , 1995; Fenstermaker und Ciesielski, 2000; Frederick <i>et al.</i> , 2000; Olapade-Olaopa <i>et al.</i> , 2000; Okamoto <i>et al.</i> , 2003; Sok <i>et al.</i> , 2006)

Be- reich	Rezeptor	Liganden- abhängig- keit	Mutation	Häufig- keit	Tumorart	Referenz
	EGFRVIII/Δ12-13	-	Deletion der Exons 2-7 und 12-13	Selten	GBM	(Fenstermaker und Ciesielski, 2000)
	EGFR.TDM/2-7	+	Tandem-duplikation der Exons 2-7	Selten	GBM	(Fenstermaker und Ciesielski, 2000)
ICD	EGFRvIV	+	Deletion der Exons 25-27	Selten	GBM	(Frederick <i>et al.</i> , 2000)
	EGFRvV	+	Deletion der Exons 25-28	Selten	GBM	(Frederick <i>et al.</i> , 2000)
	EGFR.TDM/18-25/26	-	Tandem-duplikation der Exons 18-25/26	Selten	GBM	(Frederick <i>et al.</i> , 2000)
TKD	G719A/C	+	Punktmutation	Selten	NSCLC	(Paez <i>et al.</i> , 2004; Mitsudomi <i>et al.</i> , 2005)
	746-753-DEL	+	Verschiedene Deletionen	Häufig	NSCLC	(Huang <i>et al.</i> , 2004; Paez <i>et al.</i> , 2004; Mitsudomi <i>et al.</i> , 2005)
	766-768-INS	+	Verschiedene Insertionen	Selten	NSCLC	(Huang <i>et al.</i> , 2004)
	T790M	+	Sekundäre Punktmutation nach TKI-Therapie	Häufig	NSCLC	(Kobayashi <i>et al.</i> , 2005; Pao und Miller, 2005)
	L858R	+	Punktmutation	Häufig	NSCLC	(Huang <i>et al.</i> , 2004; Paez <i>et al.</i> , 2004; Mitsudomi <i>et al.</i> , 2005)
	L861Q	+	Punktmutation	Selten	NSCLC	(Huang <i>et al.</i> , 2004; Mitsudomi <i>et al.</i> , 2005)
TKD	ErbB2 G776AYVM	-	Keine Insertion	Selten	NSCLC	(Shigematsu <i>et al.</i> , 2005)
	L755P	-	Punktmutation	Selten	NSCLC	(Stephens <i>et al.</i> , 2004)
	E914K	-	Punktmutation	Selten	GBM	(Stephens <i>et al.</i> , 2004)
	G776S	-	Punktmutation	Selten	Magen	(Stephens <i>et al.</i> , 2004)
	N857S	-	Punktmutation	Selten	OC	(Stephens <i>et al.</i> , 2004)

ECD = extrazelluläre Domäne, ICD = intrazelluläre Domäne, TKD = Tyrosinkinasedomäne, GBM = Glioblastom, PC = Prostatakrebs, BC = Brustkrebs, NSCLC = nicht-kleinzelliges Bronchialkarzinom, OC = Eierstockkrebs, HNC = Kopf- und Halskrebs, TKI = Tyrosinkinaseinhibitor.

Auch Defekte in der EGFR-Herunterregulierung spielen eine Rolle bei der neoplastischen Zelltransformation. EGFR-Mutanten, denen die c-Cbl Bindungsstelle fehlt, führen zu einem stärkeren mitogenen Signal als Wildtyp-EGFR (Waterman *et al.*, 2002). Außerdem kann fehlerhafte EGFR-Herunterregulierung durch mutierte Formen des c-Cbl Proteins verursacht

werden, die zwar an EGFR binden, aber nicht zur Ubiquitinierung führen (Thien und Langdon, 1997). Desweiteren können, wie bereits erwähnt, EGFR/ErbB2-Heterodimere nur langsam internalisiert und abgebaut werden. Daraus resultiert eine deutlich stärkere Signaltransduktion als bei EGFR-Homodimeren (Worthylake *et al.*, 1999).

Die funktionelle Rolle von EGFR in Krebszellen wird durch Kommunikation mit anderen Oberflächen-exprimierten Rezeptoren stark beeinflusst. Beispiele für solche Kommunikationspartner sind ErbB-Rezeptoren, andere RTKs, Zelladhäsionsmoleküle, Zytokinrezeptoren, Ionenkanäle und G-Protein-gekoppelte Rezeptoren (GPCRs). Der stärkste Induktor mitogener Signalweiterleitung und zellulärer Interaktion ist das EGFR/ErbB2-Heterodimer, was auf von EGFR-Homodimeren unterscheidbare Phosphorylierungsmuster, Signaltransduktion und erschwerten Abbau des Komplexes zurückzuführen ist (Zandi *et al.*, 2007). Desweiteren konnte gezeigt werden, dass die Aktivierung verschiedener Integrine durch extrazelluläre Matrixproteine zu Liganden-unabhängiger Phosphorylierung von EGFR führt. Diese Aktivierung könnte für das Zellüberleben über den PI3K-Weg und die Zellproliferation über den MAPK-Weg mit verantwortlich sein (Moro *et al.*, 1998; Kuwada und Li, 2000; Bill *et al.*, 2004; Guo und Giancotti, 2004).

Daneben ist auch EGFR-Transaktivierung von Bedeutung, bei der die EGFR-Signalübertragung durch GPCR-Agonisten induziert wird (Daub *et al.*, 1996). Dieser Vorgang bewirkt DNA-Synthese, Zellzyklus-Fortschritt sowie Zellmigration in Krebszellen. Daher kommt diesem Mechanismus eine wichtige Rolle bei der Tumorbildung zu (Gschwind *et al.*, 2002; Hart *et al.*, 2005).

Amplifikation, Überexpression oder Mutationen in der TKD von ErbB2 (Tab. 1.2.1) wurden ebenfalls in einem breiten Spektrum von Karzinomen (Tab. 1.2.2) gefunden (Holbro und Hynes, 2004; Stephens *et al.*, 2004). V. a. bei Brustkrebs gilt eine ErbB2-Überexpression als ein signifikanter prognostischer Marker für die Tumorklassifizierung, das Überleben und mögliche Rückfälle (Holbro und Hynes, 2004; Kruser und Wheeler, 2010).

Die nachstehende Tabelle 1.2.2 fasst die bekannten Mechanismen der Dysregulation von EGFR und ErbB2 in Tumorzellen zusammen.

Tabelle 1.2.2 Dysregulation von EGFR und ErbB2 in Tumorzellen (verändert und ergänzt nach (Yarden, 2001)).

Dysregulierung	Art des Tumors	Bemerkung	Referenz
EGFR-Überexpression	Kopf und Hals; Brust; Blase; Prostata; Niere; NSCLC	Bedeutsamer Indikator für das Wiederauftreten in operablen Brusttumoren; verbunden mit kürzerer krankheitsfreier und Gesamtüberlebenszeit bei fortgeschrittenem Brustkrebs; dient als prognostischer Marker für Blasen- und Prostatakrebs	(Gorgoulis <i>et al.</i> , 1992; Irish und Bernstein, 1993)

Dysregulierung	Art des Tumors	Bemerkung	Referenz
EGFR-Überexpression	Gliom	Amplifikation tritt in 40% aller Gliome auf; Überexpression korreliert mit höherem Malignitätsgrad und verringerter Überlebenszeit	(Wong <i>et al.</i> , 1992)
EGFR-Überexpression	Kolorektal	Amplifikation tritt in mindestens 75% aller Kolorektalkarzinome auf; gute Behandlungserfolge mit anti-EGFR mAk; Resistenz gegenüber TKI	(Wainberg und Hecht, 2006; Wainberg und Hecht, 2007; de Castro-Carpeno <i>et al.</i> , 2008)
Gleichzeitige (Über)Expression von EGFR und TGF α	Kopf und Hals; NSCLC; Lunge; Darm; Brust	Entwicklung einer autokrinen oder parakrinen Wachstumsfaktor-Signaltransduktion	(Salomon <i>et al.</i> , 1995; Rusch <i>et al.</i> , 1997; Grandis <i>et al.</i> , 1998; Hsieh <i>et al.</i> , 2000; Umekita <i>et al.</i> , 2000)
EGFR-Mutation	Gliom; Ovarien; Brust; NSCLC	Deletion eines Teils der extrazellulären Domäne resultiert in einem konstitutiv aktiven Rezeptor	(Moscatello <i>et al.</i> , 1995)
ErbB2-Überexpression	Brust; NSCLC; Pankreas; Darm; Ösophagus; Endometrium; Zervix	In 15-30% der duktaalen invasiven Brustkarzinome tritt eine Amplifikations-bedingte Überexpression auf; die Überexpression korreliert mit Tumorgröße, Streuung des Tumors in die Lymphknoten, hohem Malignitätsgrad, einem hohen Prozentsatz an Zellen in der S-Phase, Aneuploidie und einem Mangel an Steroidhormonrezeptoren	(Ross und Fletcher, 1998)

1.3 Inhibition der onkogenen EGFR- und ErbB2-Signaltransduktion

Bereits vor ca. 30 Jahren begann die Entwicklung EGFR- und ErbB2-spezifischer Inhibitoren als mögliche Krebstherapeutika, darunter die EGFR-spezifischen mAk 528, 225 (muriner Vorläufer von Cetuximab) und 455 (Masui *et al.*, 1984), sowie der ErbB2-spezifische mAk 4D5 (Trastuzumab/Herceptin® Vorläufer) (Hudziak *et al.*, 1989). Bis heute wurden zwei Klassen von ErbB-Antagonisten erfolgreich in klinischen Studien getestet und stehen für eine Reihe von Indikationen als zugelassene Therapeutika zur Verfügung: mAk und niedermolekulare Tyrosinkinase-Inhibitoren (TKI) (Ciardiello und Tortora, 2008).

1.3.1 Tyrosinkinase-Inhibitoren

Synthetische Kinase-Inhibitoren zur Behandlung EGFR- und ErbB2-positiver Tumoren (z.B. die EGFR-spezifischen TKI Gefitinib, Erlotinib und der EGFR/ErbB2-spezifische TKI Lapatinib) werden in der Regel oral verabreicht. Nach Überwindung der Zellmembran binden sie mit hoher Affinität an die ATP-Bindungsstelle der Rezeptoren und kompetieren dort mit ATP. Dadurch wird die Autophosphorylierung des Rezeptors und damit die weitere

Signaltransduktion verhindert. Den geringen Produktionskosten und der hohen Bioverfügbarkeit der TKI stehen als Nachteile die begrenzte Spezifität dieser Moleküle sowie die Ausbildung von Resistenzen gegenüber (Harari, 2004; Huang *et al.*, 2004; Imai und Takaoka, 2006). Es können Nebenwirkungen auftreten, die auf die unspezifische Beeinflussung anderer zellulärer Kinasen zurückzuführen sind. Der therapeutische Effekt der TKI kann sich außerdem durch die Selektion von Tumorzellen mit Mutationen in der Kinasedomäne deutlich verschlechtern (Lynch *et al.*, 2004; Paez *et al.*, 2004; Comis, 2005; Kobayashi *et al.*, 2005; Imai und Takaoka, 2006). In den vergangenen Jahren wurden einige irreversible TKI der zweiten Generation (z.B. Carnertinib und Perlitinib) entwickelt, die als Pan-Inhibitoren der ErbB-Rezeptor-Familie eingesetzt werden (Wissner und Mansour, 2008; Ou, 2012). Sie binden kovalent an Cysteine in der ATP-Bindungstasche und führten in *in vitro* Studien zum Zelltod von Glioblastomzellen, die einen mutierten EGFR, aber nicht den Wildtyp-EGFR, exprimieren (Vivanco *et al.*, 2012).

1.3.2 Monoklonale Antikörper

Als Alternative zu synthetischen TKI können monoklonale anti-EGFR bzw. anti-ErbB2 Antikörper (z.B. Cetuximab, Panitumumab bzw. Trastuzumab, Pertuzumab) zur Krebstherapie eingesetzt werden, die an die extrazelluläre Domäne des entsprechenden ErbB-Rezeptors binden (Hynes und MacDonald, 2009). Ein Vorteil dieser Therapeutika ist die hohe Spezifität für ihr Zielmolekül, wodurch andere Rezeptoren nicht beeinflusst werden. Nachteilig wirken sich allerdings die hohen Produktionskosten und die Notwendigkeit einer ständigen Wiederholung der intravenösen Medikamentenverabreichung aus (Reilly *et al.*, 1995; Mutschler, 2001). Die Wirkmechanismen der mAk reichen von der Blockade der Ligandenbindung über die Inhibition der Rezeptordimerisierung bis hin zu einer verstärkten Rezeptordegradation und Rekrutierung von Immuneffektorzellen. Beim Einsatz von mAk muss beachtet werden, dass Antikörper murinen Ursprungs in Patienten eine Immunantwort auslösen können, die die Wirksamkeit verringert oder sogar verhindert (Reilly *et al.*, 1995). Daher sind die gegenwärtig klinisch eingesetzten Antikörper zumindest chimäre Antikörper (variable Domänen murin, konstante Domänen human), idealerweise sogar vollständig humanisiert (die murinen *complementarity determining regions* (CDRs = Antigenbindestellen) werden in humane Antikörpergerüste eingesetzt) (Reilly *et al.*, 1995).

Cetuximab (Erbitux[®]) ist ein chimärer mAk, der zur Behandlung von kolorektalen sowie Kopf- und Hals-Karzinomen zugelassen ist (Burgess, 2008). Er enthält die variablen Domänen der schweren und leichten Kette des murinen mAk 225 (Sato *et al.*, 1983; Wels *et al.*, 1995), bindet an ein diskontinuierliches Epitop in der EGFR Ektodomäne III und kompetiert mit natürlichen EGFR-Liganden (Modi und Seidman, 2002; Hartmann *et al.*, 2010). Die Bindung

von Cetuximab bewirkt die Internalisierung des Rezeptors, ohne ihn dabei durch Autophosphorylierung zu aktivieren (Sunada *et al.*, 1986). Cetuximab inhibiert nicht nur die Signaltransduktion, sondern löst auch einen Verbleib der Zelle in der G1-Phase des Zellzyklus aus (Wu *et al.*, 1996; Mendelsohn und Baselga, 2000). Weiterhin besitzt dieser mAk anti-angiogene, proapoptotische und anti-metastatische Eigenschaften (Wu *et al.*, 1995; Petit *et al.*, 1997; Perrotte *et al.*, 1999). Außerdem wurde in weiteren Studien die Aktivierung einer Antikörper-abhängigen, Zell-vermittelten Zytotoxizität (ADCC) durch die Behandlung mit Cetuximab beobachtet (Kimura *et al.*, 2007; Kurai *et al.*, 2007).

Ein vollständig humaner EGFR-spezifischer Antikörper, Panitumumab (Vectibix®), wurde mit dem XenoMouse®-System (Abgenix) aus genetisch modifizierten Mäusen generiert und löst aufgrund seiner vollständig humanen Struktur keine Immunantwort aus (Green, 1999; Jakobovits *et al.*, 2007). Der Antikörper bindet an die extrazelluläre Domäne von EGFR und verhindert damit die Ligandenbindung (Freeman, 2008).

Der ErbB2-spezifische, humanisierte Antikörper Trastuzumab (Herceptin®) ist zur Behandlung von ErbB2-überexprimierenden Brustkarzinomen und metastasierendem Magenkrebs zugelassen (Baselga und Swain, 2009; Gunturu *et al.*, 2013). Trastuzumab bindet an die Ektodomäne IV des Rezeptors, inhibiert die ErbB2-Signalaktivität und löst ADCC aus (Cho *et al.*, 2003; Longva *et al.*, 2005; Musolino *et al.*, 2008). Ein weiterer ErbB2-spezifischer Antikörper, Pertuzumab (Omnitarg®), wurde Mitte 2012 von der FDA (*U.S. Food and Drug Administration*) zur Behandlung von fortgeschrittenem ErbB2-positivem Brustkrebs zugelassen (Awada und Aftimos, 2013). Im Gegensatz zu Trastuzumab bindet dieser Antikörper an die Ektodomäne II des Rezeptors und inhibiert damit den, für die Signaltransduktion essentiellen, Schritt der Dimerisierung (Franklin *et al.*, 2004).

In den vergangenen Jahren zeigte sich, dass eine Monotherapie mit TKI oder mAk relativ schnell zur Ausbildung von Resistenzen führen kann. Daher wurden verschiedene Kombinationen von Therapeutika experimentell auf eine, verglichen mit der Monotherapie, möglicherweise gesteigerte Wirkung getestet. Dabei erhöhte beispielsweise die zusätzliche Gabe des EGFR-spezifischen TKI Gefitinib die Effektivität der Wachstumsinhibition und Apoptoseauslösung durch Trastuzumab gegenüber ErbB2-positiven Brustkrebszellen (SK-BR-3 und BT-474) (Normanno *et al.*, 2002). Die Behandlung mit Gefitinib oder Erlotinib in Kombination mit Cetuximab zeigte ein verlängertes und verstärktes Ansprechen des Tumors verglichen zu der Monotherapie mit dem mAk allein (Huang *et al.*, 2004; Matar *et al.*, 2004). Auch klinische Studien mit Kombinationstherapien wie Trastuzumab + Pertuzumab + Doxetaxel (Zytostatikum) in Patienten mit metastasierendem Brustkrebs, Erlotinib + IGF-R1-Inhibitor oder Erlotinib + c-MET-Inhibitor (weitere RTK) in Patienten mit fortgeschrittenem NSCLC wurden durchgeführt (Ramalingam *et al.*, 2011; Sequist *et al.*, 2011; Baselga *et al.*,

2012). Während in der ersten Studie eine Erhöhung des progressionsfreien Überlebens erreicht wurde, brachte die Gabe von Erlotinib und IGF-R1-Inhibitor keinen Vorteil für die Patienten (Ramalingam *et al.*, 2011; Baselga *et al.*, 2012). Für Erlotinib und den c-MET-Inhibitor wurden Hinweise auf die Aktivität dieser Kombination speziell in Patienten mit KRAS-Mutationen gefunden (Sequist *et al.*, 2011).

1.4 Intrazelluläre scFv-Antikörperfragmente (Intrabodies)

Nicht nur vollständige mAk, sondern auch rekombinante Antikörperfragmente können zur Interferenz mit der Signaltransduktion und dem Wachstum von Krebszellen eingesetzt werden. So wurden beispielsweise EGFR- und ErbB2-spezifische *single chain fragment variable* (scFv)-Moleküle in Fusionsproteinen als *Targeting*-Domänen für Toxine, wie das *Pseudomonas* Exotoxin A, genutzt (Wels *et al.*, 1995; Schmidt *et al.*, 1997; Schmidt *et al.*, 1999). ScFv-Antikörperfragmente bestehen aus den antigenerkennenden variablen Domänen der schweren (V_H) und der leichten (V_L) Antikörperkette, die zur Erhöhung der Stabilität durch einen 15-20 Aminosäurereste langen Peptidlinker kovalent verknüpft sind (Bird *et al.*, 1988; Huston *et al.*, 1988). Sie haben eine molekulare Masse von etwa 30 kDa und können je nach Länge des eingesetzten Linkers nicht nur als Monomere, sondern auch als Dimere (Diabody) vorliegen. Dabei assoziiert die V_H des einen Moleküls mit der V_L eines zweiten und umgekehrt. Das Gleichgewicht zwischen Monomer und Dimer kann durch Verkürzung des Peptidlinkers in Richtung Dimer verschoben werden. Die Dissoziationsrate von Diabodies ist deutlich geringer als die des scFv-Monomers, und durch die Linkerverkürzung wird auch eine proteolytische Spaltung unwahrscheinlicher (Le Gall *et al.*, 1999; Chames und Baty, 2000).

ScFv-Antikörperfragmente wurden in verschiedenen Wirtszellen (Bakterien, Hefen, Säugerzellen, Pflanzenzellen, etc.) erfolgreich exprimiert und binden mit vergleichbarer Affinität an ihr Antigen wie der entsprechende Ausgangsantikörper. ScFv-Moleküle eignen sich zudem sehr gut für die Herstellung von Fusionsproteinen, da sie die komplette Antigenbindungsstelle in einer einzigen Polypeptidkette enthalten (Wels *et al.*, 2004).

Intrabodies (intrazelluläre Antikörper) sind definiert als Antikörpermoleküle, die intrazellulär exprimiert und in bestimmte subzelluläre Kompartimente dirigiert werden können (Beerli *et al.*, 1994; Kontermann, 2004). Die Expression entsprechender ER-ständiger scFv-Fragmente führte beispielsweise zur Inhibition der Oberflächenexpression von ErbB2, IL-2 Rezeptor, VEGFR oder den HIV-Eintrittsrezeptoren CCR5 und CXCR4 (zusammengefasst in (Boldicke, 2007)). Auch sekretierbare (EGFR-spezifisches scFv(225)) oder zytoplasmatisch exprimierte (p21/Ras-spezifisches) scFv-Moleküle inhibierten experimentell die Signaltransduktion ihrer Zielmoleküle (Beerli *et al.*, 1994; Shaki-Loewenstein *et al.*, 2005). Ein Problem, das bei der

intrazellulären Expression funktioneller scFv-Antikörperfragmente auftritt, ist das reduzierende Milieu im Zytoplasma. Da Immunglobulin-Domänen, und damit auch scFv-Moleküle, durch intramolekulare Disulfidbrücken stabilisiert werden, wird für die Bildung funktioneller Antikörperfragmente ein nicht-reduzierendes Milieu benötigt. Im Zytosol und im Zellkern liegt allerdings ein reduzierendes Milieu vor. Dadurch kann eine Expression von scFv-Molekülen in diesen Kompartimenten zu inkorrekt Faltung und reduzierter Stabilität führen (Biocca *et al.*, 1995). Um die Stabilität von Intrabodies zu erhöhen, wurden scFv-Gerüste generiert, die sich im Zytoplasma in funktionelle Moleküle falten. Dies kann durch genetische Verfahren, molekulare Evolution oder durch Zusammenführung mit molekularen Chaperonen erreicht werden (Shaki-Loewenstein *et al.*, 2005). Ein weiterer Ansatz ist eine direkte *in vivo* Selektion (Screening) stabiler Antikörperfragmente aus Intrabody-Bibliotheken (Hyland *et al.*, 2003; Kontermann, 2004). Eine Schwierigkeit besteht zudem darin, das Intrabody-kodierende Gen oder rekombinant hergestellte Antikörperfragmente in die Zielzelle einzubringen. Für den Gentransfer können virale Vektoren oder nicht-virale Systeme wie Liposomen oder molekulare Konjugate eingesetzt werden (Kontermann, 2004). Sollen rekombinant hergestellte Proteine von außen in die Zelle eingebracht werden, eignen sich hierfür möglicherweise Protein-Transduktionsdomänen (PTDs). PTDs sind kurze Peptidsequenzen oder kleine Proteine, die die Fähigkeit besitzen, die Zellmembran über Endozytose, Mikropinocytose oder direkt zu durchqueren und dadurch den Transfer fusionierter Proteine ins Zellinnere zu ermöglichen (Joliot und Prochiantz, 2004). Beispiele für solche Moleküle sind das HIV Protein Tat oder hiervon abgeleitete Sequenzen, wie eine Polyarginin Sequenz. Die Größe des an die PTD fusionierten Proteins scheint dabei die Funktionalität nicht zu beeinträchtigen (Stocks, 2004).

1.5 Ziel dieser Arbeit

In früheren Arbeiten der Arbeitsgruppe wurden scFv-Antikörperfragmente, darunter scFv(30) isoliert, die spezifisch an die intrazelluläre Domäne (ICD) von EGFR binden (Hyland *et al.*, 2003). Dazu wurden zunächst EGFR-spezifische scFv-Moleküle mittels *Phage Biopanning* aus einer scFv-Antikörper-Bibliothek angereichert. Anschließend wurden aus dieser vorselektionierten Bibliothek in *Yeast Two-Hybrid* Experimenten intrazellulär stabile und EGFR-ICD-spezifische scFv-Antikörperfragmente *in vivo* selektioniert. In GST *pull-down* und Co-Immunpräzipitationsexperimenten wurde die Spezifität und intrazelluläre Bindungsaktivität dieser Moleküle verifiziert. Durch konfokale Laserscanning Mikroskopie wurde außerdem gezeigt, dass die scFv-Antikörperfragmente nach intrazellulärer Expression mit EGFR an der Zellmembran EGFR-überexprimierender humaner Tumorzellen colokalisieren. Ein direkter Effekt der Expression der EGFR-spezifischen scFv-Moleküle auf die

Autophosphorylierung des Rezeptors und die Proliferation EGFR-exprimierender Mausfibroblasten wurde jedoch nicht beobachtet (Hyland *et al.*, 2003). Im Fall des spezifisch an die extrazelluläre Domäne (ECD) von EGFR bindenden scFv(225) Antikörperfragments war es experimentell möglich, die EGF-induzierte Aktivierung in EGFR-transformierten NIH3T3 Mausfibroblasten durch die direkte Expression des des scFv-Moleküls in sekretierbarer Form autokrin zu verhindern. Diese scFv(225)-exprimierenden Zellen wiesen zudem ein reduziertes Wachstum in Softagarassays auf (Beerli *et al.*, 1994; Shaki-Loewenstein *et al.*, 2005).

Für Antikörper, wie scFv(225), die als sekretierte oder durch die Fusion mit einem KDEL-ER-Retentionssignal im ER zurückgehaltene Intrabodies exprimiert wurden, wurde gezeigt, dass sie mit ihren Zielproteinen an der Zelloberfläche oder innerhalb von sekretorischen Kompartimenten interagieren können (Lo *et al.*, 2008).

Ziel dieser Arbeit war es, das EGFR-ECD-spezifische scFv(225) Fragment und das EGFR-ICD-spezifische scFv(30) Fragment über eine Transmembrandomäne zu einem neuartigen bispezifischen Antikörpermolekül (225.TM.30) zu verbinden. Dies umfasste insbesondere die Analyse des Einflusses von 225.TM.30 auf die Expression und die Lokalisation von EGFR, sowie das Wachstum Rezeptor-exprimierender Tumorzellen im Vergleich zu den monospezifischen Varianten 225.TM und TM.30.

Die Bildung von EGFR/ErbB2-Heterodimeren führt verglichen mit EGFR-Homodimeren zu einer verlängerten und amplifizierten Signaltransduktion und dadurch zu einer gesteigerten Transformierbarkeit Rezeptor-exprimierender Zellen (Beerli *et al.*, 1995; Graus-Porta *et al.*, 1995; Karunagaran *et al.*, 1996; Brandt *et al.*, 1999). Wird diese Heterodimerisierung unterbunden, beispielsweise durch den mAk Pertuzumab, wird das transformierende Potential der Rezeptoren verringert (Hughes *et al.*, 2009).

Ein weiteres Ziel dieser Arbeit war daher die Generierung eines ErbB2-ECD- und EGFR-ICD-spezifischen transmembranen Antikörperfragments (5.TM.30) und die Analyse einer möglichen Interferenz diese Moleküls mit den beiden Zielrezeptoren nach Expression in Tumorzellen. Dazu galt es, die Effekte des transmembranen Intrabodies auf die Rezeptorexpression, -Lokalisation, und -Heterodimerisierung, sowie das Wachstum Rezeptor-exprimierender Tumorzellen zu untersuchen.

2 Material und Methoden

2.1 Materialien

2.1.1 Chemikalien und Verbrauchsmaterialien

Agar-Agar	Roth (Karlsruhe)
Agarose	Roth (Karlsruhe)
Ampicillin	Roth (Karlsruhe)
Bakterielle Wachstumsmedien	Difco (Augsburg), Invitrogen (Karlsruhe)
BSA (Albumin Fraktion V aus Rinderserum)	Roth (Karlsruhe)
Desoxycholat	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
Desoxynukleotid-Triphosphate	Roche Diagnostics (Mannheim), Peqlab (Erlangen)
DMP	Thermo Fischer Scientific (Schwerte)
DMSO	Fluka (Buchs, Schweiz), Roth (Karlsruhe)
DNA-Größenstandards	Fermentas (St. Leon-Rot)
DNA-Ligase	New England Biolabs (Schwalbach)
DNA-Polymerasen	Qiagen (Hilden), New England Biolabs (Schwalbach)
<i>Doxycycline hyclate</i>	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
ECL Chemolumineszenz Kit	Pierce (Rockford, United Kingdom)
EGF	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
FACS-Reagenzien	BD Biosciences (Heidelberg)
Filter	Millipore (Schwalbach)
FBS	PAA (Pasching, Österreich), Biowest (Nuaille, Frankreich)
G418 <i>Sulphate</i>	PAA (Pasching, Österreich)
Immobilon P (PVDF Membran)	Millipore (Schwalbach)
L-Glutamin	PAA (Pasching, Österreich)
Magermilchpulver	Roth (Karlsruhe), Fluka (Buchs, Schweiz)
Molekulargewichtsmarker für Proteine	Peqlab (Erlangen)
MTT	Fluka (Buchs, Schweiz)
Natrium-Orthovanadat	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
Penicillin / Streptomycin	PAA (Pasching, Österreich)
Plastikwaren für Labor und Zellkultur	Corning (Schiphol-Rijk, Niederlande), Greiner (Frickenhausen), Eppendorf (Hamburg), Meditrade (Kiefersfelden), BD Biosciences (Heidelberg), Sarstedt (Nümbrecht), Corning (Amsterdam, Niederlande), Ratiolab (Dreieich)
PMSF	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
Proteaseinhibitor-Mix (EDTA-frei)	Roche Diagnostics (Mannheim)
Protein G Dynabeads®	Invitrogen (Karlsruhe)
Restriktionsenzyme	New England Biolabs (Schwalbach)
Röntgenfilme	Fuji Photo Film (Düsseldorf)
Standardchemikalien und Lösungsmittel	Sigma-Aldrich (Taufkirchen), Fluka (Neu-Ulm), Roth (Karlsruhe), Serva

Trypsin/EDTA
 Whatman 3MM Filterpapier
 Zellkulturmedien

(Heidelberg), Merck (Darmstadt), Roche
 Diagnostics (Mannheim), Peqlab
 (Erlangen), Chemicon (Hampshire, United
 Kingdom)
 Gibco/Invitrogen (Karlsruhe)
 Whatman (London, United Kingdom)
 Gibco/Invitrogen (Karlsruhe), Lonza
 (Basel, Schweiz)

2.1.2 Antikörper

Name	Epitop	Wirt	Isotyp	Herkunft	Verdünnung	Verwendung
EGFR (1005)	EGFR- ICD	Kaninchen	IgG	Santa Cruz	1:750 (WB) 1:100 (CLSM)	WB, CLSM
EGFR (R-1)/- AF647	EGFR- ECD	Maus	IgG2b	Santa Cruz	2 µg (IP), 5 µl (FACS), 1:100 (CLSM)	FACS, IP, CLSM
c-Myc (9E10)- AF647	AS 408- 439	Maus	IgG1	Santa Cruz	5 µl (FACS), 1:75 (CLSM)	FACS, CLSM
9E10 (Hybridomüb.)	Myc-tag	Maus	N/A	(Evan <i>et al.</i> , 1985)	1:500	WB
Herceptin	ErbB2	Mensch	IgG1	Freiburg	3 µg	FACS
BIP	N/A	Maus	N/A	Ohne Angaben von AG Zörnig	1:1000	WB
PDI (C81H6)	Peptid um AS P329	Kaninchen	polyklonal	Cell Signaling	1:1000	WB
γ-Tubulin	AS 38- 53	Kaninchen	IgG	Sigma Aldrich	1:2000	WB
HER2/ErbB2 (29D8)	Peptid um AS Y1248	Kaninchen	IgG	Cell Signaling	1:1000	WB
Neu (C-18)	ErbB2- ICD	Kaninchen	IgG	Santa Cruz	1:200	WB
FRP5	ErbB2- ECD	Maus	IgG	(Harwerth <i>et al.</i> , 1992)	1 µg	FACS
anti- scFv(FRP5) #60455	N/A	Kaninchen (Serum)	N/A	(Wels <i>et al.</i> , 1992)	1:1000	WB
EGFR pTyr(1045) #2237	Peptid um AS pY1045	Kaninchen	polyklonal	Cell Signaling	1:1000	WB
EGFR pTyr(845) #2231	Peptid um AS pY845	Kaninchen	polyklonal	Cell Signaling	1:1000	WB

Name	Epitop	Wirt	Isotyp	Herkunft	Verdünnung	Verwendung
EGFR pTyr(992) #2235	Peptid um AS pY992	Kaninchen	polyklonal	Cell Signaling	1:1000	WB
EGFR pTyr(1148) #4404	Peptid um AS pY1148	Kaninchen	polyklonal	Cell Signaling	1:1000	WB
EGFR pTyr(1173) #4407	Peptid um AS pY1173	Kaninchen	IgG	Cell Signaling	1:1000	WB
CD8α (H-160)	AS 22-182	Kaninchen	IgG	Santa Cruz	1:1000 (WB), 1:100 (CLSM)	WB, CLSM
pTyr(PT-66)	pTyr-BSA Konjugat	Maus	IgG1	Sigma Aldrich	1:2000	WB
EGFR-Fc		Mensch	Fc-Fusion	Invitrogen	1 µg	FACS
ErbB2-Fc		Mensch	Fc-Fusion	R&D Systems	1 µg	FACS
Annexin V-APC				eBioscience	5 µl/Test	FACS
Anti-Kaninchen-AP		Ziege	polyklonal	Sigma Aldrich	1:30000	AP
anti-Maus-IgG-HRP		Ziege	polyklonal	Sigma Aldrich	1:10000	WB
anti-Kaninchen-IgG-HRP		Ziege	polyklonal	Sigma Aldrich	1:16000	WB
anti-Kaninchen-IgG-AF546		Esel	polyklonal	Invitrogen	1:200	CLSM
anti-Mensch-IgG-APC		Ziege	IgG	Jackson Immuno Research	0,5 µl	FACS
anti-Maus-IgG-APC		Ziege	IgG	Jackson Immuno Research	0,5 µl	FACS
StrepTactin®-HRP				IBA BioTAGnology	1:100000	WB
ConcanavalinA -AF594				Invitrogen	1:100	CLSM
Streptavidin-AP				Dianova	1:5000	WB
IgG Kontrolle		Maus	IgG	Santa Cruz	2 µg	IP

AP: Alkalische Phosphatase Blot; CLSM: Konfokale Laserscanning Mikroskopie, FACS:

Durchflusszytometrie, IP: Immunpräzipitation, WB: Westernblot, ICD: intrazelluläre Domäne, ECD: extrazelluläre Domäne.

2.1.3 Plasmide

Plasmid	Beschreibung	Referenz oder Hersteller
pSW5-STII-scFv(30)-MH	Bakterieller Expressionsvektor basierend auf pFLAG mit einem N-terminalen Strep-tag II sowie C-terminalem Myc- und His ₆ -tag, kodiert für scFv(30); <i>template</i> für scFv(30) zur Klonierung von pCR2.1-scFv(30)	(Müller, 2009)
pCR2.1-scFv(30)	Zwischenklonierungsplasmid, das scFv(30) mit 5'- und 3'-NaeI-Schnittstellen enthält; genutzt zur Klonierung von pMA-225.TM.30	diese Arbeit
pMA-225.TM.28.z	Klonierungsplasmid von GeneArt; enthält die kodonoptimierte Sequenz des EGFR-ECD-spezifischen CAR 225.28.z; genutzt zur Klonierung von pMA-225.TM.30	Schönfeld, unveröffentlicht
pMA-225.TM.30	Klonierungsplasmid von GeneArt; kodiert für scFv(225) verbunden über einen Myc-tag und eine CD8 α /CD28 Gelenk- und Transmembranregion mit dem EGFR-ICD-spezifischen scFv(30); dient als <i>template</i> zur Klonierung von pS-225.TM.30-IEW, pES.T6-225.TM.30-SE und pES.T6-TM.30-SE	diese Arbeit
pMA-5.TM.30	Wie pMA-225.TM.30; enthält anstelle von EGFR-ECD-spezifischem scFv(225) ErbB2-ECD-spezifisches scFv(FRP5); dient als <i>template</i> zur Klonierung von pES.T6-5.TM.30-SE	diese Arbeit
pS-225.TM-IEW	Lentivirales Transferplasmid kodierend für 225.TM 3' zu einem <i>spleen focus forming</i> Virus (SFFV) Promotor und einer internen ribosomalen Eintrittsstelle (IRES) gefolgt von der <i>EGFP</i> cDNA	Genßler, unveröffentlicht
pS-225.TM.30-IEW	Lentivirales Transferplasmid kodierend für 225.TM.30 3' zu einem SFFV Promotor und einer internen ribosomalen Eintrittsstelle (IRES) gefolgt von der <i>EGFP</i> cDNA	diese Arbeit
pES.T6-x-PGK-Puro(rev)	γ -retrovirales Transferplasmid kodierend für das Protein x 3' von einem Tetracyclin-induzierbaren minimalen CMV Promotor und einem Puromycin-Resistenzgen hinter einem humanen PGK Promotor; dient zur Herstellung des Plasmids pES.T6-x-SE	Kinner (AG Grez, Georg-Speyer-Haus)
pES.T6-x-SE	γ -retrovirales Transferplasmid kodierend für das Protein x 3' von einem Tetracyclin-induzierbaren minimalen CMV Promotor und einem EGFP Markerprotein hinter einem SFFV Promotor	diese Arbeit
pES.T6-i225.TM-SE	wie pES.T6-x-SE; kodiert für 225.TM	diese Arbeit
pES.T6-i225.TM.30-SE	wie pES.T6-x-SE; kodiert für 225.TM.30	diese Arbeit

Plasmid	Beschreibung	Referenz oder Hersteller
pES.T6-iTM.30-SE	wie pES.T6-x-SE; kodiert für TM.30	diese Arbeit
pES.T6-i5.TM.30-SE	wie pES.T6-x-SE; kodiert für 5.TM.30	diese Arbeit
pMK-5.TM	Klonierungsplasmid von GeneArt; wie pMK-225.TM; kodiert anstelle des scFv(225) scFv(FRP5); dient als <i>template</i> zur Klonierung von pES.T6-5.TM.SE	Schönfeld, unveröffentlicht
pES.T6-i5.TM-SE	wie pES.T6-x-SE; kodiert für 5.TM	diese Arbeit
pES.1-2(M2N)p	γ -retrovirales Transferplasmid kodierend für das reverser Tetracyclin-kontrollierter Transaktivator Protein (M2)	Kinner (AG Grez, Georg-Speyer-Haus)
pES.T6-iscFv(30)-SE	wie pES.T6-x-SE; kodiert für zytoplasmatisches scFv(30)	diese Arbeit
pES.T6(lmg*)p	γ -retrovirales Transferplasmid kodierend für ein Luziferase-EGFP (Luz-EGFP) Fusionsprotein 3' von einem Tetracyclin-induzierbaren minimalen CMV Promotor	(Loew <i>et al.</i> , 2010)
pCMV_ΔR8.91	Kodiert für lentivirale gag und pol Proteine	(Zufferey <i>et al.</i> , 1997)
pMD2.G	Kodiert für das <i>Vesicular Stomatitis Virus</i> Hüllprotein G (VSV-G)	(Zufferey <i>et al.</i> , 1997)
M634	Kodiert für γ -retrovirale gag und pol Proteine	AG Grez, Georg-Speyer-Haus
M620	Kodiert für das <i>Gibbon Ape Leukemia Virus</i> Hüllprotein (GALV)	AG Grez, Georg-Speyer-Haus

ICD: intrazelluläre Domäne, ECD: extrazelluläre Domäne

2.1.4 Zelllinien und Kulturbedingungen

Dulbecco's Phosphate Buffered

Saline (DPBS) (PAA): 8,1 mM Na₂HPO₄, 1,4 mM KH₂PO₄, 137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, pH 7,4

Zelllinie	Beschreibung	Medium
A431 (ATCC: CRL-1555)	Plattenepithelkarzinom der Vulva; hohe Expression humanen EGFRs und hohe Proliferationsrate	DMEM+++
HEK293T (CRL-11268)	Humanes embryonales Nierenzellkarzinom; exprimiert zusätzlich das SV40 große T-Antigen	DMEM+++
MDA-MB453 (HTB-131)	Brustkarzinom, überexprimiert ErbB2	DMEM+++
MDA-MB468 (HTB-132)	Brustkarzinom, überexprimiert EGFR (~1*10 ⁶)	DMEM+++

+++ Supplement: 10% (v/v) FBS, 2 mM L-Glutamin, 100 U/ml Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin

In Kryoröhrchen in flüssigem Stickstoff oder bei -80°C gelagerte Säugerzellen wurden schnell bei 37°C aufgetaut, in 5 ml entsprechendem Komplettmedium aufgenommen und bei 500 x g für 3 min (Heraeus Labofuge M) pelletiert. Das in DPBS gewaschene Pellet wurde in

10 ml entsprechendem Komplettmedium aufgenommen und die Zellen wurden bei 37°C und 5% CO₂ in einer Kulturflasche oder -platte kultiviert. Die Komplettmedien enthielten 10% (v/v) hitzeinaktiviertes fötales Kälberserum (FBS), 2 mM L-Glutamin, 100 U/ml Penicillin und 100 µg/ml Streptomycin (***). MDA-MB468/M2, MDA-MB453/M2 und A431/M2 Zellen wurden zur Selektion in Medium mit 1 mg/ml G418 kultiviert. Zellen, die mit einem induzierbaren Expressionsvektor transduziert wurden, wurden zur Suppression unerwünschter Proteinexpression in Tetracyclin-negativem FBS kultiviert. Die Zellen wurden zweimal in der Woche mit frischem Medium versorgt, und vor Erreichen der Konfluenz durch Zugabe von Trypsin von der Oberfläche der Kulturplatte/Kulturflasche gelöst, verdünnt und erneut ausgesät. Die Langzeitaufbewahrung von Zellen erfolgte bei -80°C oder im flüssigen Stickstoff in 10% (v/v) DMSO supplementiertem FBS.

2.1.5 Bakterienstämme

<i>E. coli</i> XL1-Blue (Hanahan, 1983)	supE44, hsdR17, recA1, endA1, gyrA96, thi-1, relA1, lac ⁻ , F'(traD36 proAB ⁺ , lacI ^q , lacZΔM15)
Stbl4 [®] (Invitrogen)	mcrA Δ(mcrBC-hsdRMS-mrr) recA1 endA1 gyrA96 gal-thi-1 supE44 λ- relA1 Δ(lac-proAB)/F' proAB ⁺ lacI ^q ΔM15 Tn10 (TetR)
TOP10 (Hanahan, 1983)	F- mcrA (mrr-hsdRMS-mcrBC) 80lacZM15 lacX74 recA1 ara139 (ara-leu)7697 galU galK rpsL (Str ^R) endA1 nupG

2.1.6 Oligonukleotide

Oligonukleotid-Primer zur Amplifikation von scFv(30) mit 5'- und 3'- *NaeI*-Schnittstellen aus pSW5-STII-scFv(30)-MH:

<i>NaeI</i> -scFv30 (fwd):	5'-gccggcGGAGTTCCGAGCTCGTGATGACCCAG-3'
<i>NaeI</i> -Stopp-scFv30 (rev):	5'-gccggcTCATGCAGAGACAGTGACCAGAG-3'

Oligonukleotid-Primer zur Amplifikation der SFFV-EGFP cDNA mit 5'- und 3'-*NotI*-Schnittstelle zum Austausch gegen PGK-Puro im pES.T6-x-PGK-Puro (rev) Konstrukt:

<i>NotI</i> -SFFV-sGFP aus SEW (fwd):	5'-CCgcgccgcCCAGAAAAGGGGGGAATGAAAGAC-3'
<i>NotI</i> -sGFP aus SEW (rev):	5'-CCgcgccgcTTTACTTGTACAGCTCGTCCATGCC-3'

Oligonukleotide zur Klonierung von TM.30 5'-*EcoRI*-Schnittstelle, Kozak-Sequenz, Signalpeptid sowie einem Myc-tag, und einer 3'-*SalI*-Schnittstelle zur Überführung in das pES.T6-x-SE Plasmid (in zwei Schritten):

Schritt 1: Amplifikation von TM.30 aus pMA-225.TM.30 unter Einführung von 5'-*EcoRI* und *XhoI*-Schnittstellen sowie eines 5'-Myc-tags und einer 3'-*Sall*-Schnittstelle:

*EcoRI*_XhoI-Myc (fwd): 5'-CCGgaattcACTGCATGctcgagGAGCAGAAGCTGATCAGC-3'
Sall-Stopp-30 (rev): 5'-GGCCGACgtcgacTCATGCAGAGACAGTGACCAGAGTCCC-3'

Schritt 2: Hybridisierung zweier revers komplementärer Oligonukleotide, bestehend aus einer *EcoRI*-Schnittstelle gefolgt von einer Kozak- und einer Signalpeptid-Sequenz, vor einer *XhoI*-Schnittstelle:

EcoRI-Kozak-SP-XhoI (fwd):
 5'-CCGgaattcCCGCCACCATGGACTGGATCTGGCGGATCCTGTTCTGGTCCGAGCCGCCACAGG
 CGCTCACTCTctcgagCGG-3'
EcoRI-Kozak-SP-XhoI (rev):
 5'-CCGctcgagAGAGTGAGCGCCTGTGGCGGCTCCGACCAGGAACAGGATCCGCCAGATCCAGTC
 CATGGTGGCGGgaattcCGG-3'

Oligonukleotide zur Amplifikation von 5.TM aus pMK-5.TM, 5.TM.30 aus pMA-5.TM.30, 225.TM aus pMK-225.TM oder 225.TM.30 aus pMA-225.TM.30 jeweils mit 5'-*EcoRI* und 3'-*Sall* Schnittstelle zur Einbringung in pES.T6-x-SE:

EcoRI-Kozak-signalpep (fwd): 5'-CCGgaattcCCGCCACCATGGACTGGATCTGGCGG-3'
Sall-Stopp-TM (rev): 5'-GGCCGACgtcgacTTAGGGCCGGCTTCTCTTG-3'
Sall-Stopp-30 (rev): 5'-GGCCGACgtcgacTCATGCAGAGACAGTGACCAGAGTCCC-3'

Oligonukleotid-Primer zur Sequenzierung von pSIEW-Konstrukten:

SIEW (fwd): 5'-GCTTCTGCTTCCCGAGCTC-3'
 SIEW (rev): 5'-GGTAGGTTAACTGATACAGAATGG-3'

Oligonukleotid-Primer zur Sequenzierung von pES-Konstrukten

Seq pES (fwd): 5'-GGTGGACCATCCTCTAG-3'

Oligonukleotid-Primer zur Amplifikation des *M2* Gens auf Ebene der genomischen DNA transduzierter Zellen:

RT PCR M2 (fwd): 5'-CTTTTCGGCCTGGAACATAATC-3'
 RT PCR M2 (rev): 5'-GCCGCTTTCGCACTTTAG-3'

2.2 Methoden

2.2.1 Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)

Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) diente der Amplifikation bestimmter DNA Sequenzen. Ein typischer PCR-Ansatz hatte folgende Zusammensetzung:

10-100 ng	<i>template</i> -DNA
1 µl	dNTPs (10 mM Stock)
5 µl	MgCl ₂ (25 mM Stock)
5 µl	10x Polymerasepuffer
1 µl	<i>forward</i> -Primer (10 µM Stock)
1 µl	<i>reverse</i> -Primer (10 µM Stock)
1 µl	2000 U/ml Vent- oder Taq-Polymerase
ad 50 µl mit dH ₂ O	

Als Negativkontrolle wurde grundsätzlich ein Kontrollansatz ohne *template*-DNA durchgeführt. Die PCR-Reaktion wurde in einer *Biometra*® *TGradient* PCR-Maschine oder einem *Biometra*® *T3000 Thermocycler* von Whatman durchgeführt. Zu Beginn wurde die doppelsträngige *template*-DNA bei 95°C in Einzelstränge aufgeschmolzen. Die Spezifität der Primerbindung wurde durch eine passende *annealing*-Temperatur (T_M ; Formel s.u.) sichergestellt, bei der unspezifische Primerhybridisierungen nicht mehr stabil sind.

$$T_M [^{\circ}\text{C}] = \frac{20}{n_{\text{ges}}} \times [2 \times (n_A + n_T) + 4 \times (n_G + n_C)] - 5$$

Die Gesamtzahl der hybridisierenden Nukleotide ist mit n_{ges} abgekürzt. n_A , n_T , n_G und n_C bezeichnen die entsprechende Anzahl dieser Basen im hybridisierenden Bereich des Oligonukleotids.

In 30 Reaktionszyklen wurde eine exponentielle Amplifikation des gewünschten DNA-Segments durch die Polymerase erreicht. Die Vollständigkeit der DNA-Synthese wurde durch eine abschließende Inkubation für 10 min bei 72°C sichergestellt.

Im weiteren Verlauf wurden 40 µl der PCR-Ansätze mit 8 µl 6x DNA-Ladepuffer versetzt, auf ein 1%-Agarosegel aufgetragen und die gewünschten DNA-Fragmente anschließend isoliert (siehe Abschnitte 2.2.3 und 2.2.4).

2.2.2 Hybridisierung von DNA-Fragmenten

Zur Einführung eines N-terminalen IgG-Signalpeptids vor das *TM.30* Gen wurden in einem Zwischenschritt die Oligonukleotide EcoRI-Kozak-SP-XhoI (rev) und EcoRI-Kozak-SP-XhoI (fwd) hybridisiert. Dazu wurden jeweils 10 µl der 100 µM Stocklösungen der Oligonukleotide mit 10 µl NEB4 Puffer gemischt, die Mischung für 10 min auf 100°C erhitzt und anschließend langsam über Nacht auf RT abgekühlt. Der entstandene Oligoduplex wurde wie in Abschnitt 3.4.1 beschrieben weiterverwendet.

2.2.3 Elektrophoretische Auftrennung von DNA-Fragmenten mittels Agarosegel

TAE Puffer:	40 mM Tris, 1 mM EDTA, pH 8,0 eingestellt mit Eisessig
DNA-Ladepuffer:	0,25% (w/v) Bromphenolblau, 0,25% (w/v) Xylencyanol, 15% (w/v) Ficoll
Ethidiumbromid:	1 µg/ml in dH ₂ O

Zur Auftrennung und Analyse von DNA-Fragmenten wurde die Agarose-Gelelektrophorese eingesetzt. Als Laufpuffer diente ein Tris-Acetat-EDTA (TAE)-Puffer. Je nach gewünschtem Trennbereich wurden Gele mit 1-2% Agarosegehalt verwendet. Die Auftrennung erfolgte bei einer Spannung von 60-100 mV. Um die DNA mittels UV-Licht (365 nm) sichtbar zu machen, wurden 6 µl/120 ml des interkalierenden DNA-Farbstoffs Ethidiumbromid zugegeben. Die DNA wurde vor dem Auftrag auf das Gel mit DNA-Ladepuffer versetzt. Um die Größe der DNA-Fragmente bestimmen zu können, wurden 6 µl DNA-Größenstandard in eine separate Spur aufgetragen. Die Detektion erfolgte an einem UV-Tisch und das Gel wurde mit einer CCD-Kamera aufgenommen.

2.2.4 Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

PCR-Fragmente oder restriktionsverdaute DNA-Fragmente (siehe 2.2.5), die über eine Agarose-Gelelektrophorese (siehe 2.2.3) aufgetrennt wurden, wurden aus dem Gel ausgeschnitten und mit Hilfe des peqGOLD® Gel-Extraktionskits (peqLab) nach Herstellerangaben isoliert. Die eluierte DNA wurde für weitere Klonierungsschritte wie z.B. Restriktionsverdau (siehe 2.2.5) oder Ligation (siehe 2.2.7) verwendet.

2.2.5 Restriktionsverdau von Plasmid-DNA und DNA-Fragmenten

1-2 µg DNA oder 10 µl DNA einer Minipräparation (siehe 2.2.10) wurden in einem Gesamtvolumen von 20 µl mit 5 U Restriktionsendonuklease in dem vom Hersteller angegebenen Reaktionspuffer und gegebenenfalls unter Zugabe von 1 x bovines Serum

Albumin (BSA), für 1-3 h bzw. über Nacht bei 37°C inkubiert. Bei Doppelverdau wurde ein geeigneter Puffer verwendet, in dem beide Enzyme aktiv sind. Wenn möglich, wurden die Restriktionsendonukleasen nach dem Verdau für mindestens 30 min bei 65°C-80°C inaktiviert, damit der Reaktionsansatz sofort im nächsten Reaktionsschritt weiterverwendet werden konnte. Anderenfalls wurde die geschnittene DNA nach der Restriktion mittels Agarose-Gelelektrophorese (siehe 2.2.3) der Größe nach aufgetrennt, und die gewünschten DNA-Fragmente aus präparativen Gelen isoliert (siehe 2.2.4).

2.2.6 Dephosphorylierung linearisierter Plasmide

Um eine Religation geschnittener Plasmide zu verhindern, wurden im Anschluss an die Restriktion die 5'-Phosphatgruppen mithilfe der *Calf Intestinal Phosphatase* (CIP) entfernt. Hierfür wurden die Restriktionsansätze für 1 h bei 37°C mit 1 U CIP (NEB, Schwalbach) inkubiert, damit eine Ligation nur mit dem phosphorylierten 5'-Ende der *Insert*-DNA stattfinden kann. Anschließend wurde die DNA über präparative Agarose-Gelelektrophorese analysiert und aus dem Gel eluiert.

2.2.7 Ligation von Plasmid-DNA und DNA-Fragmenten

Mit Hilfe der T4-DNA-Ligase wurden verdaute DNA-Fragmente (*Inserts*) in linearisierte, dephosphorylierte Klonierungsvektoren mit komplementären kohäsiven Enden eingeführt. Vektor-DNA und *Insert*-DNA wurden in molaren Verhältnissen von etwa 1:3 eingesetzt.

Zusätzlich zu der DNA enthielten die Ligationsansätze:

2 µl	10x T4-Ligasepuffer
2 µl	ATP (10 mM Stock)
1,5 µl	T4-DNA-Ligase (~1 U/ 20 µl Ansatz; NEB, Schwalbach)
ad 20 µl	ddH ₂ O

Als Religationskontrolle wurde bei jeder Ligation ein Ansatz ohne *Insert*-DNA mitgeführt. Die Ligation wurde entweder über Nacht im Wasserbad bei 16°C oder für 2 h bei RT durchgeführt. Die Ligationsansätze wurden in chemokompetente *E. coli*-Bakterien transformiert (siehe 2.2.7, 2.2.8 und 2.2.9).

2.2.8 Herstellung chemokompetenter Bakterien

Luria Bertani (LB)-Medium:	5 g NaCl, 5 g Hefeextrakt, 10 g Trypton in 1 L dH ₂ O, autoklaviert
Lösung 1:	100 mM RbCl, 50 mM MnCl ₂ , 30 mM KAc, 10 mM CaCl ₂ , 13% (v/v) Glycerin, pH 5,8 eingestellt mit Essigsäure und sterilfiltriert
Lösung 2:	10 mM MOPS (pH 7), 10 mM RbCl, 75 mM CaCl ₂ und 13% (v/v) Glycerin, pH 7 eingestellt mit NaOH und sterilfiltriert

Über Nacht wurde eine 6 ml Vorkultur von *E. coli* Bakterien in LB-Medium bei 37°C und 220 rpm kultiviert. Die Vorkultur wurde 1:100 in 400 ml LB-Medium verdünnt und bis zu einer OD₆₀₀ = 0,5 bei 37°C im Schüttelinkubator kultiviert. Diese Hauptkultur wurde 15 min auf Eis abgekühlt und 15 min bei 6000 x g und 4°C pelletiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 133 ml eiskalter Lösung 1 resuspendiert und 2 h auf Eis inkubiert. Es folgte ein weiterer Zentrifugationsschritt für 15 min bei 6000 x g und 4°C. Wiederum wurde der Überstand verworfen und das Pellet diesmal in 10 ml eiskalter Lösung 2 aufgenommen und aliquotiert. Die Aliquots wurden in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert.

2.2.9 Transformation von Plasmid-DNA in *E. coli*

LB-Ampicillin (LB-Amp) Medium:	LB-Medium (Abschnitt 2.2.8), 100 µg/ml Ampicillin
LB-Ampicillin (LB-Amp) Agar:	LB-Medium (Abschnitt 2.2.8), 1,5% (w/v) Agar, 100 µg/ml Ampicillin

Jeweils 0,1-1 µg DNA bzw. 10 µl eines Ligationsansatzes (siehe 2.2.7) wurden mit 50-100 µl chemokompetenten Bakterien (siehe 2.2.8) gemischt und 10 min auf Eis inkubiert. Nach einem Hitzeschock für 1 min bei 42°C wurden die Bakterien 2 min auf Eis abgekühlt. Nach Zugabe von 500 µl Ampicillin-haltigem LB-Medium wurden die Bakterien für 1 h bei 37°C im Schüttelinkubator kultiviert. Es wurde die komplette Zellsuspension auf einer Ampicillin-haltigen LB-Agarplatte ausgestrichen und über Nacht bei 37°C im Brutschrank kultiviert. Zur Transformation von DNA in elektrokompetente Stbl4-Bakterien (Invitrogen) wurde das Protokoll des Herstellers befolgt.

2.2.10 Isolierung von Plasmid-DNA aus *E. coli*

Transformierte *E. coli* Einzelklone (2.2.9) wurden in 5 ml LB-Amp-Medium über Nacht bei 37°C im Schüttelinkubator kultiviert. Für eine Plasmid-Präparation in kleinem Maßstab wurde das *peqGOLD® Plasmid Miniprep Kit I* (peqLab) verwendet. Für eine Plasmid-Präparation in größerem Maßstab wurde die Vorkultur in 300-500 ml Ampicillin-haltigem LB-Medium verdünnt und erneut über Nacht wie beschrieben kultiviert. Die Plasmid-Präparation erfolgte mit dem *NucleoBond® Xtra Maxi-Kit* (Machery-Nagel) nach dem Protokoll des Herstellers.

Die DNA-Konzentration wurde jeweils mit Hilfe eines NanoDrop 1000 Spektrophotometers (Thermo Fisher Scientific) bestimmt.

2.2.11 Isolierung von genomischer DNA aus humanen Zellen

Die Isolierung genomischer DNA aus humanen Zellen erfolgte mit dem *DNeasy® Blood & Tissue* Kit von Qiagen nach Angaben des Herstellers.

2.2.12 DNA-Sequenzierung

Die DNA-Sequenzierung erfolgte mittels PCR mit dem Didesoxyverfahren nach Sanger und wurde durchgeführt von Margot Landersz (Sequenzierservice des Georg-Speyer-Hauses) oder von der Firma GATC (Freiburg). Dazu wurden jeweils ca. 50 ng DNA und 10 pmol/µl Primer pro Sequenzierreaktion eingesetzt bzw. die Anweisungen der Firma GATC befolgt.

2.2.13 scFv(30) Antikörperfragment Epitop-Mapping

18-mer Peptide mit 17 Aminosäuren Überlapp der EGFR-ICD Sequenz (AS 645-1186 des humanen reifen Proteins; UniProt Nummer P00533 ohne Signalpeptid AS 1-24) wurden mit Hilfe eines MultiPep RS Instruments (Intavis Bioanalytical Instruments) über Polyethylenglykol (PEG)-Linker auf Zellulosemembranen synthetisiert (gespottet) und anschließend ähnlich wie in einer Westernblot Analyse (Abschnitt 2.2.19) behandelt. Nach Rehydrierung der Membran und dem Blocken unspezifischer Bindungsstellen erfolgte die Inkubation mit 5 µg/ml rekombinantem scFv(30) Protein. Letzteres wurde bakteriell exprimiert, unter denaturierenden Bedingungen mittels Ni²⁺-Affinitätschromatographie aus *Inclusion bodies* aufgereinigt und anschließend per Dialyse rückgefaltet (Müller, 2009). Die Detektion des gebundenen scFv(30) Proteins erfolgte durch Inkubation mit einem StrepTactin®-HRP-Konjugat (ST-HRP), das den Strep-tag II (STII) des rekombinanten Antikörperfragments erkennt, und anschließender ECL/Chemolumineszenz Detektion. Als Kontrolle wurde die Membran nur mit ST-HRP inkubiert.

2.2.14 Produktion von lenti- oder γ -retroviralen Vektorpartikeln in 293T Zellen

Vesicular Stomatitis Virus Protein G (VSV-G) pseudotypisierte lentivirale Vektorpartikel wurden durch Co-Transfektion von 293T Zellen mit dem respektiven lentiviralen pSIEW Transferplasmid (10 μ g) zusammen mit den Verpackungs- bzw. Hüllproteinplasmiden pCMV_ Δ R8.91 (6.5 μ g) und pMD2.G (3.5 μ g) (Zufferey *et al.*, 1997) durch Standard Polyethylenimin- (PEI) (Boussif *et al.*, 1995) oder Kalzium-Phosphat-Transfektion (siehe unten) generiert.

Gibbon Ape Leukemia Virus (GALV) pseudotypisierte γ -retrovirale Vektorpartikel wurden durch Co-Transfektion von 293T Zellen mit dem respektiven γ -retroviralen pES.T6 Transferplasmid (3.4 μ g) zusammen mit den Verpackungs- bzw. Hüllproteinplasmiden M634 (5.5 μ g) und M620 (1.5 μ g) (beide freundlicherweise von Dr. M. Grez zur Verfügung gestellt) durch Standard PEI-Transfektion (siehe unten) generiert.

Transfektion mittels Kalzium-Phosphat:

TE Puffer: 1 M Tris-HCl, pH 7,5, 1 mM EDTA
 2 x *Hank's buffered saline* (HBS): 281 mM NaCl, 100 mM HEPES, 1,5 mM Na₂HPO₄,
 pH 7,12

4 x 10⁶ 293T Zellen wurden in eine 10 cm Kulturschale ausgesät und über Nacht kultiviert. Der Transfektionsansatz bestehend aus 500 μ l TE Puffer, den oben beschriebenen DNA-Mengen und 60 μ l 2 M CaCl₂ wurde unter ständigem Vortexen mit 500 μ l HBS gemischt und für 15 min bei RT inkubiert. Die Zellen wurden mit 1 mM Chloroquin versetzt und anschließend wurde der Transfektionsansatz zugetropft. Nach 48-72 h Inkubation bei 37°C wurde der Vektorpartikel-enhaltende Kulturüberstand abgenommen, sterilfiltriert und entweder direkt zur Transduktion verwendet oder aliquotiert und bei -80°C gelagert.

Transfektion mittels Polyethylenimin:

4 x 10⁶ 293T Zellen wurden in eine 10 cm Kulturschale ausgesät und über Nacht kultiviert. Der Transfektionsansatz bestehend aus den oben beschriebenen DNA-Mengen und 2,7 μ l 10 mM PEI/ μ g DNA wurde in 500 μ l PBS gemischt und für 15 min bei RT inkubiert. Nach 2 h Aushungern der Zellen in 5 ml DMEM supplementiert mit Glutamat wurde der Transfektionsansatz zugetropft und die Zellen wurden für 4 h bei 37°C inkubiert. Abschließend erfolgte ein Mediumwechsel zu DMEM Komplettmedium (siehe 2.1.4). Nach weiteren 48-72 h bei 37°C wurde der Vektorpartikel-enhaltende Kulturüberstand abgenommen, sterilfiltriert und entweder direkt zur Transduktion verwendet oder aliquotiert und bei -80°C gelagert.

2.2.15 Bestimmung des Vektortiters

Zur Bestimmung des Vektortiters (TU/ml) der generierten Vektorpartikel wurden 1×10^5 293T Zellen am Tag vor der Transduktion in Triplikaten in 24-well Kulturplatten (Gesamtvolumen 500 μ l) ausgesät. Direkt vor der Transduktion wurden serielle Verdünnungen (1:10 bis 1:10000) des Vektorpartikel-haltigen Kulturüberstandes in 250 μ l hergestellt. 250 μ l Medium Vertiefung wurden durch 250 μ l der seriellen Verdünnungen ersetzt und die Ansätze, in Gegenwart von 8 μ M Polybren, für 60 min bei 1800 x g und 32°C zentrifugiert (Hettich Rotina 46R). Nach 72 h wurde der Anteil an EGFP-positiven, transduzierten Zellen mittels FACS-Analyse (siehe 2.2.21) bestimmt. Zur Berechnung des Titers mit folgender Formel wurden nur Ergebnisse unterhalb von 15% genutzt.

$$\text{Titer (TU/ml)} = \text{Anzahl ausgesäter Zellen} \times \frac{\% \text{ positive Zellen}}{100} \times \text{Verdünnungsfaktor}$$

2.2.16 Virale Transduktion nach der *Spinfection* Methode

$2,5 \times 10^5$ zu transduzierende Zellen wurden in 6-well Kulturplatten ausgesät und über Nacht kultiviert. Anschließend wurden die Zellen mit unterschiedlichen Mengen Viruspartikel-haltigem Kulturüberstandes in einem Gesamtvolumen von 2 ml versetzt und, in Anwesenheit von 8 μ M Polybren, für 1 h bei 1800 x g und 32°C in einer Hettich Rotina 46R Zentrifuge zentrifugiert. Nach 48-72 h Kultivierung bei 37°C wurde die Transduktionseffizienz anhand EGFP-positiver Zellen mittels FACS-Analyse (siehe 2.2.21) bestimmt und transduzierte Zellen wurden mittels Durchflusszytometrie-basierender Zellseparation (siehe 2.2.21) angereichert.

2.2.17 Herstellung von Zelllysaten

RIPA-Puffer: 1% (v/v) NP-40, 0,5% (w/v) Na-Deoxycholat, 0,1% (w/v) SDS, 150 mM NaCl, 5 mM EDTA, 50 mM Tris/HCl pH 7,5

Trypsinierte Zellen wurden durch Zentrifugation (Heraeus Megafuge 1.0R) pelletiert, mit eiskaltem PBS gewaschen und durch Zugabe von 500 μ l komplettiertem (1 mM PMSF, 1 mM Orthovanadat und 1 Tablette *Complete Mini, EDTA-free Proteaseinhibitor Cocktail* pro 5 ml Puffer) RIPA-Puffer pro 10 cm Kulturschale bzw. 50-200 μ l pro well einer 6-well-Platte lysiert. Nach 20 min Inkubation auf Eis und kurzer Sonifikation (Diagenode Bioruptor), wurde der Zelldebris für 10 min bei 14000 rpm und 4°C pelletiert (Eppendorf *Centrifuge* 5402). Der Überstand, der die freigesetzten Proteine enthält, wurde in ein frisches Reaktionsgefäß

überführt. Die Proteinkonzentration wurde mit einem NanoDrop 1000-Gerät (Thermo Fisher Sciences) bestimmt und das Lysat direkt verwendet oder bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert.

2.2.18 SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Acrylamid/Bisacryl-

amid-Lösung: 30% (w/v) Acrylamid, 0,8% (w/v) Bisacrylamid

Trenngelpuffer: 1,5 M Tris-HCl, pH 8,8

Sammelpuffer: 1 M Tris-HCl, pH 6,8

SDS-Stammlösung: 10% (w/v) SDS

APS-Stammlösung: 10% (w/v) APS

Laemmli-Probenpuffer: 50 mM Tris-HCl, 0,1% (w/v) Bromphenolblau, 2% (w/v) SDS, 10% (v/v) Glycerin, 1% (v/v) β -Mercaptoethanol, pH 6,8

SDS-PAGE Laufpuffer: 25 mM Tris-HCl, 250 mM Glycin, 0,1% (w/v) SDS, pH 8,3

peqGold® Protein-

Marker IV (peqLab, Erlangen): Größenstandard für Proteine im Größenbereich von 11 kDa bis 170 kDa

Proteine wurden mittels SDS-PAGE (*sodium dodecylsulfate polyacrylamide gel electrophoresis*) analysiert.

Tabelle 2.1: Zusammensetzung verschiedener Trenngele

	7,5%	10%	12,5%
Trenngelpuffer	2 ml	2 ml	2 ml
30% Acrylamid/ 8% Bisacrylamid	2 ml	2,66 ml	3,32 ml
dH₂O	4 ml	3,32 ml	2,66 ml
10% (w/v) SDS	80 μl	80 μl	80 μl
10%(w/v) APS	30 μl	30 μl	30 μl
TEMED	10 μl	10 μl	10 μl

Tabelle 2.2: Zusammensetzung verschiedener Sammelgele

	3%	5%
Sammelgelpuffer	1 ml	0,5 ml
30% Acrylamid/ 8% Bisacrylamid	0,4 ml	0,67 ml
dH₂O	2,6 ml	2,7 ml
10% (w/v) SDS	40 µl	40 µl
10% (w/v) APS	15 µl	40 µl
TEMED	5 µl	4 µl

Proteinproben wurden mit Laemmli-Probenpuffer versetzt und für 5 min auf 95°C erhitzt. Als Größenstandard wurden auf eine separate Spur 6 µl Protein-Marker aufgetragen. Die Elektrophorese wurde im Sammelgel bei 100 V und im Trenngel bei 140 V durchgeführt.

2.2.19 Immunoblot Analyse (Westernblot und Alkalische Phosphatase Blot)

Anode I-Puffer: 300 mM Tris/HCl, 20% (v/v) Ethanol, pH 10,4

Anode II-Puffer: 25 mM Tris/HCl, 20% (v/v) Ethanol, pH 10,4

Kathode III-Puffer: 25 mM Tris/HCl, 40 mM 6-Amino-n-hexansäure, 20% (v/v) Ethanol, pH 10,4

Zu untersuchende Proteine wurden mittels Westernblot (WB) Analysen in Gesamtzelllysaten (siehe 2.2.17) nachgewiesen. Hierzu wurden die mittels SDS-PAGE aufgetrennten Proteine in einer Halbtrocken-Blotkammer (Froebel, Lindau) für eine Stunde bei einer Stromstärke von 50 mA pro Mini-Gel (~10 x 7,5 cm) auf eine Immobilon P (PVDF)-Membran (Millipore, Schwalbach) übertragen. Der Blot wurde wie folgt aufgebaut: 2 Lagen Whatman 3MM Filterpapier getränkt in Anode I-Puffer, 2 Lagen Filterpapier getränkt in Anode II-Puffer, Membran, SDS-Polyacrylamidgel, 2 Lagen in Kathode III-Puffer getränktes Filterpapier. Die Membran wurde kurz vor ihrer Verwendung für jeweils 1 min in Ethanol, gefolgt von Wasser und Anode II-Puffer gelegt und dadurch aktiviert.

Westernblot

Blockpuffer: 3% (w/v) Magermilchpulver oder 3-5% (w/v) BSA in TBST

TBS: 20 mM Tris/HCl pH 7,5, 150 mM NaCl

TBST: TBS, 0,05% (v/v) Tween® 20 (Fluka)

Für die spezifische Immundetektion eines auf die PVDF-Membran überführten Proteins wurde der Blot zunächst zur Vermeidung unspezifischer Antikörperbindung für mindestens 1 h in Blockpuffer gelagert. Anschließend wurde die Membran mindestens 1 h oder über Nacht (bei 4°C) mit einem geeigneten Erstantikörper, verdünnt in Blockpuffer oder 3-5% (w/v) BSA in TBST, inkubiert. Um überschüssigen Antikörper zu entfernen, wurde die Membran dreimal mit 5-10 ml TBST für 5 min gewaschen. Gebundene Erstantikörper wurden durch Inkubation für mindestens 20 min mit einem Meerrettich-Peroxidase (*Horse-Radish Peroxidase*, HRP)-konjugierten sekundären Antikörper detektiert, der speziesspezifisch den Fc-Teil des Erstantikörpers erkennt. Durch erneutes dreimaliges Waschen mit TBST wurden überschüssige Zweitantikörper entfernt, und gebundene Antikörperkomplexe wurden mit Hilfe des *ECL Westernblotting substrate*[®] Kit der Firma Pierce nach Protokoll des Herstellers nachgewiesen.

Alkalische Phosphatase Blot

AP-Puffer:	100 mM Tris, 100 mM NaCl, 5 mM MgCl ₂ , pH 9,5
AP-Stopp-Puffer:	20 mM EDTA in PBS
NBT-Stammlösung:	0,5 g NBT in 10 ml 70% (v/v) Dimethylformamid (DMF)
BCIP-Stammlösung:	0,5 g BCIP in 10 ml 100% (v/v) DMF
AP-Substratlösung:	66 µl NBT-Lösung, 33 µl BCIP-Lösung, 10 ml AP-Puffer

Durch die Bindung eines an alkalische Phosphatase gekoppelten Streptavidin wurden Strep-tag II fusionierte rekombinante Proteine, die an Antigene auf der PVDF-Membran gebunden hatten, nachgewiesen. Dazu wurde die zu analysierende Membran zunächst für mindestens 1 h bei Raumtemperatur in TBST geblockt, mit 5 µg/ml rekombinantem scFv(30) über Nacht bei 4°C inkubiert und anschließend mit Streptavidin-AP (3 µl in 15 ml TBST = 1:5000) für mindestens 1 h (Raumtemperatur) inkubiert. Durch dreimaliges Waschen mit TBST (für 5 min) wurde ungebundenes Streptavidin-AP entfernt, und die Membran wurde in AP-Substratlösung entwickelt. Durch die katalytische Aktivität der alkalischen Phosphatase wird die Phosphatgruppe des BCIP abgespalten und NBT wird gleichzeitig reduziert. Die entstandenen Substanzen reagieren miteinander zu einem schwerlöslichen violetten Präzipitat, das sich genau an der Stelle auf der Membran absetzt, an der das Streptavidin-AP an das Strep-tag II-gekoppelte Protein bindet. Die Reaktion wurde nach Bildung des Präzipitats nach etwa 30 bis 60 sec mit AP-Stopp-Puffer unterbrochen.

2.2.20 Co-Immunpräzipitation

Co-IP Puffer: 50 mM Tris (pH 7.4), 100 mM NaCl, 0.1% Triton X-100, 1 mM DTT, 1 mM EDTA, 10% Glycerol, *protease inhibitor cocktail*, 1 mM Orthovanadat

1 x 10⁶ Zellen wurden in 10 cm Schalen ausgesät und für 72 h mit angegebenen Konzentrationen Doxycyclin kultiviert. Anschließend wurden die Zellen geerntet und in 500 µl Co-IP Puffer resuspendiert. Einer 20-minütigen Inkubation auf Eis folgte eine 15-sekündige Sonifikation auf mittlerer Stufe (Diagenode Bioruptor) und das Pelletieren der Zelldebris bei 14000 rpm, 4°C für 20 min (Eppendorf *Centrifuge* 5402). Das geklärte Zelllysate wurde entweder direkt weiterverwendet oder bei -20°C gelagert. 2 µg Präzipitationsantikörper wurden mit der DMP/Triethanolamin Methode nach Herstellerangaben (Invitrogen) an 50 µl Protein G Dynabeads (Invitrogen) gekoppelt und anschließend für mindestens 2 h bei 4°C mit 150-200 µl Zelllysate inkubiert. Nach mehrfachem Waschen mit TBST wurden gebundene Proteine durch 10-minütiges Aufkochen in 50 µl reduzierendem 2-fach Laemmli-Puffer von den Dynabeads gelöst und anschließend mittels SDS-PAGE (siehe 2.2.18) und Immunoblot (siehe 2.2.19) analysiert.

2.2.21 Durchflusszytometrische Analyse (FACS)

FACS Puffer: 3-5% (v/v) FBS in DPBS

Alle FACS-Analysen wurden an den Durchflusszytometern FACSCalibur oder FACSCanto II (BD Biosciences) durchgeführt. Die Auswertung erfolgte respektive mit den Softwareprogrammen CELLQuest Pro oder FACSDiva (BD Biosciences).

Zur Bestimmung von Transduktionseffizienzen bzw. Vektorpartikel-Titern wurden die zu untersuchenden Zellen geerntet, je 2,5-5 x 10⁵ Zellen in FACS Röhren überführt, mit FACS Puffer gewaschen und anschließend an einem der oben genannten Geräte analysiert.

Zur Detektion von Oberflächenmolekülen auf Zellen wurden die zu untersuchenden Zellen geerntet, je 5 x 10⁵ Zellen in FACS Röhren überführt und mit FACS Puffer gewaschen. Die Färbung der Oberflächenmoleküle erfolgte für 1 h bei 4°C unter Lichtausschluss mit den angegebenen Antikörpern (siehe 2.1.2) und anschließendem Waschen mit FACS Puffer. Zur Detektion nicht direkt Fluorochrom-gekoppelter Erstantikörper wurden die Proben für 15 min bei 4°C unter Lichtausschluss mit speziesspezifischen Fluorochrom-gekoppelten Zweitantikörpern inkubiert, erneut gewaschen und analysiert.

Transduzierte, EGFP-positive Zellen wurden mittels FACS-basierender Zellseparation an einem FACSAria Fluoreszenz-aktivierten Zellsorter (BD Biosciences) angereichert. Dazu

wurden die Zellen geerntet, in FACS Puffer gewaschen und über ein Zellsieb vereinzelt. Die sortierten EGFP-positiven Zellen wurden in Medium in einem frischen FACS-Röhrchen aufgefangen, pelletiert und in frischem Medium weiterkultiviert.

2.2.22 MTT-Proliferationstest

MTT-Lösung:	10 mg/ml in PBS
Lysispuffer:	20% SDS in 50% Dimethylformamid; pH 4,7 eingestellt mit 80% Eisessig/20% 1 M HCl

Zur Untersuchung des Proliferationsverhaltens transduzierter, transmembrane Antikörperfragmente-exprimierender Zellen wurden $2,5 \times 10^4$ A431(M2), 5×10^4 MDA-MB468(M2) oder 1×10^5 MDA-MB453(M2) Zellen in Triplikaten in 96-well Kulturplatten ausgesät und für bis zu 96 h mit den angegebenen Doxycyclin Konzentrationen kultiviert. Zur Bestimmung der Viabilität und Proliferation wurde nach 24, 48, 72 und 96 h ein MTT Metabolisierungsassay durchgeführt (Schmidt *et al.*, 1997). Die Zellen wurden für 3 h mit 10 μ l einer MTT-Lösung inkubiert. In dieser Zeit setzen proliferierende Zellen das gelbe Tetrazoliumsalz zu einem wasserunlöslichen braunen Formazan um. Dieses wurde durch Zugabe von 90 μ l Lysispuffer aus den Zellen in Lösung genommen (mind. 3 h bei 37°C) und seine Absorption an einem SpectraMax340 Spektrophotometer (Molecular Dynamics) bei 595 nm gemessen.

2.2.23 Kristallviolett-Assay

Rotihistofix® (Roth):	4% (v/v) Formaldehyd
KV-Lösung:	0,5% (w/v) Kristallviolett in 20% (v/v) Methanol
Sorenson's Puffer:	0,1 M Natrium-Citrat, 50% Ethanol, pH 4,2

Zur Untersuchung des Proliferationsverhaltens transduzierter, transmembrane Antikörperfragmente-exprimierender Zellen wurden $2,5 \times 10^4$ A431/M2, 5×10^4 MDA-MB468/M2 oder 1×10^5 MDA-MB453/M2 Zellen in Triplikaten in 24-well Kulturplatten ausgesät und für 7-14 Tage in Anwesenheit angegebener Doxycyclin Konzentrationen kultiviert. Zweimal wöchentlich wurde das Medium ersetzt. Am Ende der Kultivierungszeit wurden die Zellen gewaschen und mit 200 μ l Rotihistofix® für 30 min fixiert und anschließend mit DPBS gewaschen. Es folgte eine 5-minütige Inkubation bei RT mit 400 μ l KV-Lösung zum Anfärben der Zellen. Nach gründlichem Waschen mit dH₂O wurden die angefärbten Zellen zunächst fotografiert und anschließend wurde der Farbstoff mit 400 μ l Sorenson's Puffer aus den Zellmembranen gelöst (30 min bei RT). Danach wurde die Absorption des Farbstoffs bei

540 nm an einem SpectraMax340 Spektrophotometer (Molecular Dynamics) gemessen. Die Absorptionswerte korrelieren direkt mit der fixierten Zellanzahl auf der Platte.

2.2.24 Immunfluoreszenzfärbungen und konfokale Laserscanning Mikroskopie

Rotihistofix® (Roth):	4% (v/v) Formaldehyd
0,1% Triton:	0,1% (v/v) Triton X-100 in PBS
Blockierlösung:	10% (v/v) FBS in PBS
DAPI-Lösung (Invitrogen):	1 mg/ml Stock (1:30000 in dH ₂ O verdünnen)
Mowiol 4-88:	6,97 g 86% Glycerin, 2,4 g Mowiol 4-88, 5,03 ml ddH ₂ O, 12 ml 0,2 M Tris HCl pH 8,5

1 x 10⁵ Zellen wurden in 6-well Kulturplatten auf Deckgläschen ausgesät und in Anwesenheit angegebener Doxycyclin Konzentrationen für 72 h kultiviert. Anschließend wurden die Zellen gewaschen und mit 500 µl Rotihistofix® (Roth) für 30 min bei RT fixiert. Nach erneutem Waschen mit PBS wurden die Zellen für 5 min bei RT mit 1 ml 0,1 % Triton permeabilisiert. Zur Blockierung unspezifischer Bindungsstellen wurden die Zellen 30 min bei RT mit 1 ml Blockierlösung inkubiert. Anschließend folgte die Inkubation mit nicht Flurochromgekoppelten Erstantikörpern (siehe 2.1.2) für 1 h bei RT. Nach mehrfachem gründlichem Waschen mit PBS schloss sich die Inkubation mit speziesspezifischen Flurochromgekoppelten Sekundärantikörpern und/oder direkt markierten Erstantikörpern (siehe 2.1.2) für 75 min bei RT unter Lichtausschluss an. Sämtliche Antikörper wurden in Blockierlösung verdünnt. Nach erneutem gründlichem Waschen mit PBS erfolgte die Kernfärbung mit DAPI für 5 min unter Lichtausschluss bei RT. Nach Entfernung nicht gebundenen Farbstoffs durch mehrmaliges Waschen mit PBS wurden die Deckgläschen mit Mowiol 4-88 auf Objektträgern eingebettet und unter Lichtausschluss bei 4°C bis zur Analyse gelagert. Die Analyse fand an einem Leica *Advanced Fluorescence Confocal Laser Scanning* Mikroskop SP5 (Leica) statt.

3 Ergebnisse

Rezeptortyrosinkinasen der ErbB-Familie, wie EGFR, werden nach der Bindung eines spezifischen Liganden in einer Dimerisierungs-kompetenten Konformation stabilisiert und bilden daraufhin Homodimere oder Heterodimere mit anderen Mitgliedern der ErbB-Familie (Ferguson *et al.*, 2003). Die Rezeptordimerisierung stimuliert die intrinsische Tyrosinkinaseaktivität und damit die Autophosphorylierung spezieller Tyrosine im C-terminalen Schwanz. Diese dienen wiederum als Bindungsstellen für intrazelluläre Substrate und Adaptormoleküle, die im Folgenden Wachstums-, Migrations- und Überlebens-fördernde Signalkaskaden auslösen (Hynes und Lane, 2005). Die Über- oder Fehlfunktion dieser Rezeptoren wird häufig in Glioblastomen und Tumoren epithelialen Ursprungs gefunden und wird mit der Pathogenese dieser Karzinome in Verbindung gebracht (Zandi *et al.*, 2007; Hynes und MacDonald, 2009).

Der therapeutische mAk Cetuximab (Erbix) hemmt Tumorwachstum, indem er an ein diskontinuierliches Epitop in der EGFR-Ektodomäne III bindet und damit Ligandenbindung sowie Rezeptoraktivierung inhibiert (Li *et al.*, 2005; Hartmann *et al.*, 2010). Cetuximab enthält, wie das scFv(225) Antikörperfragment, die variablen Domänen der schweren und leichten Kette des murinen mAk 225 (Sato *et al.*, 1983; Wels *et al.*, 1995). Die experimentelle Expression eines sekretierbaren scFv(225) Proteins in EGFR-exprimierenden Tumorzellen inhibierte in autokriner Weise die EGF-stimulierte Rezeptoraktivierung sowie das Wachstum dieser Zellen (Beerli *et al.*, 1994; Shaki-Loewenstein *et al.*, 2005).

Die Generierung funktioneller Intrabodies, die an zytoplasmatische Zielstrukturen binden, ist dagegen schwierig, da Antikörper und scFv-Fragmente gewöhnlich die Ausbildung von Disulfidbrücken für die stabile und funktionale Expression benötigen. Dies ist im reduzierenden Milieu des Zytosols nicht möglich. Dennoch wurden solche EGFR-spezifischen Intrabodies in vorangegangenen Arbeiten der Gruppe mittels eines gepaarten Phage-Display und *Yeast Two-Hybrid* Ansatzes isoliert (Hyland *et al.*, 2003).

In dieser Arbeit wurde das Epitop eines dieser scFv-Antikörperfragmente, scFv(30) bestimmt. Weiterhin wurde untersucht, ob es möglich ist, funktionale bispezifische transmembrane Antikörperfragmente zu generieren, die simultan über die scFv(30)-Domäne an die EGFR-ICD und über die scFv(225)- bzw. scFv(FRP5)-Domäne an die EGFR-respektive ErbB2-ECD binden können. Außerdem wurde der Einfluss der Expression dieser 225.TM.30 oder 5.TM.30 Moleküle auf die EGFR- bzw. ErbB2-Expression sowie auf das Wachstum ErbB-abhängiger Tumorzellen evaluiert.

3.1 Bestimmung der Bindungsstelle des EGFR-spezifischen Antikörperfragments scFv(30)

Das scFv(30) Antikörperfragment wurde in vorangegangenen Studien der Arbeitsgruppe mittels eines gepaarten Phage Display und *Yeast Two-Hybrid* Ansatzes aus einer epidermalen Wachstumsfaktor-Rezeptor (EGFR)-spezifischen scFv-Antikörper Bibliothek isoliert. Das Protein wurde in korrekt gefaltetem Zustand im Zytoplasma transfizierter Zellen exprimiert und band spezifisch an die intrazelluläre Domäne (ICD) des EGFR (Hyland *et al.*, 2003). Auch die Funktionalität des scFv(30) Moleküls als bakteriell-exprimiertes rekombinantes Protein wurde in eigenen Vorarbeiten gezeigt (Müller, 2009). In der zuletzt genannten Arbeit wurden auch erste Experimente durchgeführt, die Bindungsstelle des scFv(30) Antikörperfragments im EGFR zu bestimmen. In *Peptid-Spotting* Experimenten wurde die Bindungsstelle auf die Aminosäuresequenz 1153-1170 (FPKEAKPNGIFKGGSTAEN, UniProt Nummer P00533 ohne Signalpeptid (AS 1-24)) am C-terminalen Ende des EGFR eingegrenzt. Durch die Untersuchung N- und C-terminaler Verkürzungen dieses Peptids wurde versucht das genaue Epitop einzugrenzen (Müller, 2009). Diese Experimente wurden hier fortgeführt.

Das Plasmid pSW5-STII-scFv(30)-MH zur bakteriellen Expression des scFv(30) Proteins ist in Abbildung 3.1.1A dargestellt. Die bakterielle Proteinexpression wurde durch Zugabe von Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid (IPTG) induziert und das Antikörperfragment über den Hexahistidin-*tag* aus Einschlusskörperchen (*Inclusion bodies*) aufgereinigt und rückgefaltet (Müller, 2009). In Bindungsanalysen wurden Lysate von EGFR-positiven MDA-MB468 bzw. EGFR-negativen, ErbB2-positiven MDA-MB453 Zellen mittels SDS-PAGE aufgetrennt und auf Membranen übertragen. Die Membranen wurden anschließend mit 5 μ g/ml rekombinantes scFv(30) Protein inkubiert und gebundene Antikörperfragmente mit einem Streptavidin-alkalische Phosphatase (SA-AP) Konjugat und dem NBT/BCIP System detektiert (Abb. 3.1.1B/C). Die Inkubation der Blots mit kommerziellen EGFR- oder ErbB2-spezifischen Antikörpern sowie die alleinige Inkubation mit dem SA-AP Konjugat dienten als Kontrollen. Die spezifische Bindung des scFv(30) Proteins an EGFR (170 kDa) in MDA-MB468 Zelllysaten konnte bestätigt werden (Abb. 3.1.1C). Weiterhin wurden in diesen Blots Hintergrundsignale bei etwa 72 und 120 kDa beobachtet. Diese können auf die Inkubation mit SA-AP zurückgeführt werden, da sie auch auf dem mit nur SA-AP Konjugat inkubierten Kontrollblot detektiert wurden.

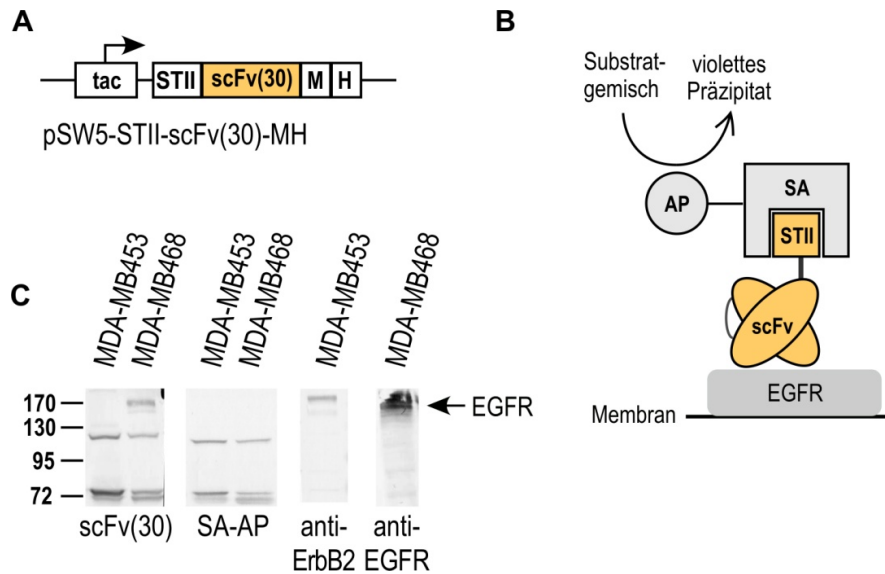


Abbildung 3.1.1 Bindung von rekombinantem scFv(30) Protein an EGFR aus Zelllysaten. (A) Schematische Darstellung des bakteriellen Expressionsplasmids pSW5-STII-scFv(30)-MH, der für das scFv(30) Antikörperfragment mit 5' Strep-tag II (STII) und 3' Myc- (M) und Hexahistidin-tag (H) kodiert. Die Expression wird von einem durch Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid (IPTG) induzierbaren *tac*-Promotor kontrolliert. **(B)** Schematische Darstellung des EGFR-Bindungsexperiments. **(C)** Je 50 μ g Protein aus MDA-MB468 (EGFR-positiv) oder MDA-MB453 (ErbB2-positiv) Zelllysaten wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt, auf eine Membran geblottet und mit 5 μ g/ml scFv(30) inkubiert. Die Detektion des rekombinanten scFv-Moleküls erfolgte über ein Streptavidin-AP (SA-AP) Konjugat und das NBT/BCIP System. Der Nachweis von EGFR (170 kDa) und ErbB2 (185 kDa) mit kommerziell erhältlichen Antikörpern und einem anti-Kaninchen-IgG-AP Konjugat, sowie die Inkubation mit SA-AP und Detektion mit dem NBT/BCIP System zur Bestimmung der Hintergrundsignale dienten als Kontrollen.

Das rekombinante scFv(30) Protein wurde für die genauere Untersuchung des EGFR-Epitops genutzt (vgl. 2.2.13). Dazu wurden N- und C-terminale Verkürzungen des oben vorgestellten Referenzpeptids (AS 1153-1170 der EGFR-Sequenz) mit Hilfe eines MultiPep RS Instruments (Intavis Bioanalytical Instruments) synthetisiert und auf Zellulosemembranen gespottet. Die Membran wurde mit 5 μ g/ml rekombinantem scFv(30) Protein inkubiert und gebundene Antikörperfragmente wurden über den Strep-tag II (STII) mit HRP-gekoppeltem StrepTactin® (ST-HRP) und dem ECL System detektiert (Abb. 3.1.2A/C).

Die minimalen N- bzw. C-terminal-verkürzten Peptidsequenzen, die ein dem Referenzpeptid vergleichbares Signal ergaben, wurden mit GIFKGSTAEN (AS 1161-1170) bzw. FPKEAKPNGIFKGSTAE (AS1153-1169) bestimmt (Abb. 3.1.2A). Diese Peptide enthalten das eingegrenzte scFv(30) Epitop. Zur Bestätigung dieser Schlussfolgerung wurde das in den beiden Peptiden enthaltene überlappende Peptid GIFKGSTAE (AS 1161-1169) auf eine Membran gespottet und wie oben beschrieben untersucht. Zur Kontrolle wurde ein Peptid der gleichen Aminosäurezusammensetzung aber mit willkürlicher Reihenfolge getestet (Abb. 3.1.2B). Nur das Peptid mit der korrekten Sequenz wurde von scFv(30) detektiert. Die

Entwicklung der Peptid-Spotmembran mit ST-HRP allein und dem ECL System ergab, wie erwartet, keine Signale.

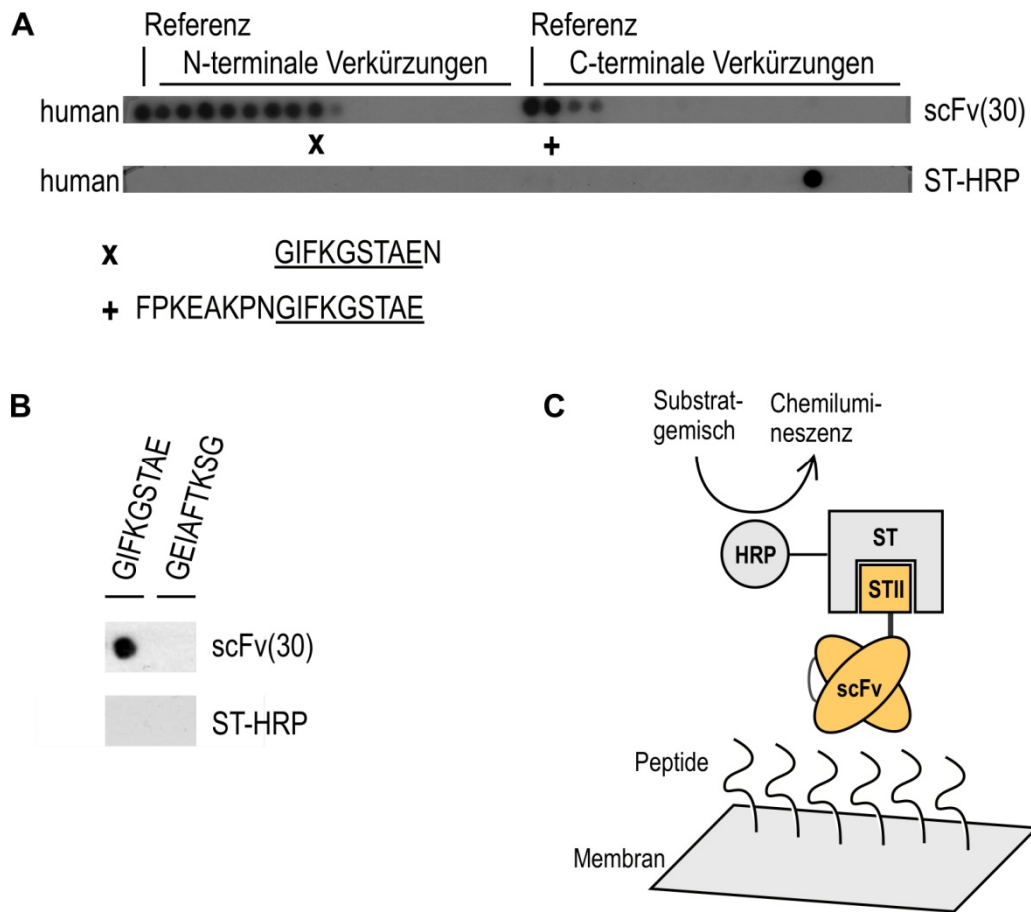


Abbildung 3.1.2 Untersuchung der minimalen EGFR-Bindungsstelle von scFv(30). (A) N- und C-terminal-verkürzte Sequenzen des in der vorangegangenen Diplomarbeit (Müller, 2009) bestimmten EGFR Referenzpeptids (AS 1153-1170, FPKEAKPNGIFKGSTAEN) wurden auf Membranen synthetisiert und diese mit 5 µg/ml scFv(30) Protein inkubiert (schematische Darstellung des Experiments in (C)). Die Detektion des gebundenen scFv-Moleküls erfolgte mit einem StrepTactin®-HRP Konjugat (ST-HRP) und dem ECL-System. Die Inkubation nur mit ST-HRP diente als Kontrolle. x und + kennzeichnen das jeweilige N- bzw. C-terminal-verkürzte Peptid, das eine dem Referenzpeptid vergleichbare Bindungssignalintensität aufweist. (B) Die überlappende Sequenz (GIFKGSTAE, AS 1161-1169) der Peptide + und x bzw. ein Kontrollpeptid, bestehend aus den gleichen Aminosäuren in anderer Reihenfolge, wurde wie in (A) beschrieben untersucht.

Das scFv(30) Antikörperfragment bindet damit am C-terminalen Ende der EGFR-Sequenz (AS 1161-1169, GIFKGSTAE). Diese Sequenz ist umgeben von zwei Tyrosinen (Y1148 und Y1173), die nach der Aktivierung des Rezeptors autophosphoryliert werden und als Bindungsstellen für SH2- oder PTB-Domänen-enthaltende Adaptorproteine dienen (Abb. 3.1.3) (Olayioye *et al.*, 2000).

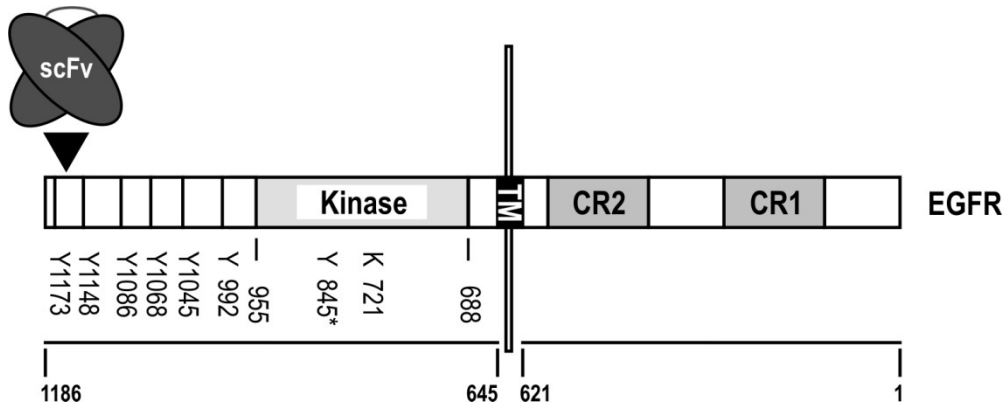


Abbildung 3.1.3 Schematische Darstellung der scFv(30) Bindungsstelle im EGFR. Das scFv(30) Antikörperfragment bindet an die AS 1161-1169 am C-terminalen Ende des EGFR. Es liegen zwei nach Aktivierung des Rezeptors phosphorylierte Tyrosine (Y1148 und Y1173) in direkter Nähe zum scFv(30) Epitop. Nummerierung gemäß UniProt P00533 ohne Signalpeptid (AS 1-24). Y: Tyrosin; K: Lysin; CR: Cystein-reiche Domäne; TM: Transmembrandomäne.

3.2 Ableitung der EGFR-bindenden mono- und bispezifischen Antikörperfragmente 225.TM und 225.TM.30

Die spezifische Bindung des scFv(30) Antikörperfragments an die intrazelluläre Domäne von EGFR wurde bereits in früheren Arbeiten durch Co-Immunpräzipitation, GST-Pulldown und konfokale Laserscanning Mikroskopie nachgewiesen (Hyland *et al.*, 2003; Müller, 2009). Nach der scFv(30) Expression in Tumorzellen konnte allerdings kein Einfluss auf die EGF-abhängige Proliferation EGFR-exprimierender Zellen gezeigt werden. Auch das Phosphorylierungsmuster von aktiviertem EGFR in COS-7 Zellen, die mit humanen EGFR- und scFv(30)-kodierenden Plasmiden co-transfiziert waren, wurde durch die scFv(30) Expression nicht beeinflusst (Hyland, 2003).

In den letzten Jahren wurde beschrieben, dass das *Targeting* von EGFR mit einer Kombination aus zwei antagonistischen monoklonalen Antikörpern (mAk), im Vergleich zu nur einem mAk, zu einer erhöhten Inhibition des Rezeptors führt (Deshane *et al.*, 1995; Friedman *et al.*, 2005; Kamat *et al.*, 2008; Pedersen *et al.*, 2010; Spangler *et al.*, 2010).

Hier wurde nun erstmals der Einfluss eines bispezifischen transmembranen Antikörpermoleküls, das extra- und intrazelluläre Epitope erkennt (225.TM.30, Abb. 3.2.1) auf EGFR und EGFR-exprimierende Zellen im Vergleich mit der monospezifischen Variante, 225.TM, untersucht. Das hierzu genutzte scFv(225) Antikörperfragment wurde aus dem murinen mAk 225 abgeleitet und bindet, wie der klinisch angewandten mAk Cetuximab (Erbix®) an die extrazelluläre Subdomäne III des EGFR (Beerli *et al.*, 1994; Goldstein *et al.*, 1995; Wels *et al.*, 1995). 225.TM.30 besteht aus der kodonoptimierten Sequenz des EGFR-ECD-spezifischen scFv(225) Antikörperfragments, das über einen *Myc-tag*, eine flexible humane CD8 α Gelenkregion (UniProt P01732; AS 117-178; Cystein 164 ersetzt durch ein Serin) und die humane CD28 Transmembrandomäne (UniProt P10747; AS 151-

185) mit der scFv(30) Sequenz verbunden ist. Das 225.TM Molekül enthält dagegen keine intrazelluläre scFv(30) Domäne.

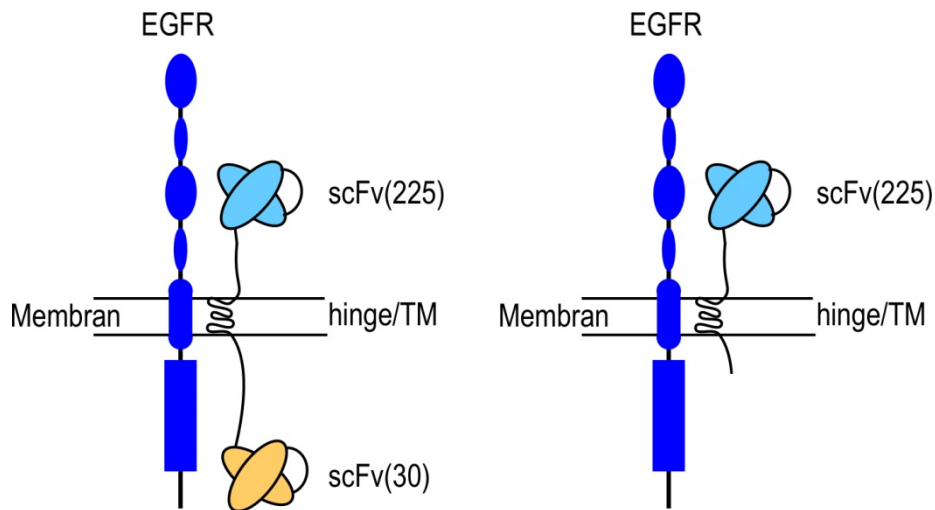


Abbildung 3.2.1 Schematische Darstellung des Aufbaus und der Bindungsstellen der mono- und bispezifischen transmembranen Antikörperfragmente 225.TM und 225.TM.30. 225.TM besteht aus einem, mittels einer CD8 α /CD28 Gelenk- und Transmembranregion (hinge/TM), in der Membran verankerten scFv(225) Fragment, das an die Subdomäne III der extrazellulären EGFR Domäne bindet. 225.TM.30 besitzt zusätzlich ein C-terminales scFv(30) Antikörperfragment, das an die AS 1161-1169 des EGFR C-Terminus bindet (vgl. Abb. 3.1.3).

3.2.1 Konstruktion und Expression von 225.TM.30 und 225.TM

Im Folgenden ist die Ableitung des 225.TM.30 Konstrukts aus der bereits vorhandenen 225.TM.28.z Sequenz (K. Schönfeld, unveröffentlicht) beschrieben (siehe Abb. 3.2.2A).

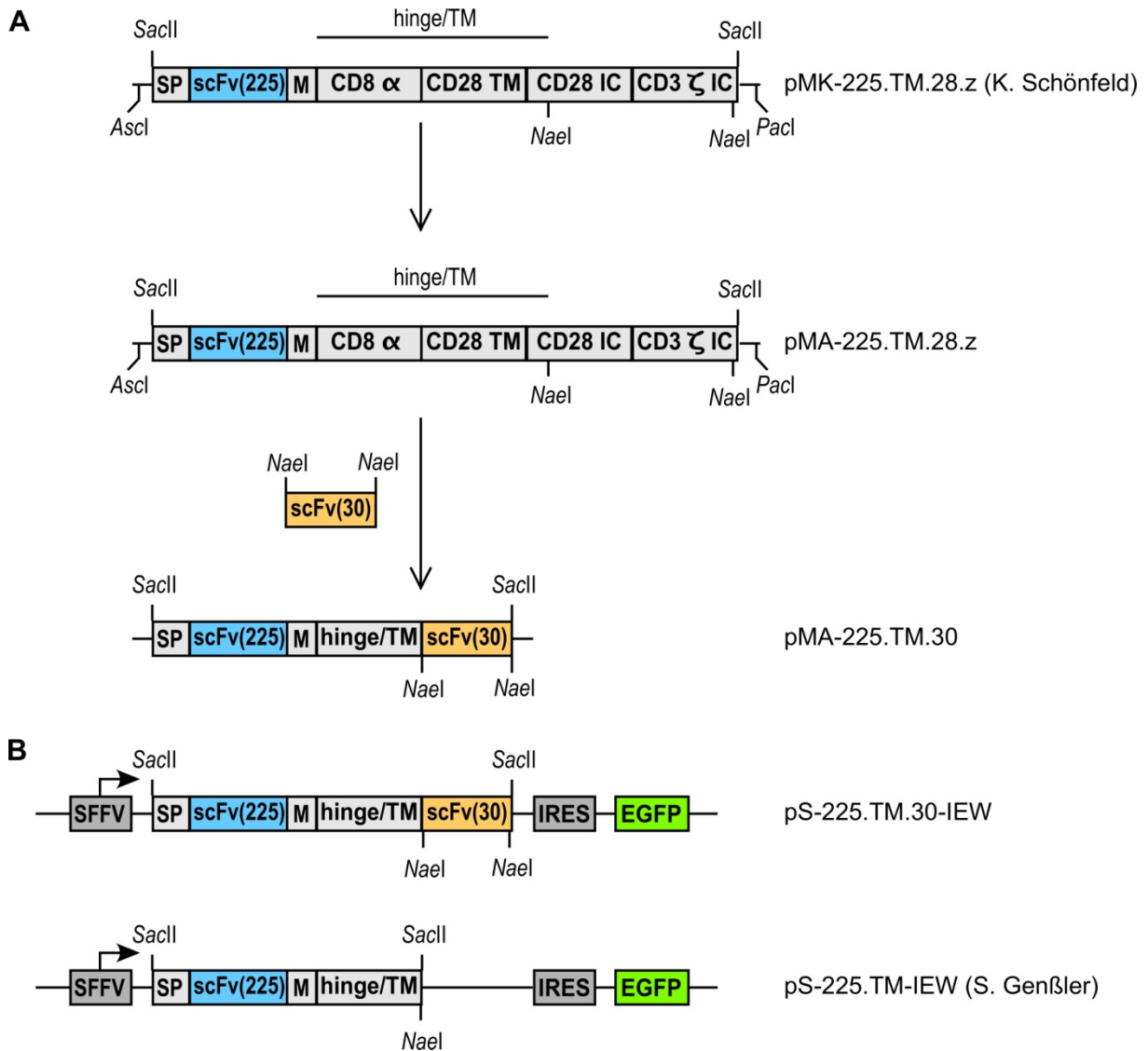


Abbildung 3.2.2 Ableitung der 225.TM.30 und 225.TM Konstrukte aus der bereits vorhandenen Sequenz 225.TM.28.z. (A) Strategie zur Herstellung des Klonierungsvektors pMA-225.TM.30 aus pMK-225.TM.28.z. **(B)** Schematische Darstellung der lentiviralen Transferplasmide pS-225.TM.30-IEW und pS-225.TM-IEW, die für das bi- bzw. monospezifische, transmembrane Antikörperfragment 225.TM.30 bzw. 225.TM 3' von einem *spleen focus forming* Virus (SFFV) Promotor kodieren. Zusätzlich enthalten diese Plasmide die *EGFP* cDNA 3' von einer internen ribosomalen Eintrittsstelle (IRES). SP: Signalpeptid der IgG schweren Kette; scFv(225): EGFR-ECD-spezifisches scFv-Antikörperfragment; M: Myc-tag; hinge/TM: CD8 α Gelenk- (UniProt P01732; AS 117-178; Cystein 164 ersetzt durch ein Serin) und CD28 Transmembranregion (UniProt P10747; AS 151-185); scFv(30): EGFR-ICD-spezifisches scFv-Antikörperfragment.

Die Sequenz des scFv(30) Antikörpers wurde unter Einführung von 5' und 3' *NaeI*-Restriktionsschnittstellen aus dem pSW5-STII-scFv(30)-MH Plasmid amplifiziert. Die Sequenz des 225.TM.28.z wurde über die Schnittstellen *Ascl* und *PacI* aus dem pMK- in das pMA-Klonierungsplasmid (beide GeneArt) überführt, da das Plasmidrückgrat des pMK-Konstrukts, aber nicht das des pMA-Konstrukts, eine in den weiteren Klonierungsschritten störende *NaeI*-Schnittstelle enthält. Anschließend wurden die intrazellulären CD28 und CD3 ζ Domänen über die vorhandenen *NaeI* Restriktionsschnittstellen durch die scFv(30) Sequenz

ersetzt (pMA-225.TM.30). pMA-225.TM.30 kodiert für das Signalpeptid der IgG schweren Kette, das scFv(225) Fragment, einen Myc-tag, die CD8 α Gelenk- und CD28 Transmembranregion sowie das scFv(30) Fragment. Die komplette 225.TM.30 Sequenz wurde über vorhandene SacII Schnittstellen 3' des *spleen focus forming* Virus (SFFV) Promotors in das lentivirale Transferplasmid pSIEW (Demaison *et al.*, 2002) kloniert (pS-225.TM.30-IEW). Dieses kodiert zusätzlich, zur Selektion transduzierter Zellen, für das *enhanced green fluorescence* Protein (EGFP) 3' von einer internen ribosomalen Eintrittsstelle (IRES). Die richtige Orientierung der scFv(30) bzw. 225.TM.30 cDNAs in den einzelnen Klonierungsschritten wurde durch Restriktionsverdau und Sequenzierung bestätigt. Das pS-225.TM-IEW Plasmid (S. Geßler, unveröffentlicht) kodiert entsprechend für die monospezifische 225.TM Sequenz.

Zur Herstellung lentiviraler Vektorpartikel wurden die pS-225.TM.30-IEW und pS-225.TM-IEW Transferplasmide jeweils mit dem *Vesicular Stomatitis* Virus Hüllprotein G (VSV-G) kodierenden pMD2.G, und dem lentivirale *gag* und *pol* Proteine kodierenden, pCMV_ΔR8.91 Plasmiden (Zufferey *et al.*, 1997) in 293T Zellen co-transfiziert (vgl. 2.2.14 und Abb. 3.2.3). Nach 72 h wurden die virale Vektorpartikel-haltigen Kulturüberstände abgenommen, steril filtriert und EGFR-überexprimierende A431 Plattenepithelkarzinomzellen der Vulva und MDA-MB468 Brustkarzinomzellen oder EGFR-negative, ErbB2-überexprimierende MDA-MB453 Brustkarzinomzellen transduziert (vgl. 2.2.16 und Abb. 3.2.3).

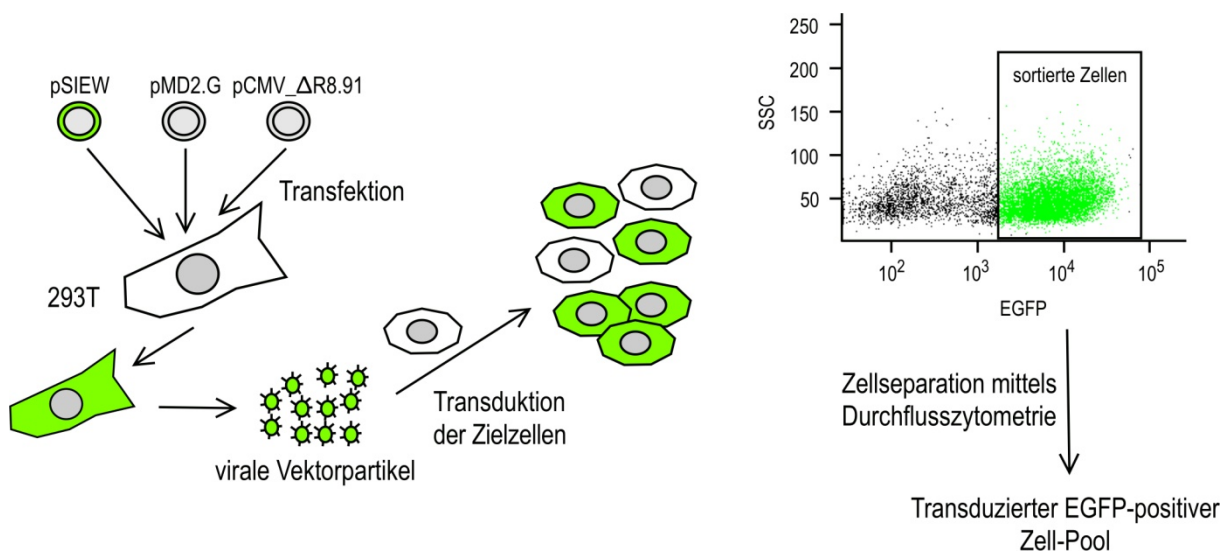


Abbildung 3.2.3 Schematische Darstellung der Generierung lentiviral transduzierter Zellen. 293T Zellen wurden zur Herstellung lentiviraler Vektorpartikel mit einem lentiviralen Transferplasmid (pSIEW), einem VSV-G Hüllprotein kodierenden Plasmid (pMD2.G) und einem Plasmid, das lentivirale *gag* und *pol* Gene enthält (pCMV_ΔR8.91) co-transfiziert. Virale Vektorpartikel-enthaltender Kulturüberstand wurde nach 72 h geerntet und zur Transduktion von Zielzellen genutzt. Abschließend wurden transduzierte, EGFP-positive Zellen mittels durchflusszytometrischer Zellseparation angereichert und die so gewonnenen Zellpopulationen analysiert.

Transduzierte Zellen wurden anhand der EGFP Expression mittels Durchflusszytometrie-basierter Zellseparation angereichert und die 225.TM.30 und 225.TM Expression wurde in Immunoblot und durchflusszytometrischen (FACS) Experimenten untersucht (Abb. 3.2.4).

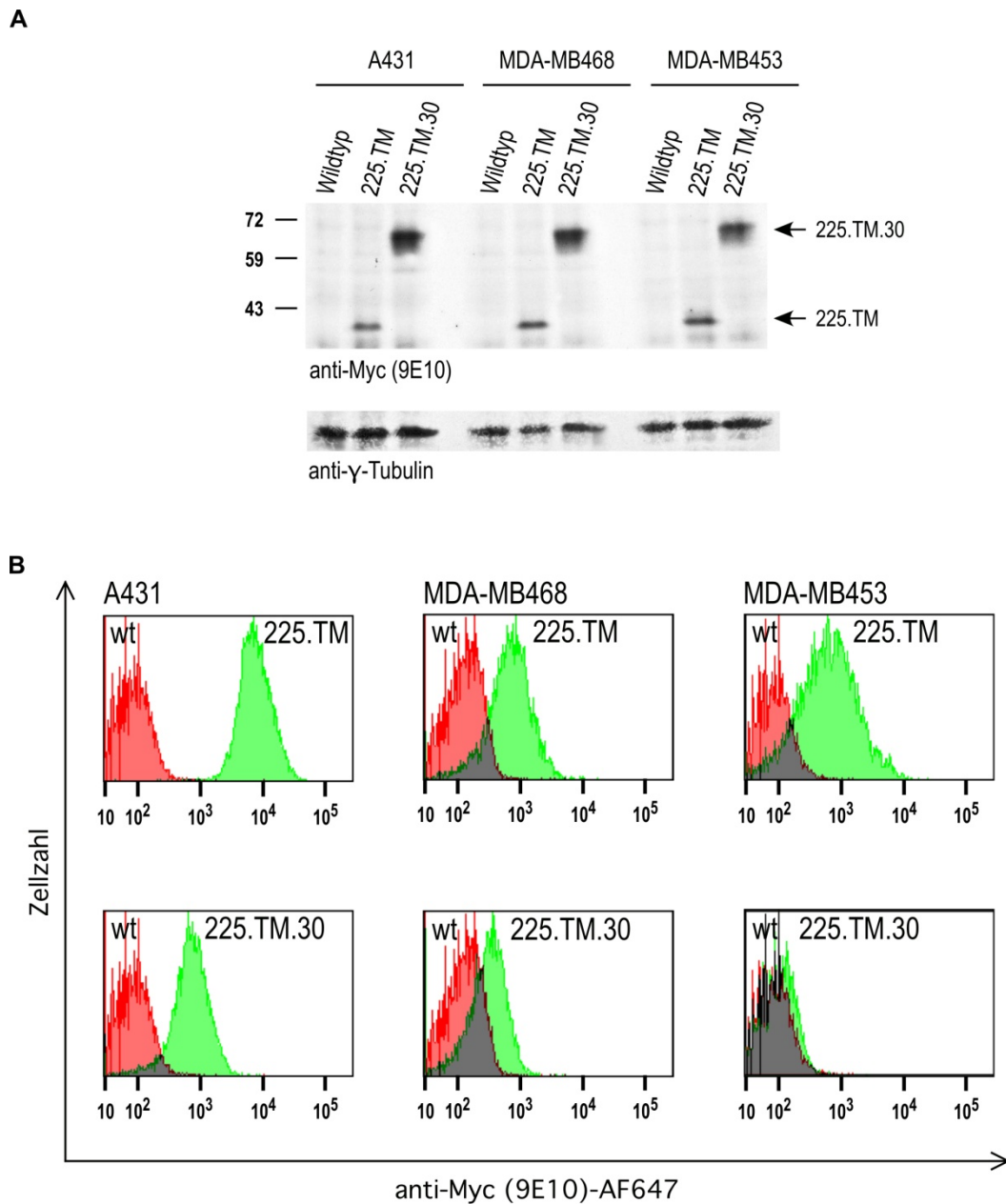


Abbildung 3.2.4 Nachweis der Expression von 225.TM.30 und 225.TM Proteinen in Karzinomzellen. EGFR-überexprimierende A431 Plattenepithelkarzinomzellen der Vulva und MDA-MB468 Brustkarzinomzellen bzw. EGFR-negative MDA-MB453 Brustkarzinomzellen wurden mit lentiviralen Vektorpartikeln, die für die Proteine 225.TM.30 bzw. 225.TM kodieren, transduziert und anhand der EGFP-Expression durchflusszytometrisch angereichert. **(A)** Proteine aus Gesamtzelllysaten der transduzierten Zellen wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt, auf eine Membran gebロットet und die Expression der 225.TM.30 (67 kDa) bzw. 225.TM (41 kDa) Proteine wurden in Immunoblot-Analysen mit Myc-tag-spezifischem Antikörper nachgewiesen. γ -Tubulin wurde als Ladekontrolle detektiert. **(B)** Die Expression der transmembranen Antikörperfragmente an der Oberfläche transduzierter Zellen wurde mittels FACS-Analyse mit einem AlexaFluor (AF)647-gekoppelten Myc-tag-spezifischen Antikörper bestätigt. Wildtypzellen (wt) dienten jeweils als Kontrolle.

225.TM (41 kDa) und 225.TM.30 (67 kDa) Proteine konnten in vergleichbaren Mengen in Gesamtzelllysaten der transduzierten Zellen in Immunoblot-Analysen mit *Myc-tag*-spezifischem Antikörper im Bereich der erwarteten molekularen Massen detektiert werden (Abb. 3.2.4A). Lysate von untransduzierten (Wildtyp) Zellen dienten als Kontrolle. Es konnte allerdings keine einheitliche Oberflächenexpression der 225.TM und 225.TM.30 Proteine, analysiert in FACS-Experimenten mit *Myc-tag*-spezifischem Antikörper, auf den unterschiedlichen Zellen nachgewiesen werden (Abb. 3.2.4B). Während das 225.TM Protein in ähnlichen Mengen auf MDA-MB468 und MDA-MB453 Zellen detektierbar war, zeigten A431 Zellen eine deutlich höhere 225.TM-Oberflächenexpression. Die 225.TM.30 Signale lagen im Vergleich zu 225.TM um etwa eine Log-Stufe niedriger. Außerdem wurde eine kontinuierliche Abnahme der 225.TM.30-Signalintensität von A431 über MDA-MB468 zu MDA-MB453 Zellen beobachtet. Auf MDA-MB453 Zellen wurde nur ein minimales 225.TM.30 Signal detektiert.

3.2.2 Einfluss der Proteine 225.TM und 225.TM.30 auf die Expression und Phosphorylierung von EGFR

Der parentale mAk 225, der die gleiche Bindungsstelle wie das scFv(225) Fragment besitzt, löst nach Bindung an EGFR die Internalisierung des Rezeptors aus ohne ihn dabei zu aktivieren (Sunada *et al.*, 1986). Daher wurde im nächsten Schritt der Einfluss der 225.TM und 225.TM.30 Expression auf die Gesamt- und Oberflächenexpression von EGFR untersucht (Abb. 3.2.5).

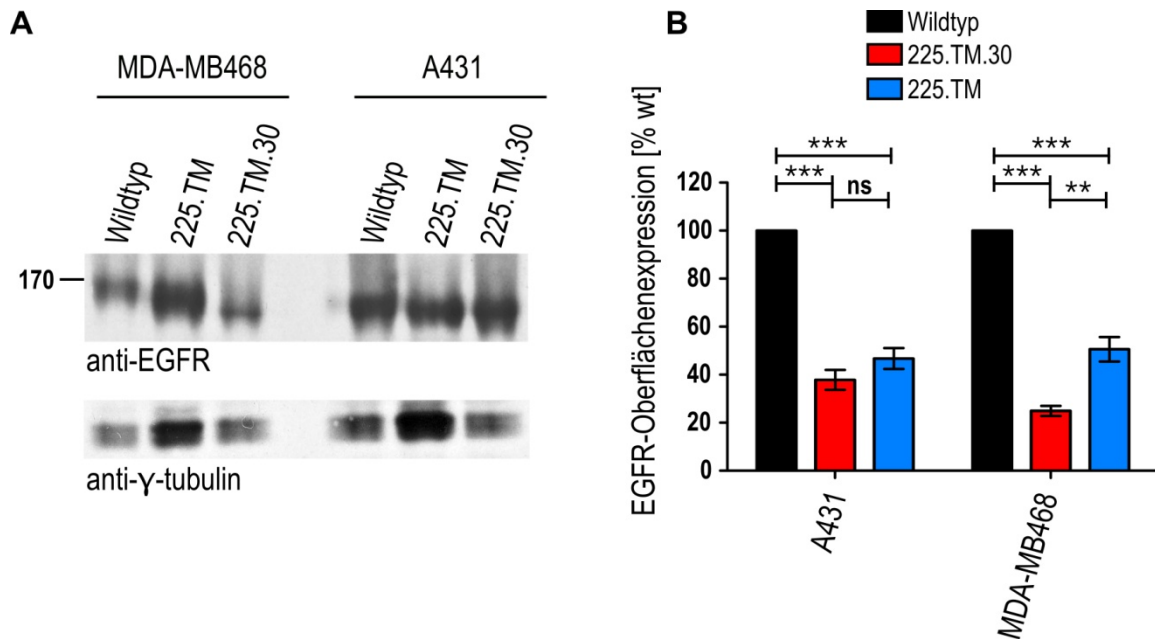


Abbildung 3.2.5 Untersuchung der EGFR Expression in 225.TM.30- oder 225.TM-exprimierenden Zellen. (A) Gesamtzelllysate mit transmembranen Antikörperkonstrukten transduzierter A431 bzw. MDA-MB468 Zellen wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt, auf eine Membran geblottet und die EGFR Expression in einer Immunoblot-Analyse mit einem EGFR-spezifischen Antikörper nachgewiesen. Der Nachweis von γ -Tubulin diente als Ladekontrolle. (B) Die EGFR-Oberflächenexpression auf 225.TM.30 (rot)- bzw. 225.TM (blau)-exprimierenden A431 und MDA-MB468 Zellen wurde mittels FACS-Analyse mit einem AF647-gekoppelten EGFR-spezifischen Antikörper untersucht. Die mittlere Fluoreszenzintensität (MFI) des EGFR-Signals untransduzierter Zellen (Wildtyp, schwarz) wurde auf 100% gesetzt. Die Ergebnisse der Mittelwerte \pm SEM aus mindestens drei unabhängigen Messungen sind dargestellt. ns: nicht signifikant; **: $p < 0.01$; ***: $p < 0.001$.

Gesamtzelllysate von mit 225.TM und 225.TM.30 Konstrukten transduzierten sowie von parental MDA-MB468 und A431 Zellen wurden in Immunoblot-Experimenten mit EGFR-spezifischem Antikörper untersucht. In Lysaten 225.TM- und 225.TM.30-exprimierender Zellen konnten ähnliche EGFR Mengen (170 kDa) wie in Wildtypzellen nachgewiesen werden. In MDA-MB468/225.TM.30 Lysaten wurde EGFR jedoch nur mit einem verringerten Molekulargewicht von etwa 130-150 kDa detektiert (Abb. 3.2.5A), was auf einen veränderten Phosphorylierungs- oder Glykosylierungsstatus des Rezeptors hindeuten könnte (Soderquist und Carpenter, 1984; Graus-Porta *et al.*, 1995; Cai *et al.*, 1998; Ling *et al.*, 2009). Im Gegensatz zu den Gesamt-EGFR Proteinmengen in Immunoblot-Analysen wiesen 225.TM- bzw. 225.TM.30-exprimierende A431 und MDA-MB468 Zellen in FACS-Experimenten eine hoch signifikante Reduktion in der EGFR-Oberflächenexpression verglichen mit Wildtypzellen auf (Abb. 3.2.5B). Die Expression von 225.TM.30 resultierte in einer 60-75% (A431 bzw. MDA-MB468) geringeren und die Expression von 225.TM in einer etwa 50% geringeren EGFR-Oberflächenexpression. In MDA-MB468 Zellen war der Effekt des 225.TM.30 Proteins auf die EGFR Expression (75%) signifikant höher als der des 225.TM

Proteins (50%). Diese Tendenz wurde auch in A431 Zellen (60% gegenüber 50%) beobachtet; der Effekt war dort aber nicht statistisch signifikant.

Zur Kontrolle wurde die Expression von ErbB2, einem weiteren Mitglied der ErbB-Familie, in 225.TM- bzw. 225.TM.30-exprimierenden MDA-MB453 Zellen untersucht (Abb. 3.2.6).

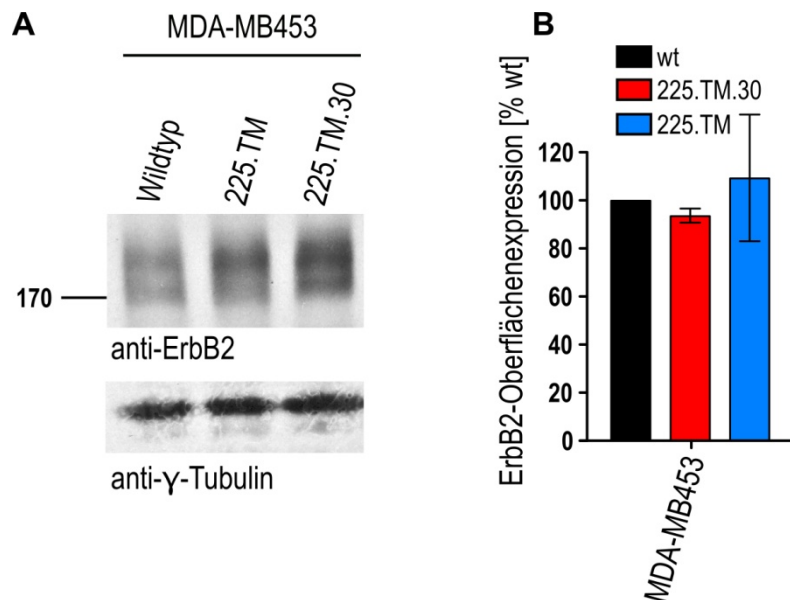


Abbildung 3.2.6 Untersuchung der ErbB2-Expression in 225.TM.30- oder 225.TM-exprimierenden MDA-MB453 Zellen. (A) Gesamtzelllysate wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt, auf eine Membran geblottet und die ErbB2-Expression wurde in einer Immunoblot-Analyse mit einem ErbB2-spezifischen Antikörper nachgewiesen. Der Nachweis von γ -Tubulin diente als Ladekontrolle. (B) Die ErbB2-Oberflächenexpression auf 225.TM.30 (rot)- und 225.TM (blau)-exprimierenden MDA-MB453 Zellen wurde mittels FACS-Analyse mit einem ErbB2-spezifischen Antikörper und APC-gekoppeltem Zweitantikörper untersucht. Die mittlere Fluoreszenzintensität (MFI) des ErbB2-Signals von Wildtypzellen (schwarz) wurde auf 100% gesetzt. Die Ergebnisse der Mittelwerte \pm SEM aus mindestens drei unabhängigen Messungen sind dargestellt.

Weder in Gesamtzelllysaten (Abb. 3.2.6A) noch auf der Zelloberfläche (Abb. 3.2.6B) von 225.TM- bzw. 225.TM.30-exprimierenden MDA-MB453 Zellen wurden im Vergleich zu Wildtypzellen Unterschiede in der ErbB2-Menge detektiert.

Diese Ergebnisse weisen auf eine EGFR-spezifische Interaktion der 225.TM und 225.TM.30 Proteine hin, die zu einem verringerten Transport von EGFR an die Zelloberfläche oder einer verstärkten EGFR-Internalisierung führt.

Nach der Ligandenbindung an die extrazelluläre Domäne des EGFR erfolgt eine Homodimerisierung oder Heterodimerisierung mit anderen Rezeptoren der ErbB-Familie. Diese führt zur Aktivierung der Tyrosinkinasedomäne (Phosphorylierung Tyr845 durch die Src Kinase) und zur Autophosphorylierung verschiedener weiterer Tyrosine (pTyr) im C-terminalen Schwanz des Rezeptors (vgl. Abschnitt 1.2.1) (Olayioye *et al.*, 2000; Yarden und Sliwkowski, 2001; Schlessinger, 2004). Im nächsten Schritt wurde untersucht, ob die

verminderte EGFR-Oberflächenexpression auf 225.TM- und 225.TM.30-exprimierenden A431 und MDA-MB468 Zellen Einfluss auf die Liganden-abhängige Aktivierung des EGFR hat. Dazu wurden mit Antikörperkonstrukten transduzierte und Wildtypzellen mit 50 ng/ml des natürlichen Liganden EGF stimuliert und anschließend wurde der Phosphorylierungsgrad verschiedener Tyrosinreste mit EGFRpTyr-spezifischen Antikörpern in Immunoblot-Analysen untersucht (Abb. 3.2.7).

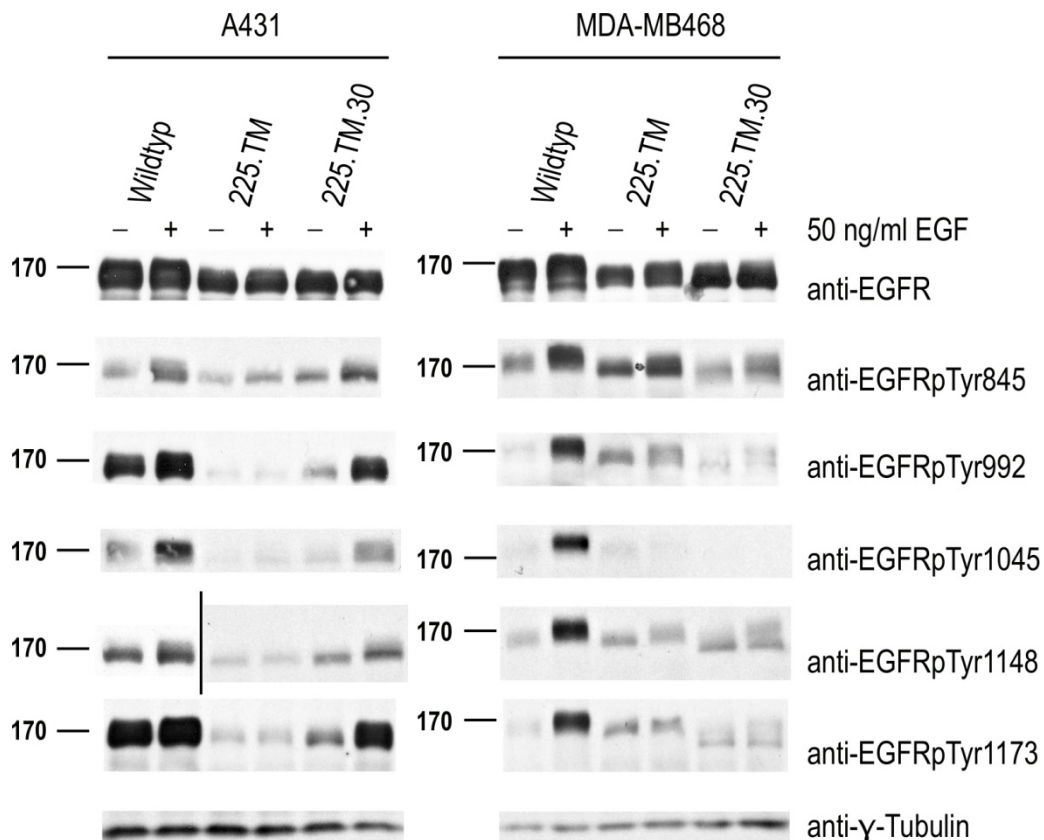


Abbildung 3.2.7 Untersuchung der EGFR-Aktivierung in 225.TM.30- bzw. 225.TM-exprimierenden A431 und MDA-MB468 Zellen. Zellen wurden über Nacht in 0,5% FCS-haltigem Medium ausgehungert und am nächsten Tag mit 0 (-) oder 50 (+) ng/ml EGF für 15 min bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden Zelllysate hergestellt, mittels SDS-PAGE aufgetrennt und auf eine Membran geblottet. Die Phosphorylierung einzelner Tyrosine im intrazellulären Bereich des EGFR wurde mittels Immunoblot mit verschiedenen EGFRpTyr-spezifischen Antikörpern analysiert. Der Nachweis von panEGFR und γ -Tubulin dienten als Kontrollen.

In parentalen MDA-MB468 Zellen führte die EGF-Stimulierung, wie erwartet, zu einem stärkeren Phosphorylierungssignal aller untersuchten Tyrosinreste verglichen mit nicht stimulierten Zellen (Abb. 3.2.7, rechts), was die Aktivierung des Rezeptors nachweist. Parentale A431 Zellen zeigten zudem bereits ohne EGF-Stimulierung pTyr-Signale, die, außer bei pTyr1173, nach EGF-Stimulierung geringfügig erhöht waren (Abb. 3.2.7, links). Verglichen mit Wildtypzellen wiesen MDA-MB468 Zellen nach Expression von 225.TM oder 225.TM.30 Proteinen dagegen eine deutlich geringere Aktivierung nach EGF-Stimulierung

auf (Abb. 3.2.7, rechts). Die 225.TM Expression in A431 Zellen resultierte ebenfalls in einer deutlichen Abschwächung der pTyr-Signale in EGF-stimulierten und nicht stimulierten Proben verglichen mit nicht transduzierten Zellen. Auch die in Wildtypzellen beobachtete leichte Signalsteigerung nach EGF-Stimulierung blieb in A431/225.TM Zellen aus (Abb. 3.2.7, links). Somit wurde die EGF-stimulierte Aktivierung des Rezeptors durch das 225.TM Protein fast komplett blockiert. Auch die Expression des 225.TM.30 Moleküls in A431 Zellen reduzierte das pTyr-Signal nicht stimulierter Zellen verglichen mit untransduzierten Zellen deutlich, während die Zugabe von exogenem EGF in diesen Zellen, im Vergleich zu nicht stimulierten Zellen, zu erhöhten pTyr-Signalen führte. Der Phosphorylierungsgrad der Wildtypzellen wurde allerdings nicht vollkommen erreicht. Immunoblots mit einem panEGFR-spezifischen Antikörper zeigten verglichen mit Wildtypzellen reduzierte EGFR Proteinmengen nach der Expression von 225.TM und 225.TM.30 Antikörpermolekülen (Abb. 3.2.7, oben). Dies konnte in vorherigen Immunoblot-Analysen (Abb. 3.2.5A) nicht gezeigt werden.

Zusammengefasst zeigen die Ergebnisse der Phosphorylierungsanalyse, dass die Expression des monospezifischen transmembranen Antikörperfragments 225.TM sowohl in A431 als auch in MDA-MB468 Zellen zu einer Inhibition der EGF-stimulierten Rezeptor-Aktivierung führt. Ähnliche Resultate wurden für MDA-MB468/225.TM.30 Zellen erhalten, wohingegen in EGF-stimulierten A431/225.TM.30 Zellen nur eine partielle Inhibition der Tyrosinphosphorylierung beobachtet wurde.

3.2.3 Einfluss der konstitutiven Expression von 225.TM.30 und 225.TM auf das Wachstum EGFR-positiver Zellen

Die Bindung verschiedener Liganden, wie EGF oder TGF α , an EGFR resultiert in der Aktivierung unterschiedlicher Signalwege (vgl. Abschnitt 1.2.2), die u.a. die Zellproliferation unterstützen (Yarden, 2001).

Daher wurde nachfolgend die Proliferation 225.TM- und 225.TM.30-exprimierender Zellen untersucht. Hierzu wurden parentale, 225.TM- oder 225.TM.30-exprimierende A431, MDA-MB468 sowie MDA-MB453 Zellen in gleichen Zellzahlen in Triplikaten ausgesät und nach 4, 24, 48 und 72 h (Tag 0 bis Tag 3) MTT-Metabolisierungsassays durchgeführt (Abb. 3.2.8; vgl. Abschnitt 2.2.22).

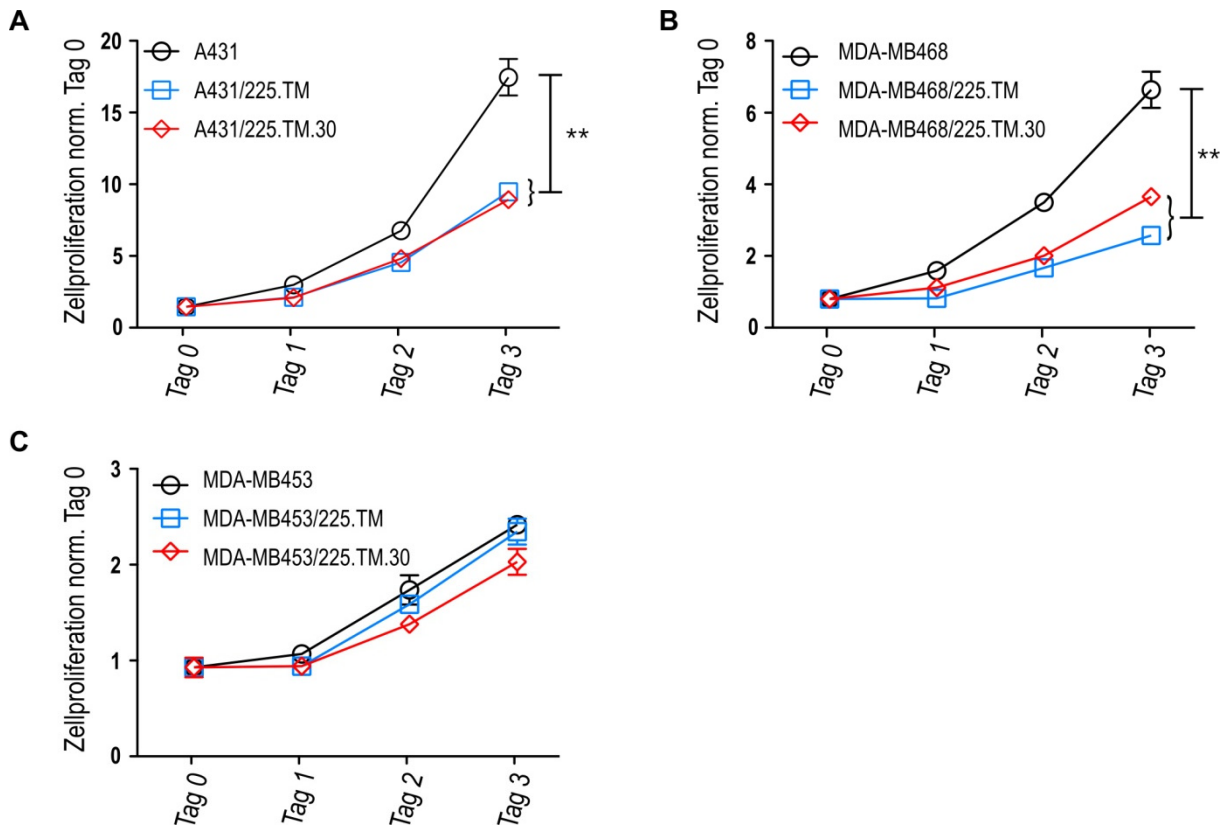


Abbildung 3.2.8 Analyse der Proliferation von 225.TM.30- und 225.TM-exprimierenden Zellen. Gleiche Zahlen von mit Antikörperkonstrukten transduzierten (225.TM.30: rote Rauten; 225.TM: blaue Quadrate) und parental (schwarze Kreise) A431 (A), MDA-MB468 (B) oder MDA-MB453 (C) Zellen wurden in Triplikaten in 96-well Platten ausgesät. Nach 4, 24, 48 und 72 h (Tag 0 bis Tag 3) wurde die Proliferation mit Hilfe eines MTT-Metabolisierungsassays untersucht. Die Mittelwerte normalisiert auf den Wert des Tags 0 \pm SEM sind dargestellt. **: $p < 0.01$.

Während die Proliferation von EGFR-negativen MDA-MB453 Zellen durch die Expression von 225.TM oder 225.TM.30 Molekülen nicht beeinflusst wurde (Abb. 3.2.8C), führte die Expression der Antikörperkonstrukte in EGFR-überexprimierenden A431 und MDA-MB468 Zellen über 72 h zu einer Wachstumsreduktion um die Hälfte im Vergleich zu unmodifizierten Zellen (Abb. 3.2.8A/B).

Die transduzierten Zellen wurden nach Zellseparation auf EGFP-positive Zellen (positiver Anteil über 90%) in kontinuierlicher Kultur gehalten und der Anteil EGFP-positiver Zellen wurde wöchentlich (jede zweite Passage) in FACS-Analysen überprüft (Abb. 3.2.9). Dabei fiel auf, dass besonders in Kulturen von MDA-MB468/225.TM, MDA-MB468/225.TM.30 und A431/225.TM. Zellen der Anteil EGFP-positiver Zellen kontinuierlich abnahm. Acht Wochen nach Zellseparation (P15/16) waren nur noch etwa 40-50% EGFP-positive Zellen in MDA-MB468/225.TM.30 bzw. MDA-MB468/225.TM und 60% EGFP-positive Zellen in A431/225.TM Kulturen nachweisbar. Der Anteil EGFP-exprimierender Zellen in A431/225.TM.30 und 225.TM- oder 225.TM.30-exprimierenden MDA-MB453 Kulturen fiel dagegen im untersuchten Zeitraum nicht unter 80% (Abb. 3.2.9 und Daten nicht gezeigt).

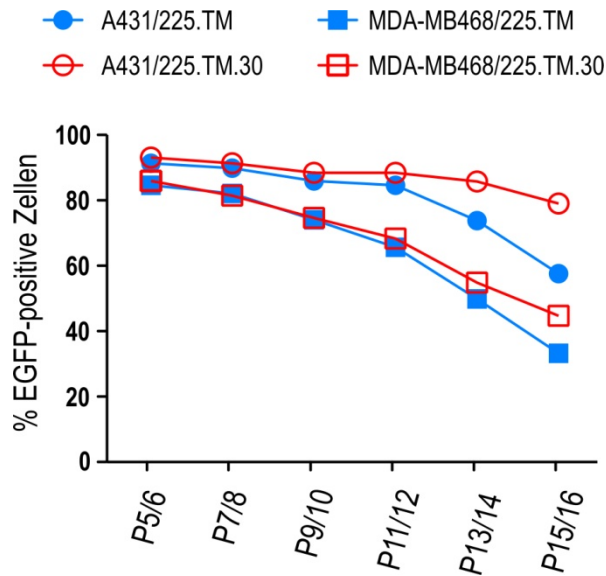


Abbildung 3.2.9 Analyse des Anteils EGFP-positiver Zellen in kontinuierlicher Kultur. Der Anteil EGFP-positiver 225.TM.30- (rot) bzw. 225.TM (blau)-exprimierender A431 (Kreise) sowie MDA-MB468 (Quadrate) Zellen wurde in jeder zweiten Passage mittels FACS-Analyse bestimmt und über die Zeit aufgetragen.

Die Proliferationsexperimente zeigen, dass die Expression der 225.TM oder 225.TM.30 Proteine in EGFR-überexprimierenden Zellen zu einem klaren Wachstumsnachteil gegenüber Wildtypzellen führt. Da die untersuchten Kulturen nach der Zellseparation nur etwa zu 90% aus transduzierten Zellen bestanden, können die verbliebenen Wildtypzellen aufgrund des Wachstumsvorteils in der kontinuierlichen Kultur auswachsen. Damit lässt sich die beobachtete Abnahme des Anteils EGFP-positiver Zellen in diesen Kulturen erklären.

3.2.4 Zusammenfassung der Abschnitte 3.2.1-3.2.3

In diesem Teil der Arbeit wurde die Generierung mono- (225.TM) und bispezifischer (225.TM.30) transmembraner Antikörperfragmente mit Spezifität für EGFR beschrieben (Abschnitt 3.2.1). Die Expression der 225.TM und 225.TM.30 Proteine konnte in Gesamtzelllysaten von A431, MDA-MB468 sowie MDA-MB453 Zellen in vergleichbaren Mengen nachgewiesen werden. In FACS-Analysen wurde das 225.TM Protein in höheren Mengen an der Zelloberfläche detektiert als das 225.TM.30 Protein. Weiterhin wurden auf A431 Zellen mehr mono- und bispezifische Moleküle detektiert als auf MDA-MB468 Zellen (Abb. 3.2.4).

Die konstitutive Expression der 225.TM und 225.TM.30 Proteine in A431 und MDA-MB468 Zellen führte zu einer signifikanten Reduktion der EGFR-Oberflächenexpression verglichen mit Wildtypzellen (Abb. 3.2.5B). Immunoblot-Analysen lieferten für die Gesamt-EGFR Menge nach Expression der 225.TM und 225.TM.30 Moleküle widersprüchliche Ergebnisse (Abb. 3.2.5A und 3.2.7). Allerdings wurde in Lysaten von MDA-MB468/225.TM.30 wiederholt ein

verringertes apparentes EGFR-Molekulargewicht beobachtet, was für eine reduzierte Glykosylierung des Rezeptors spricht. Die EGF-induzierte Aktivierung des EGFR, gemessen anhand der Phosphorylierung einzelner Tyrosine im C-terminalen Schwanz des Rezeptors, ließ sich in MDA-MB468 Zellen durch 225.TM oder 225.TM.30 Expression fast vollständig unterbinden. Dies wurde auch für A431/225.TM Zellen beobachtet. Die EGFR-Phosphorylierung in A431/225.TM.30 Zellen wurde dagegen nur partiell inhibiert. Ein Einfluss der transmembranen Antikörperfragmente auf die ErbB2-Expression in MDA-MB453 Zellen wurde nicht beobachtet, was den EGFR-spezifischen Effekt der 225.TM.30 und 225.TM Moleküle bestätigt (Abschnitt 3.2.2).

Weiterhin wurde in diesem Teil der Arbeit gezeigt, dass die konstitutive Expression der 225.TM und 225.TM.30 Proteine in EGFR-positiven, aber nicht EGFR-negativen Zellen zu einer signifikanten Proliferationsinhibition führt (Abschnitt 3.2.3).

3.3 Etablierung eines Tetracyclin-induzierbaren γ -retroviralen Expressionssystems

Da der Anteil EGFP-positiver Zellen in konstitutiv 225.TM- und 225.TM.30-exprimierenden MDA-MB468 und teilweise auch in A431 Zellen in kontinuierlicher Kultur stark abnahm (Abb. 3.2.9) wurde die weitere Analyse der Effekte der transmembranen Antikörperfragmente in einem Tetracyclin-induzierbaren System fortgeführt (siehe Abschnitt 3.4).

Hierzu wurden zunächst induzierbare A431, MDA-MB468 und MDA-MB453 Zellen generiert und die Induktionsbedingungen zur optimalen Proteinexpression etabliert. Dies ist nachfolgend beschrieben.

3.3.1 Funktionsprinzip

Das Tetracyclin-regulierbare Expressionssystem beruht auf dem Prinzip des *E. coli* Tetracyclin Resistenz Operons, bestehend aus dem Tet-Repressor Protein und der Tet-Operator DNA-Sequenz (Gossen und Bujard, 1992). In dem in dieser Arbeit verwendeten „tet-on“ System (siehe Abb. 3.3.1) wird die kodierende Sequenz, deren Expression kontrolliert werden soll, 3' von einer optimierten („T6“) Promotorregion („tet-on“) inseriert. Diese setzt sich aus einer heptameren Tet-Operator Sequenz und einem minimalen Cytomegalo Virus (CMV) Promotor zusammen (Loew *et al.*, 2010). Zur Kontrolle der Expression wird zudem ein weiteres Konstrukt benötigt, das für einen optimierten reversen Tetracyclin-kontrollierten Transaktivator (rtTA; M2) kodiert. Dieser ist eine mutierte Variante des Tetracyclin-kontrollierten Transaktivators (tTA), der durch die Fusion des Tet-Repressors mit der aktivierenden Domäne des Herpes Simplex Virus (HSV) Virionproteins 16 (VP16) erzeugt wurde (Urlinger *et al.*, 2000). Dieses M2 Protein kann erst nach Bindung von

Tetracyclin oder einem Analogon wie Doxycyclin (Dox) an die T6-Promotorregion binden und damit die Transkription des zu kontrollierenden Gens induzieren.

3.3.2 Generierung induzierbarer Zelllinien

Um die einzelnen Elemente in die zu untersuchenden Zellen zu transferieren (Abb. 3.3.1), sind diese auf γ -retroviralen Transferplasmiden (pES) kodiert. Die Plasmide pES.1-2(M2N)p, kodierend für den rtTA (M2) und ein Neomycin Resistenzgen zur Selektion, und pES.T6-x-PGK-Puro(rev), zur Insertion eines *gene of interest* (GOI) unter der Kontrolle des T6 Promotors, wurden von A. Kinner/M. Grez (Georg-Speyer-Haus, Frankfurt am Main) zur Verfügung gestellt. In einem ersten Schritt wurde im pES.T6-Plasmid die PGK-Puromycin-Kassette über *NotI*-Schnittstellen durch eine SFFV-EGFP-Expressionskassette, die aus dem SEW-Plasmid mittels PCR amplifiziert wurde (Oligonukleotid-Primer siehe Abschnitt 2.1.6), ersetzt (pES.T6-x-SE), um transduzierte, EGFP-positive Zellen von nicht transduzierten Zellen separieren zu können. Im nächsten Schritt wurden in dieses Konstrukt die cDNA Sequenzen der zu untersuchenden Proteine über die Schnittstellen *EcoRI* und *XhoI* bzw. *Sall* (Abb. 3.4.1) inseriert. Zur Generierung induzierbarer Zelllinien wurden zunächst durch Co-Transfektion von 293T Zellen mit den Plasmiden pES.1-2(M2N)p bzw. pES.T6-iGOI-SE, M620 (kodiert für das *Gibbon Ape Leukimia Virus* (GALV) Hüllprotein) und M634 (kodiert für γ -retrovirale *gag* und *pol* Gene) γ -retrovirale Vektorpartikel produziert. Anschließend wurden A431, MDA-MB468, MDA-MB453 sowie MDA-MB231, Hela und Cos-7 Zellen mit den M2-kodierenden Vektorpartikeln transduziert und mittels G418 selektioniert.

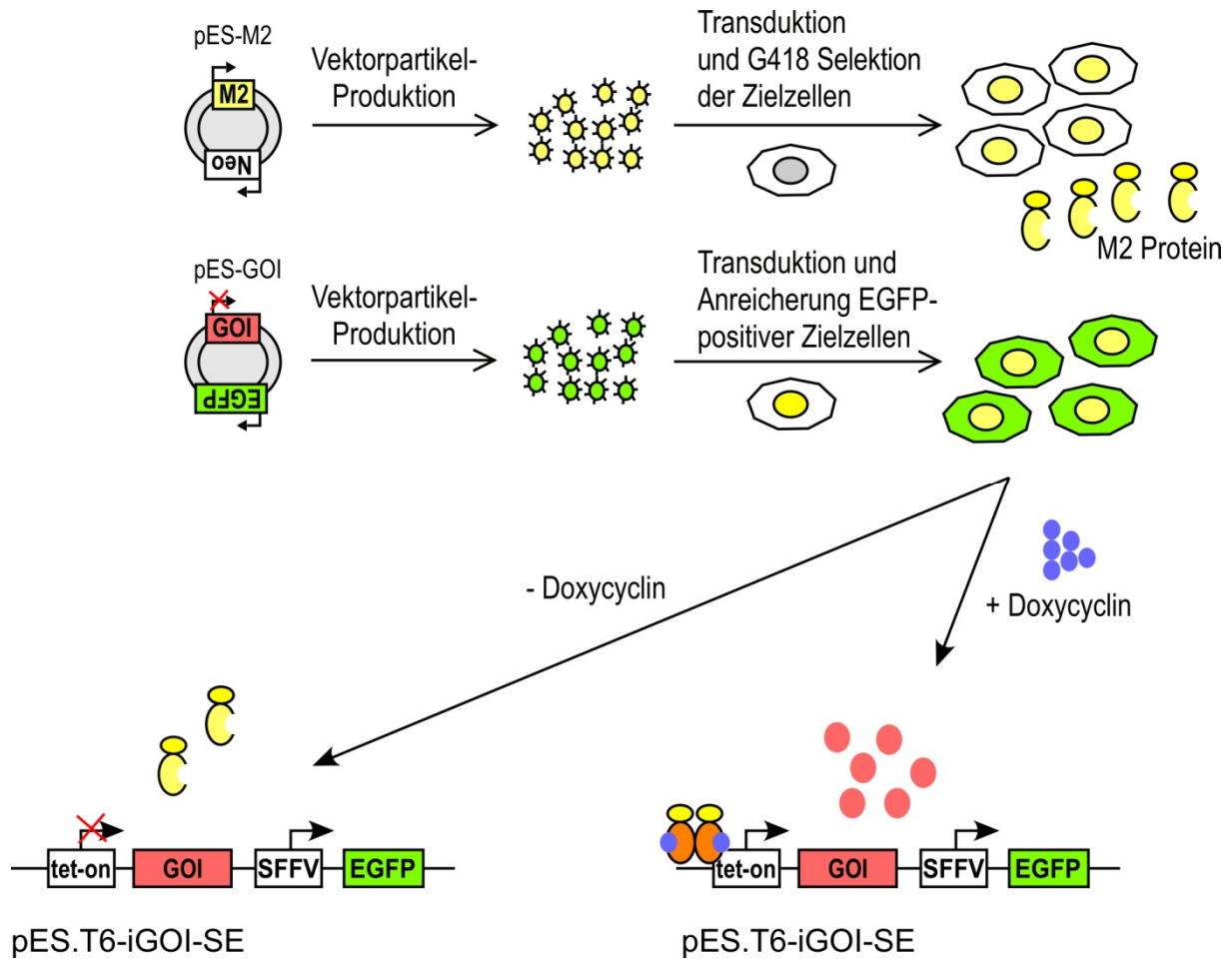


Abbildung 3.3.1 Schematische Darstellung des Tetracyclin (Dox)-induzierbaren Systems. M2: reverser Tetracyclin-kontrollierter Transaktivator (rtTA); tet-on: Tetracyclin-induzierbarer T6 Promotor; GOI: *gene of interest*; Neo: Neomycin (G418) Resistenzgen. Nähere Beschreibung im Text.

Im nächsten Schritt wurde genomische DNA G418 selektionierter Zellen isoliert und zum Nachweis des eingebauten M2-Gens eine PCR mit M2-spezifischen Oligonukleotid-Primern durchgeführt (Abb. 3.3.2).

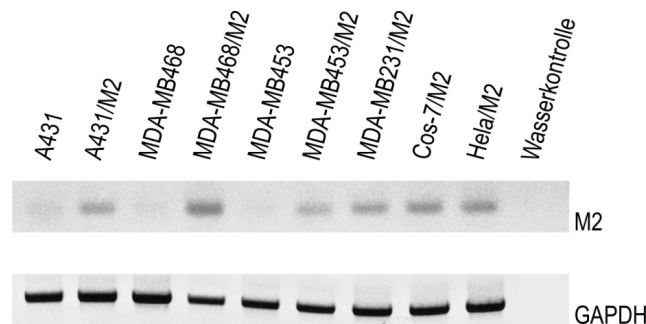


Abbildung 3.3.2 Nachweis der Insertion des M2-Gens in die genomische DNA ES.1-2(M2N)p transduzierter Zellen. Nach Transduktion der Zellen mit M2-kodierenden γ -retroviralen Vektorpartikeln und dreiwöchiger G418 Selektion wurde die genomische DNA aus transduzierten oder Wildtypzellen isoliert und in einer PCR auf das Vorhandensein des M2-Gens untersucht. Das *Glycerin-aldehyd-3-Phosphat Dehydrogenase (GAPDH)* Gen diente als Positivkontrolle.

Die Analyse der genomischen DNA erbrachte spezifische Signale für das *M2*-Gen in allen untersuchten transduzierten Zellen (A431/M2, MDA-MB468/M2, MDA-MB453/M2, MDA-MB231/M2, Cos-7/M2 und Hela/M2). In Kontrollproben von Wildtypzellen und in der Wasserkontrolle konnte kein Signal detektiert werden. Damit konnte der Einbau des *M2*-Gens in allen transduzierten und selektionierten Zellen bestätigt werden.

Da kein Antikörper zur Detektion des M2 Proteins zur Verfügung stand, wurde die M2-Expression in einem funktionalen Assay untersucht (Abb. 3.3.3). Virale Vektorpartikel des Kontrollkonstrukts pES.T6-(*Img**)p (Loew *et al.*, 2010), das für ein Luziferase-EGFP (*Img**) Fusionsprotein unter der Kontrolle des T6-Promotors (tet-on) kodiert (Abb. 3.3.3A), wurden produziert und A431/M2, MDA-MB468/M2 und MDA-MB453/M2 Zellen wurden mit den viralen Vektorpartikeln transduziert. Da dieses Konstrukt keinen Selektionsmarker (Antibiotikaresistenz oder konstitutiv exprimiertes Fluoreszenzprotein) enthält, konnten transduzierte Zellen nicht selektioniert werden. Stattdessen wurden die kompletten Zellpools für 72 h in Anwesenheit von 0 oder 500 ng/ml Dox kultiviert und anschließend wurde der Anteil EGFP-positiver Zellen mittels Durchflusszytometrie bestimmt (Abb. 3.3.3B).

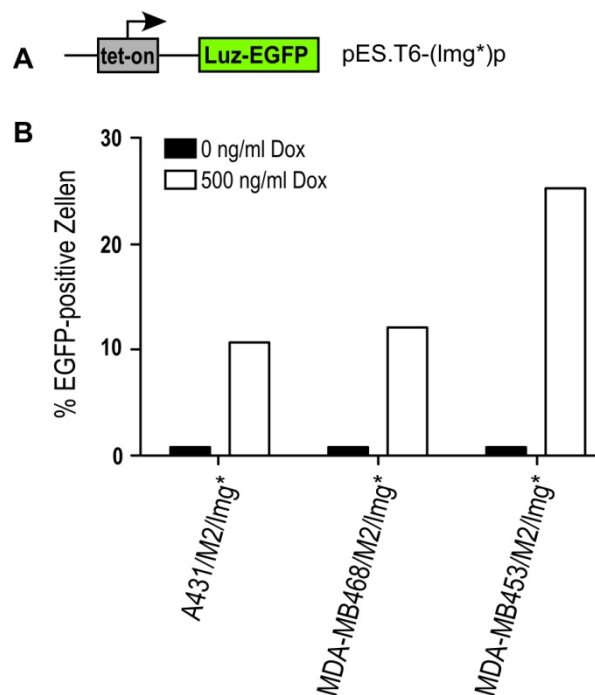


Abbildung 3.3.3 Nachweis der Funktionalität des M2 Proteins in retroviral transduzierten Zellen. (A) Schematische Darstellung des pES.T6-(*Img**)p Konstrukts, das für ein Luziferase-EGFP (*Img**) Fusionsprotein unter der Kontrolle des Tetracyclin-induzierbaren Promotors kodiert. (B) A431/M2, MDA-MB468/M2 und MDA-MB453/M2 Zellen wurden mit *Img**-kodierenden γ -retroviralen Vektorpartikeln transduziert und anschließend wurde die Luziferase-EGFP Expression für 72 h mit 500 (weiß) ng/ml Dox induziert. Kontrollzellen wurden in Abwesenheit von Dox kultiviert (schwarz). Der Nachweis EGFP-positiver Zellen erfolgte mittels FACS-Analyse.

In A431/M2/lmg* (10% EGFP⁺), MDA-MB468/M2/lmg* (11% EGFP⁺) und MDA-MB453/M2/lmg* (28% EGFP⁺) Zellen konnte die Expression des Luziferase-EGFP Fusionsproteins nach Induktion mit Dox detektiert werden. Diese weist indirekt die Expression und Funktionalität des M2 Proteins nach. Der Anteil EGFP-positiver Zellen in nicht induzierten Zellen lag jeweils unter 1%. Dies zeigt, dass das Expressionssystem in Abwesenheit von Dox weitestgehend dicht ist.

3.3.3 Bestimmung der Dox-Konzentration für maximale Induktion

Im nächsten Schritt wurde am Beispiel der MDA-MB468/M2/lmg* Zellen die Dox-Konzentration zur maximalen Induktion der Expression der zu untersuchenden Proteine bestimmt. Die entsprechenden Analysen der A431/M2/lmg* und MDA-MB453/M2/lmg* Zellen lieferten vergleichbare Ergebnisse (Daten nicht gezeigt). MDA-MB468/M2/lmg* Zellen, die zuvor nach induzierter EGFP Expression durchflusszytometrisch angereichert wurden (Reinheit etwa 70%), wurden für 72 h in Anwesenheit verschiedener (0-5000 ng/ml) Dox-Konzentrationen kultiviert und anschließend wurde der Anteil sowie die mittlere Fluoreszenzintensität (MFI) der EGFP-positiven Zellen ermittelt (Abb. 3.3.4).

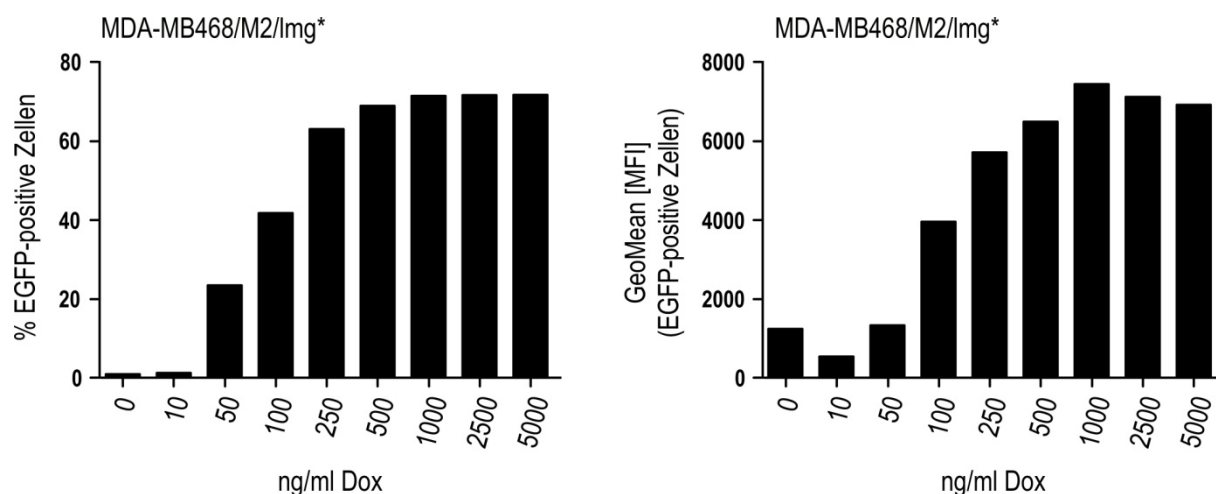


Abbildung 3.3.4 Expression von Luz-EGFP in MDA-MB468/M2/lmg* Zellen in Abhängigkeit von der Dox-Konzentration. Die Zellen wurden für 72 h mit den angegebenen Dox-Konzentrationen inkubiert. Der Anteil EGFP-positiver Zellen (links), sowie die mittlere Fluoreszenzintensität (GeoMean, MFI; rechts) wurden mittels FACS-Analyse bestimmt (n=1).

Der Anteil EGFP-positiver Zellen erhöhte sich von 10 ng/ml (2%) bis zu 1000 ng/ml (70%) Dox stetig. Für höhere Dox-Konzentrationen wurde keine weitere Steigerung des Anteils EGFP-positiver Zellen detektiert (Abb. 3.3.4, links). Nicht nur der Anteil EGFP-positiver Zellen stieg bis 1000 ng/ml Dox an, sondern auch die Intensität des EGFP-Signals, gemessen anhand der MFI (Abb. 3.3.4, rechts). Eine Toxizität hoher (1000-5000 ng/ml) Dox-Konzentrationen, wie von Ermak und Kollegen für manche Zellen beschrieben, wurde

während der 72 h Inkubation für die hier untersuchten Zellen nicht beobachtet (Ermak *et al.*, 2003). Dennoch wurde der Großteil der folgenden Experimente sicherheitshalber bei einer vergleichsweise niedrigen Dox-Konzentration von 250 ng/ml durchgeführt. Bei dieser Konzentration wurden etwa 75% der maximal möglichen EGFP Expression erreicht (Abb. 3.3.4).

3.3.4 Analyse der An- und Abschaltkinetik des Systems

Neben der idealen Dox-Konzentration wurde auch die ideale Induktionsdauer zur effektiven Nutzung des „tet-on“ Systems bestimmt. Zunächst wurden MDA-MB468/M2/lmg* Zellen unterschiedlich lange (3-72 h) mit 250 ng/ml Dox kultiviert und anschließend wurde erneut der Anteil EGFP-positiver Zellen und deren MFI bestimmt (Abb. 3.3.5A).

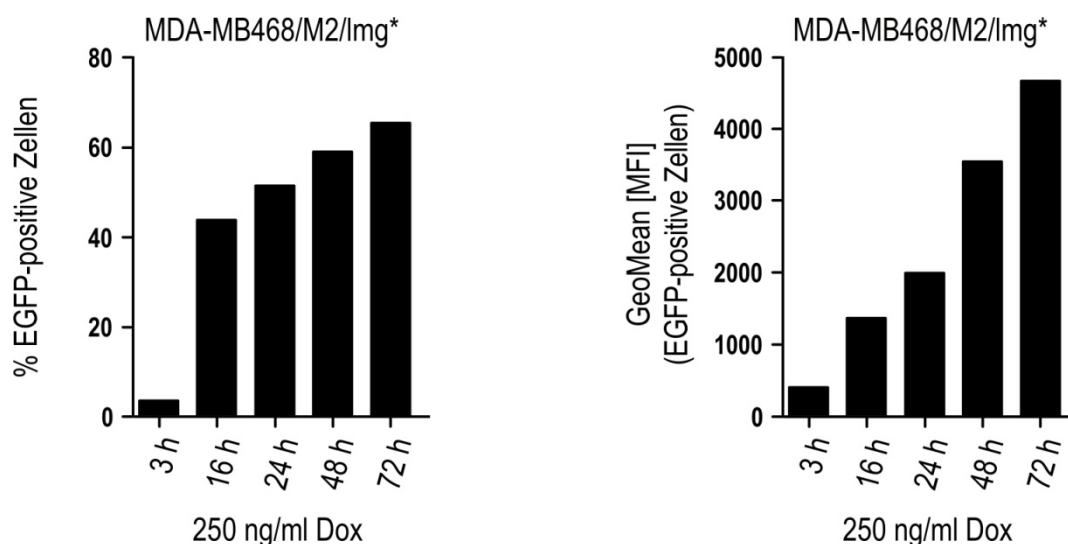


Abbildung 3.3.5 Untersuchung der Anschaltkinetik der Dox-induzierten Proteinexpression. MDA-MB468/M2/lmg* Zellen wurden unterschiedlich lange mit 250 ng/ml Dox inkubiert. Der Anteil EGFP-positiver Zellen (links) sowie die mittlere Fluoreszenzintensität (GeoMean, MFI; rechts) wurden mittels FACS-Analyse bestimmt (n = 1).

Bereits nach 3 h konnte ein geringer Anteil (5%) EGFP-positiver Zellen detektiert werden. Dieser nahm, genauso wie der MFI, stetig innerhalb der 72 h Induktionszeit zu (Abb. 3.3.5). Da der Anteil Luziferase-EGFP-exprimierender Zellen nach 72 h am höchsten war, wurde dieser Zeitraum als ideale Induktionsdauer festgelegt.

Im nächsten Schritt wurde die Abschaltkinetik des induzierbaren Systems untersucht. Dazu wurden MDA-MB468/M2/lmg* Zellen für 72 h mit 250 ng/ml Dox kultiviert, die Zellen wurden gewaschen, das Induktor-haltige Medium wurde durch normales Medium ersetzt, und der Anteil EGFP-positiver Zellen, sowie deren MFI wurde zu unterschiedlichen Zeitpunkten (0-24 h) ohne Induktor bestimmt (Abb. 3.3.6).

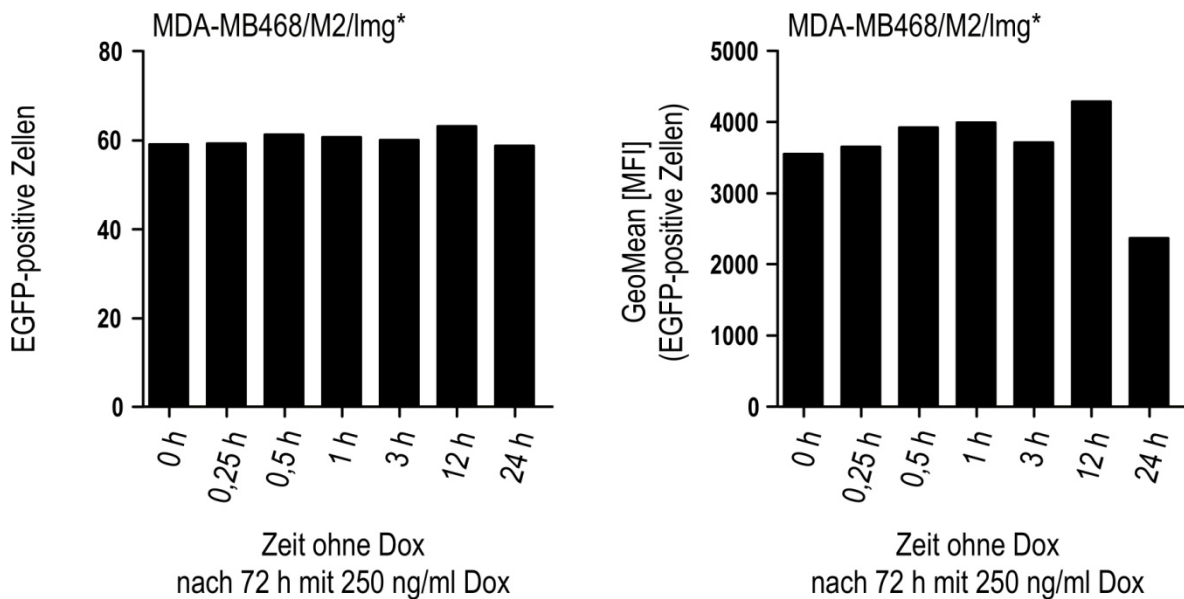


Abbildung 3.3.6 Untersuchung der Abschaltkinetik der Dox-induzierten Proteinexpression. MDA-MB468/M2/Img* Zellen wurden für 72 h mit 250 ng/ml Dox inkubiert, anschließend wurden die Zellen mit PBS gewaschen und für die angegebenen Zeiträume ohne Dox kultiviert. Der Anteil EGFP-positiver Zellen (links) sowie die mittlere Fluoreszenzintensität (GeoMean, MFI; rechts) wurden mittels FACS-Analyse bestimmt (n = 1).

Der Anteil EGFP-positiver Zellen änderte sich innerhalb der 24 h ohne Dox nicht (Abb. 3.3.6, links). Allerdings war der MFI der EGFP-positiven Zellen nach 24 h um etwa 40% reduziert (Abb. 3.3.6, rechts). Dies könnte darauf zurückzuführen sein, dass das System zu diesem Zeitpunkt noch nicht geschlossen war. Eine weitere Erklärung könnte sein, dass das während der Induktionszeit exprimierte Luziferase-EGFP Fusionsprotein bis zu diesem Zeitpunkt noch nicht abgebaut wurde. Daher sollte den zu analysierenden Zellen der Induktor für Experimente, die das Abschalten der Proteinexpression erfordern, mehr als 48 h vor der Analyse entzogen werden.

3.3.5 Zusammenfassung der Abschnitte 3.3.1-3.3.4

In diesem Teil der Arbeit wurde ein γ -retrovirales Tetracyclin-induzierbares („tet-on“) System in u.a. A431, MDA-MB468 und MDA-MB453 Zellen etabliert (Abschnitt 3.3.2). Weiterhin wurde die Behandlung der Zellen mit 250 ng/ml Dox für 72 h als sehr gut zur effektiven Induktion des Systems geeignet bestimmt (Abschnitt 3.3.3 und 3.3.4). Weiterhin wurde auch 24 h nach Dox Entzug noch Luziferase-EGFP Protein nachgewiesen (siehe Abb. 3.3.6). Damit sollten Experimente, die eine Abschaltung des Systems benötigen, erst frühestens 48 h nach Dox-Entzug durchgeführt werden.

3.4 Einfluss der induzierbaren Expression transmembraner Antikörperfragmente auf EGFR-exprimierende Zellen

Um die Effekte transmembraner Antikörperfragmente nach induzierbarer Expression genauer zu untersuchen, wurden die cDNAs für das 225.TM und das 225.TM.30 Konstrukt 3' des Tetracyclin-induzierbaren Promotors in das pES.T6-SE Plasmid (vgl. Abb. 3.3.1) inseriert. Daraus resultierten die Konstrukte pES.T6-i225.TM.30-SE bzw. pES.T6-i225.TM-SE. Neben den in Abschnitt 3.2 beschriebenen Molekülen 225.TM.30 und 225.TM wurde in diesem Teil der Arbeit auch ein monospezifisches membranständiges scFv-Antikörperfragment TM.30 mit analysiert, das an die EGFR-ICD bindet. Die Generierung dieses Konstrukts ist im folgenden Abschnitt beschrieben.

3.4.1 Generierung des monospezifischen transmembranen Antikörperfragments TM.30

Die Klonierung des TM.30 Konstrukts, das aus der CD8 α Gelenkregion und CD28 Transmembrandomäne gefolgt von der scFv(30) Sequenz besteht, erfolgte in zwei Schritten (Abb. 3.4.1A): Zunächst wurde die Sequenz Δ SP.TM.30, bestehend aus einem Myc-tag und der TM.30 Sequenz ohne Signalpeptid mit 5' *EcoRI/XhoI* Doppelschnittstelle und 3' *Sall* Schnittstelle mittels PCR (Oligonukleotide siehe Abschnitt 2.1.6) aus dem pMA-225.TM.30 Konstrukt amplifiziert. Das Δ SP.TM.30 Fragment wurde anschließend über die *EcoRI* und *Sall* Schnittstellen in *EcoRI* und *XhoI* geschnittenes pES.T6-x-SE Ausgangsplasmid eingefügt. Daraus resultierte das Plasmid pES.T6-i Δ SP.TM.30-SE. Das Signalpeptid wurde abschließend aus zwei komplementären Oligonukleotiden (*EcoRI*-Kozak-SP-*XhoI* (fwd) und *EcoRI*-Kozak-SP-*XhoI* (rev), Abschnitt 2.1.6) hybridisiert und, um pES.T6-iTM.30-SE zu erhalten, über die *EcoRI* und *XhoI* Schnittstellen 5' des Myc-tags in das pES.T6-i Δ SP.TM.30-SE Konstrukt eingefügt. Eine schematische Darstellung des TM.30 Moleküls und der EGFR Bindungsstelle ist in Abbildung 3.4.1B gezeigt.

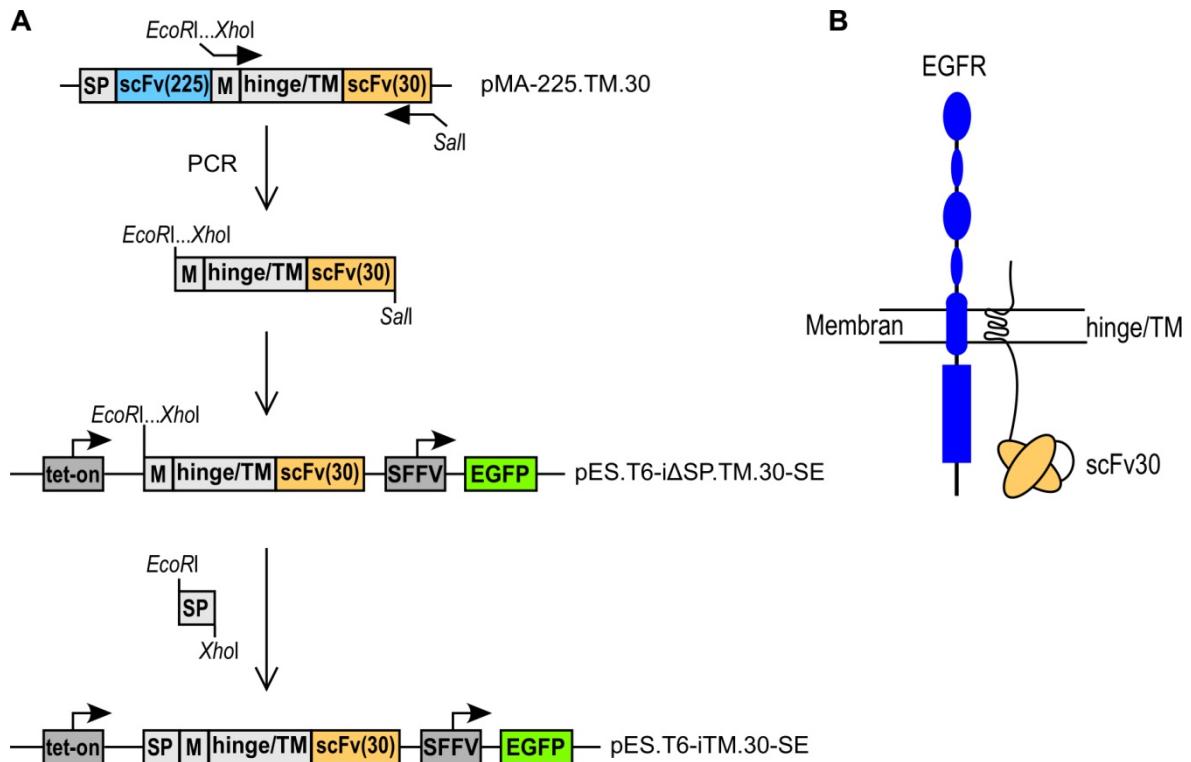


Abbildung 3.4.1 Ableitung der TM.30 Sequenz aus dem Konstrukt pMA-225.TM.30.

(A) Klonierungsstrategie zur Herstellung des pES.T6-iTM.30-SE Plasmids, das für das membranständige EGFR-ICD-spezifische scFv(30) Molekül kodiert. SP: Signalpeptid der IgG schweren Kette; M: Myc-tag; hinge/TM: CD8 α Gelenkregion (AS 117-178) und CD28 Transmembranregion (AS 151-185); scFv(30): EGFR-ICD-spezifisches scFv-Antikörperfragment. Nähere Erläuterungen siehe Text. **(B)** Schematische Darstellung des Aufbaus und der Bindungsstelle des monospezifischen transmembranen Antikörperfragments TM.30.

3.4.2 Induzierte Expression der Proteine 225.TM, 225.TM.30 und TM.30

Mit den pES.T6-Plasmiden der 225.TM, 225.TM.30 und TM.30 Konstrukte wurden γ -retrovirale Vektorpartikel generiert (vgl. Abschnitte 3.3.2 und 2.2.14) und A431/M2, MDA-MB468/M2 und MDA-MB453/M2 Zellen damit transduziert (vgl. Abschnitt 2.2.16). Transduzierte, EGFP-positive Zellen wurden mittels Durchflusszytometrie-basierter Zellseparation angereichert und analysiert. Zum Nachweis der 225.TM.30, 225.TM und TM.30 Oberflächenexpression wurden die Zellen zunächst für 72 h mit 0 oder 250 ng/ml Dox kultiviert und anschließend in FACS-Analysen mit Myc-tag-spezifischem Antikörper untersucht (Abb. 3.4.2). Daneben erfolgte ein Nachweis der Proteine in Gesamtzelllysaten in Immunoblot-Experimenten mit Myc-tag-spezifischem Antikörper.

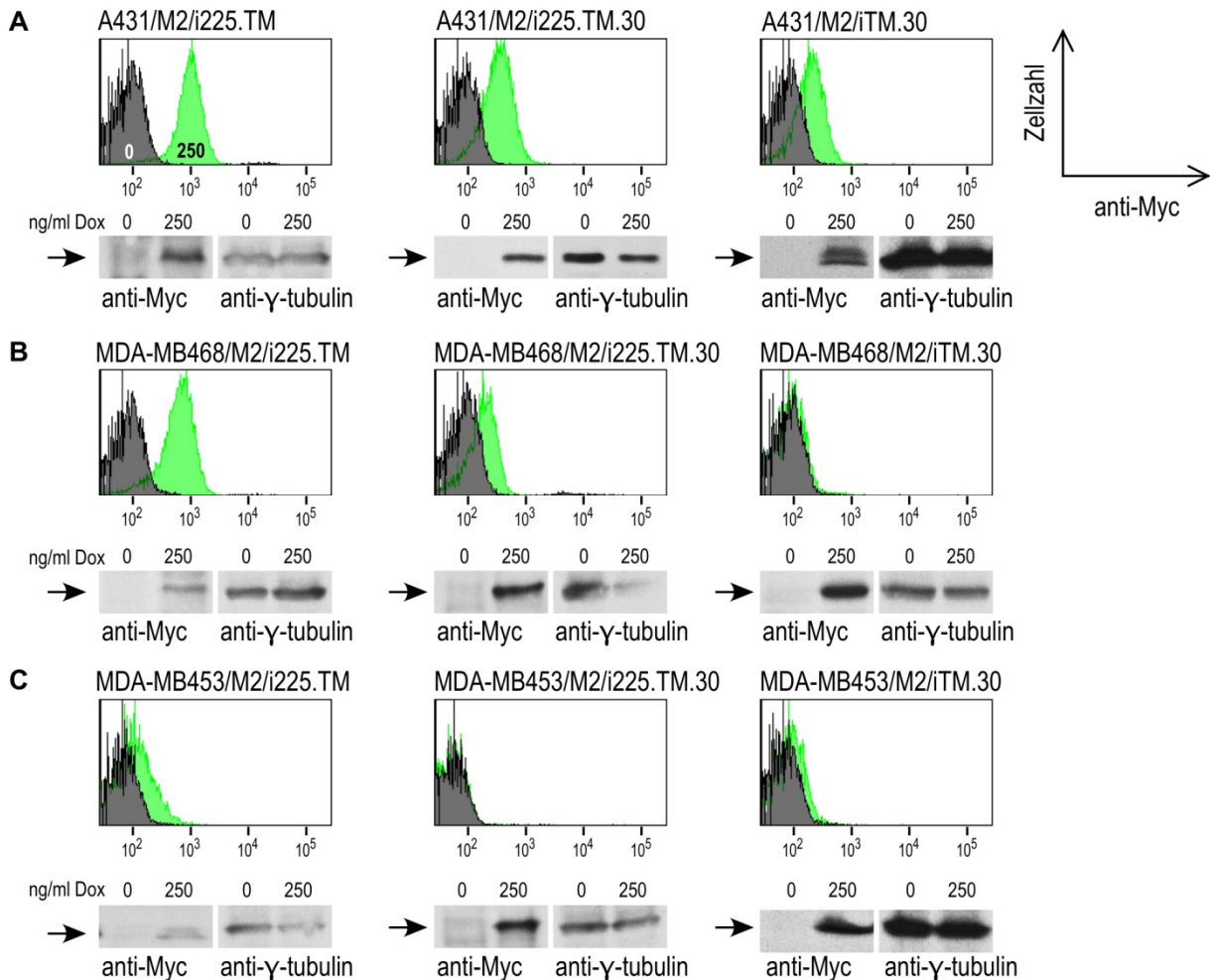


Abbildung 3.4.2 Nachweis der Dox-induzierten Expression mono- und bispezifischer transmembraner Antikörpermoleküle. A431/M2 (**A**), MDA-MB468/M2 (**B**) und MDA-MB453/M2 Zellen (**C**) wurden mit 225.TM- (links), 225.TM.30- (Mitte) bzw. TM.30 (rechts)-kodierenden γ -retroviralen Vektorpartikeln transduziert und EGFP-positive Zellen mittels Durchflusszytometrie-basierter Zellseparation angereichert. Die Zellen wurden für 72 h mit 0 (grau) bzw. 250 ng/ml (grün) Dox inkubiert und die induzierte Oberflächenexpression der Antikörperfragmente in FACS-Analysen wurde mit einem AF647-gekoppelten Myc-tag-spezifischen Antikörper untersucht. Die induzierte Gesamtexpression der transmembranen Antikörpermoleküle wurde jeweils in Immunoblot-Analysen von Gesamtzellextrakten mit einem Myc-tag-spezifischen Antikörper nachgewiesen. γ -Tubulin diente als Ladekontrolle.

Die in den Immunoblot-Analysen ermittelte induzierte Gesamtexpression der 225.TM (Abb. 3.4.2, links), 225.TM.30 (Mitte) und TM.30 (rechts) Antikörperfragmente war für alle Proteine in den untersuchten Zellen vergleichbar. Die in FACS-Experimenten nachgewiesene Oberflächenexpression unterschied sich allerdings je nach Molekül und Wirtszelle. Während 225.TM auf EGFR-exprimierenden A431/M2 und MDA-MB468/M2 Zellen gut nachweisbar war, war die MFI für EGFR-negative MDA-MB453/M2 Zellen deutlich geringer (Abb. 3.4.2, links). Ähnliches wurde für das 225.TM.30 Protein beobachtet. Hier wurde zudem mehr Protein auf A431/M2 als auf MDA-MB468/M2 Zellen detektiert. Auf MDA-MB453/M2 Zellen konnte das 225.TM.30 Molekül dagegen nicht nachgewiesen werden (Abb. 3.4.2C, Mitte).

Insgesamt wurde das 225.TM.30 Protein jedoch schwächer auf der Oberfläche der einzelnen Zelllinien exprimiert als das 225.TM Protein. Das TM.30 Molekül konnte ausschließlich auf A431/M2 Zellen nachgewiesen werden (Abb. 3.4.2, rechts). Aus diesen Ergebnissen lässt sich schließen, dass die transmembranen Antikörperfragmente zwar exprimiert, aber nicht immer stabil auf der Zelloberfläche präsentiert wurden. Die Oberflächenexpression der Antikörperfragmente korreliert zudem weitestgehend mit der Menge an EGFR Molekülen auf den Zellen. Auf A431/M2 Zellen ($\sim 3 \times 10^6$ EGFR Moleküle/Zelle) (Kawamoto *et al.*, 1983) waren alle Antikörperfragmente detektierbar, während auf MDA-MB468/M2 Zellen ($\sim 1.9 \times 10^6$ EGFR Moleküle/Zelle) (Filmus *et al.*, 1985) nur 225.TM und 225.TM.30 Moleküle nachgewiesen wurden. Auf EGFR-negativen MDA-MB453/M2 Zellen konnten ausschließlich geringe Mengen von 225.TM detektiert werden.

Um auszuschließen, dass die Unterschiede in den detektierten Oberflächenniveaus der transmembranen Antikörperfragmente auf eine unterschiedliche Zugänglichkeit des Myc-tags zurückzuführen sind, wurden 225.TM- und 225.TM.30-exprimierende MDA-MB453/M2 Zellen nachfolgend in FACS-Analysen mit einem EGFR-Fc Fusionsprotein untersucht (Abb. 3.4.3). Das EGFR-Fc Konjugat besteht aus der EGFR-ECD gekoppelt an einen humanen Fc-Teil und wird von scFv(225) gebunden. Die Detektion des gebundenen Fusionsproteins erfolgte mit einem APC-gekoppelten human-Fc-spezifischen Antikörper. Auch mit Hilfe dieser Färbung, wie mit dem Myc-tag-spezifischen Antikörper, konnte nur das 225.TM, aber nicht das 225.TM.30 Protein auf der Oberfläche von EGFR-negativen MDA-MB453/M2 Zellen nachgewiesen werden.

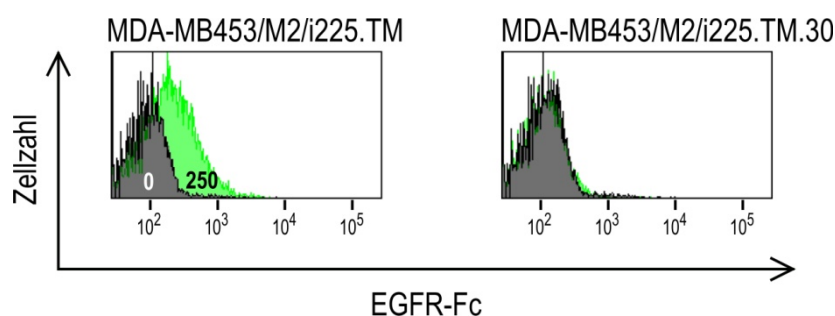


Abbildung 3.4.3 Nachweis der Dox-induzierten Oberflächenexpression von 225.TM (links) und 225.TM.30 (rechts) Antikörpermolekülen auf MDA-MB453/M2 Zellen. Die Zellen wurden für 72 h mit 0 (grau) bzw. 250 (grün) ng/ml Dox inkubiert. Der Nachweis der 225.TM- bzw. 225.TM.30-Expression erfolgte in einer FACS-Analyse durch Zugabe eines EGFR-Fc Fusionsproteins, das von scFv(225) gebunden wird, und anschließender Inkubation mit einem APC-gekoppelten Zweitantikörper.

3.4.3 Bindung von 225.TM, 225.TM.30 und TM.30 an EGFR

Nachdem die induzierbare Expression der transmembranen Antikörperfragmente 225.TM, 225.TM.30 und TM.30 bestätigt werden konnte (Abschnitt 3.4.2), wurde nachfolgend die

Bindung der Moleküle an EGFR in Co-Immunpräzipitationsstudien (Co-IP) untersucht. Dazu wurden i225.TM.30-, i225.TM- und iTM.30-transduzierte A431/M2 oder MDA-MB468/M2 Zellen für 72 h mit 0 oder 250 ng/ml Dox kultiviert und anschließend IP-Lysate hergestellt (vgl. Abschnitt 2.2.20). EGFR und daran gebundene Proteine wurden mit einem an magnetische *beads* gekoppelten EGFR-spezifischen Antikörper präzipitiert, gebundenes Protein wurde eluiert und das Eluat in Immunoblot-Analysen mit CD8 α - und EGFR-spezifischen Antikörpern untersucht (Abb. 3.4.4).

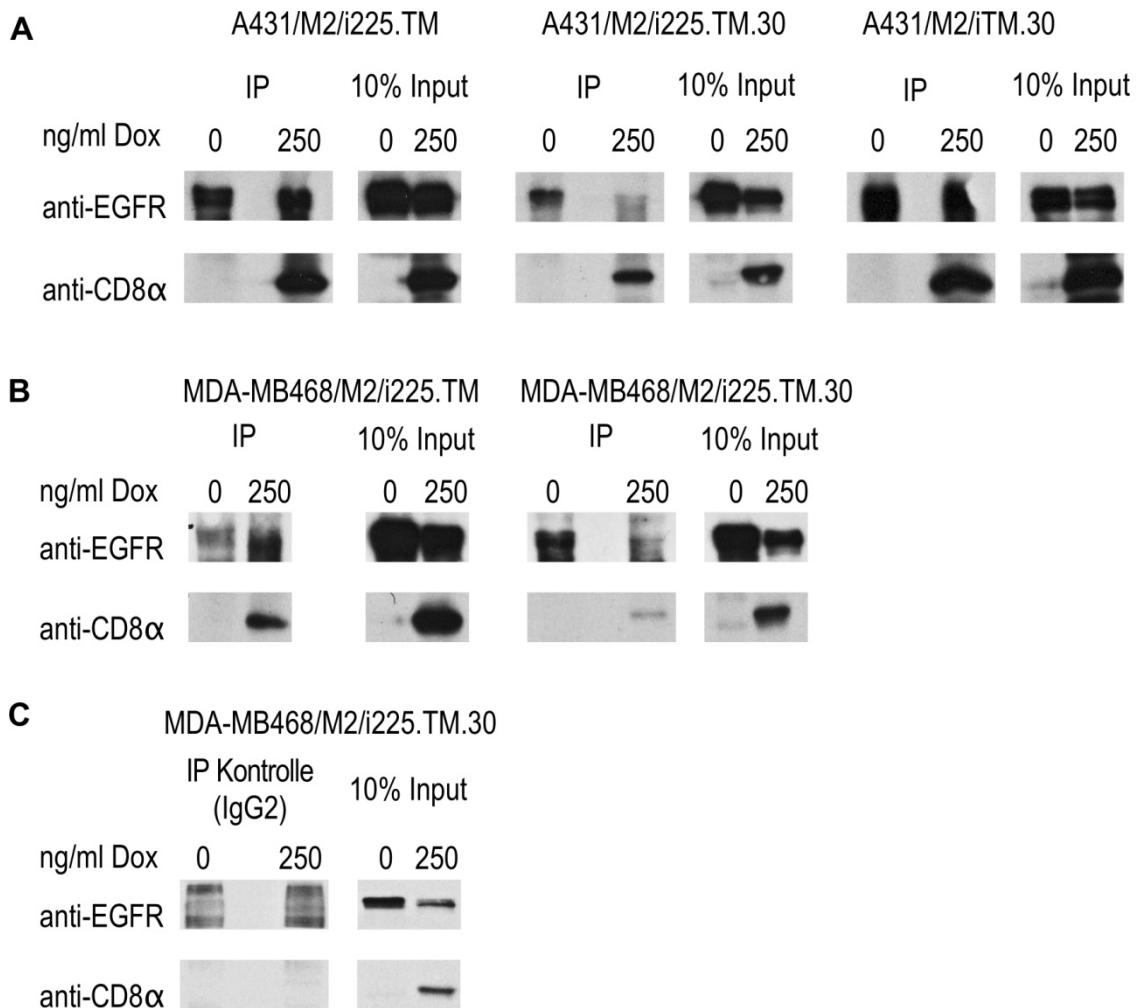


Abbildung 3.4.4 Bindung mono- und bispezifischer transmembraner Antikörperfragmente an EGFR. Mit induzierbaren Antikörperkonstrukten transduzierte A431/M2 (**A**) bzw. MDA-MB468/M2 (**B**) Zellen wurden für 72 h mit 0 bzw. 250 ng/ml Dox kultiviert. Anschließend wurden Gesamtzell-extrakte hergestellt. Die Interaktion von 225.TM, 225.TM.30 und TM.30 mit EGFR wurde in Co-Immunpräzipitationen (Co-IP) untersucht. EGFR wurde mit einem an magnetische *beads* gekoppelten EGFR-spezifischen Antikörper präzipitiert und das Präzipitat anschließend in Immunoblot-Analysen mit EGFR- bzw. CD8 α (bindet an die Gelenkregion der transmembranen Antikörperfragmente)-spezifischen Antikörpern untersucht. Als Kontrolle wurden 10% des verwendeten Gesamtzell-extrakts (Input) aufgetragen. Als weitere Kontrolle wurde die Präzipitation mit einem irrelevanten IgG2 Antikörper durchgeführt (**C**).

Eine Co-Präzipitation von 225.TM, 225.TM.30 und TM.30 Molekülen mit EGFR konnte für A431/M2 Zellen eindeutig nachgewiesen (Abb. 3.4.4A) und für mit MDA-MB468/M2/i225.TM und MDA-MB468/M2/i225.TM.30 Zellen bestätigt werden (Abb. 3.4.3B). MDA-MB468/M2/iTM.30 Zellen wurden im Verlauf dieser Arbeit nicht in Co-IP Studien untersucht. Als Expressionskontrolle wurden für jede Probe 10% des eingesetzten IP-Lysats analysiert. Um unspezifische Bindung der transmembranen Antikörperfragmente an den IP-Antikörper oder die *beads* auszuschließen, wurde das Lysat von MDA-MB468/M2/i225.TM.30 Zellen zudem mit einem an *beads* gekoppelten Kontroll-IgG Antikörper inkubiert und das Eluat wie beschrieben analysiert (Abb. 3.4.4C). In dieser Probe konnte keine Präzipitation von EGFR oder 225.TM.30 nachgewiesen werden.

Aus diesen Ergebnissen geht hervor, dass sowohl die monospezifischen 225.TM und TM.30 Moleküle als auch das bispezifische 225.TM.30 Protein an EGFR binden. Es ist daher wahrscheinlich, dass im bispezifischen 225.TM.30 Protein beide scFv-Antikörperfragmente zur Bindung beitragen. Zum Beweis dieser Hypothese könnten Konkurrenzexperimente beispielsweise mit Cetuximab durchgeführt werden. Diese wurden im Rahmen dieser Arbeit jedoch nicht versucht.

3.4.4 Einfluss der transmembranen Antikörperfragmente auf die EGFR Expression

Bereits im konstitutiven Expressionssystem war ein Einfluss von 225.TM und 225.TM.30 auf die EGFR-Oberflächenexpression zu beobachten (vgl. Abschnitt 3.2.2). Dies wurde im Folgenden noch einmal für die induzierbar exprimierten Moleküle unter Einschluss von TM.30 untersucht. Dazu wurden mit Antikörperkonstrukten transduzierte oder parentale A431/M2 und MDA-MB468/M2 Zellen für 72 h in Anwesenheit von 0 oder 250 ng/ml Dox zur Induktion der Proteinexpression kultiviert. Anschließend wurden die EGFR-Oberflächen- und Gesamtexpression in FACS- und Immunoblot-Analysen mit EGFR-spezifischen Antikörpern untersucht (Abb. 3.4.5).

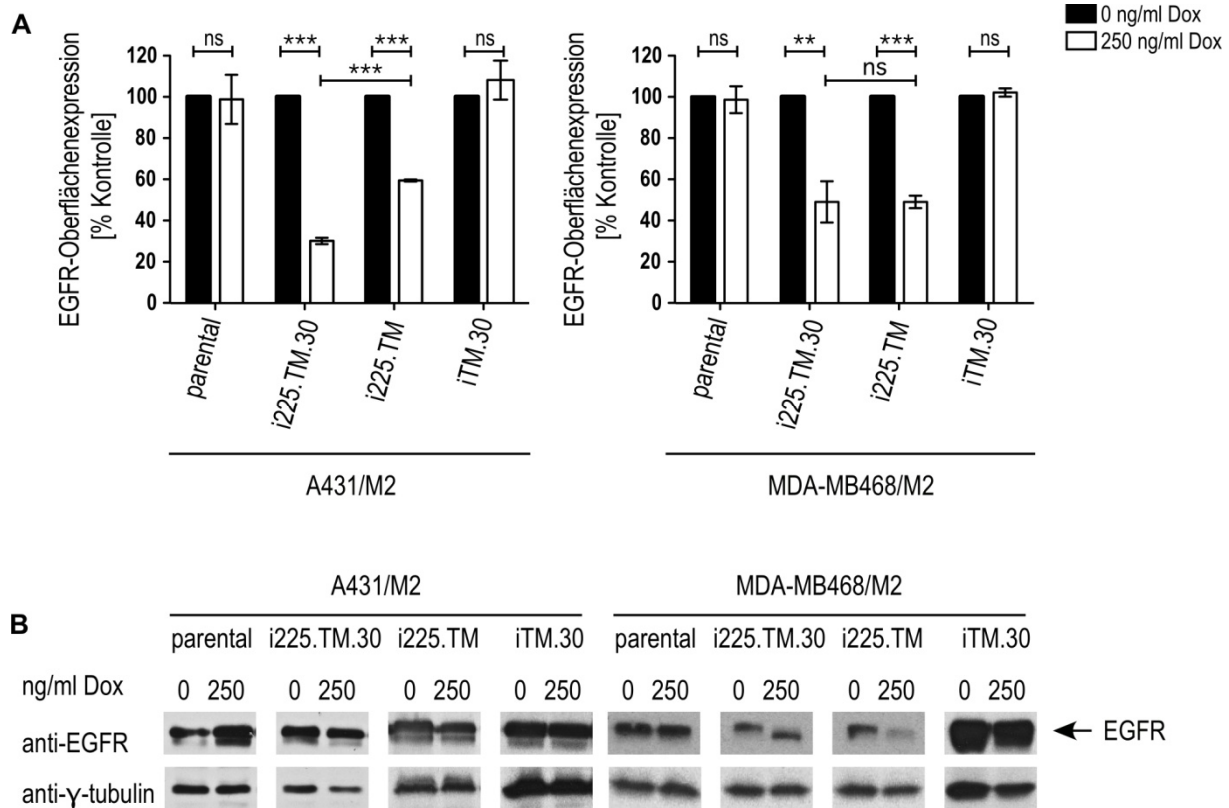


Abbildung 3.4.5 Untersuchung der EGFR-Expression in 225.TM.30-, 225.TM- und TM.30-exprimierenden Zellen. Mit induzierbaren Antikörperkonstrukten transduzierte bzw. parentale A431/M2 und MDA-MB468/M2 Zellen wurden für 72 h mit 0 (schwarz) oder 250 (weiß) ng/ml Dox inkubiert. **(A)** Die EGFR-Oberflächenexpression wurde in FACS-Analysen mit AF647-gekoppeltem EGFR-spezifischem Antikörper untersucht. Die MFI des EGFR-Signals der nicht induzierten Zellen (0 ng/ml Dox) wurde auf 100% gesetzt. Die Ergebnisse der Mittelwerte \pm SEM aus mindestens drei unabhängigen Experimenten sind dargestellt. ns: nicht signifikant; **: $p < 0.01$; ***: $p < 0.001$. **(B)** EGFR-Proteinlevel in Gesamtzelllysaten induzierter und nicht induzierter Zellen wurden in Immunoblot-Analysen mit einem EGFR-spezifischen Antikörper untersucht. γ -Tubulin diente als Ladekontrolle.

In diesen Experimenten wurden die in Abschnitt 3.2.2 dargestellten Beobachtungen bestätigt. Sowohl die induzierte Expression von 225.TM.30 als auch von 225.TM Proteinen führte zu einer signifikanten Reduktion (70% bzw. 40% in A431/M2 und je 50% in MDA-MB468/M2 Zellen) der EGFR-Oberflächenexpression (Abb. 3.4.5A). Erneut erwies sich das 225.TM.30 dem 225.TM Protein in dieser Hinsicht überlegen (70% gegenüber 40% Reduktion). In parentalen und TM.30-exprimierenden Zellen konnte keine Veränderung der EGFR-Oberflächenexpression nach Dox Induktion detektiert werden. In Immunoblot-Experimenten wurde nach induzierter Expression der transmembranen Antikörperfragmente in A431/M2 keine signifikante Änderung der Gesamt-EGFR Menge beobachtet (Abb. 3.4.5B, links). Die induzierte Expression von 225.TM.30 in MDA-MB468/M2 Zellen führte allerdings wie zuvor für konstitutiv exprimiertes Protein zu einer Verringerung des apparenten Molekulargewichts von EGFR. Außerdem war das detektierte EGFR-Signal in 225.TM-exprimierenden MDA-MB468/M2 Zellen verglichen mit nicht induzierten Zellen geringfügig

aber reproduzierbar (vgl. auch Abb. 3.4.7) schwächer (Abb. 3.4.5B, rechts). Die induzierte Expression von TM.30 in MDA-MB468/M2 Zellen oder die Inkubation von parentalen Zellen mit Dox hatte keine Auswirkungen auf die EGFR-Expression.

Um die EGFR-Spezifität der 225.TM- und 225.TM.30-vermittelten Effekte zu belegen, wurde ebenso die ErbB2-Expression in MDA-MB453/M2 Zellen nach Induktion der Expression der transmembranen Antikörperfragmente untersucht (Abb. 3.4.6).

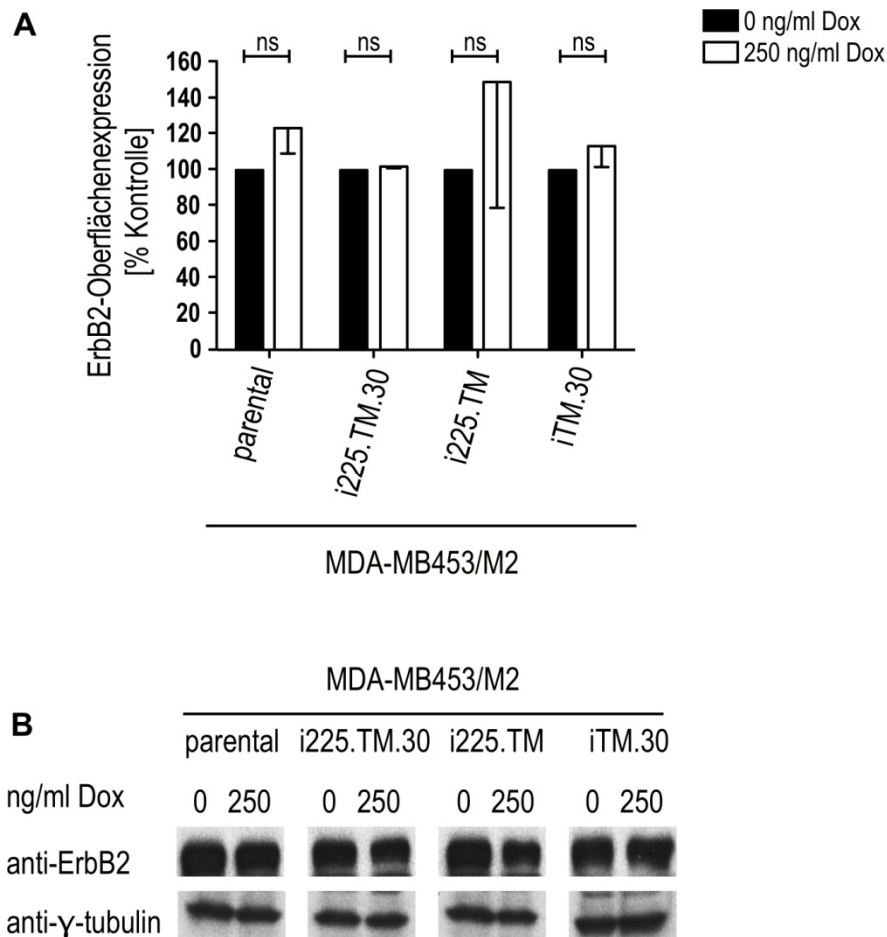


Abbildung 3.4.6 Untersuchung der ErbB2-Expression in 225.TM.30-, 225.TM- und TM.30-exprimierenden Zellen. Mit induzierbaren Antikörperkonstrukten transduzierte bzw. parentale MDA-MB453/M2 Zellen wurden für 72 h mit 0 (schwarz) oder 250 (weiß) ng/ml Dox inkubiert. **(A)** Die ErbB2-Oberflächenexpression wurde in FACS-Analysen mit ErbB2-spezifischem Antikörper und APC-gekoppeltem Zweitantikörper untersucht. Die MFI des ErbB2-Signals der nicht induzierten Zellen (0 ng/ml Dox) wurde auf 100% gesetzt. Die Ergebnisse der Mittelwerte \pm SEM aus mindestens zwei unabhängigen Experimenten sind dargestellt. ns: nicht signifikant. **(B)** ErbB2-Proteinmengen in Gesamtzelllysaten induzierter und nicht induzierter Zellen wurden in Immunoblot-Analysen mit einem ErbB2-spezifischen Antikörper untersucht. γ -Tubulin diente als Ladekontrolle.

Weder die ErbB2-Oberflächen- (Abb. 3.4.6A) noch -Gesamtexpression (Abb. 3.4.6B) wurden durch Expression der transmembranen Antikörperfragmente oder Inkubation mit Dox beeinflusst. Dies weist auf eine EGFR-Spezifität der in A431/M2 und MDA-MB468/M2 Zellen beobachteten Effekte von 225.TM.30 und 225.TM hin.

Zusammengefasst führte die Expression von 225.TM.30 und 225.TM aber nicht von TM.30 in EGFR-überexprimierenden A431/M2 und MDA-MB468/M2 Zellen zu einer deutlichen Reduktion der Rezeptormengen auf der Zelloberfläche, während die Gesamtmenge an EGFR, mit Ausnahme einer geringfügigen Reduktion in induzierten MDA-MB468/M2/i225.TM Zellen, nicht beeinflusst wurde.

Im nächsten Schritt wurde der Phosphorylierungsstatus des EGFR exemplarisch anhand des EGFRpTyr1045 nach induzierter 225.TM.30, 225.TM oder TM.30 Expression untersucht. Dieses Tyrosin wurde gewählt, da zuvor Unterschiede in dessen EGF-stimulierter Phosphorylierung in kontinuierlich 225.TM.30- oder 225.TM-exprimierenden Zellen nachgewiesen werden konnten (vgl. Abb. 3.2.7). Mit induzierbaren Antikörperkonstrukten transduzierte oder parentale A431/M2 bzw. MDA-MB468/M2 Zellen wurden für 72 h in Anwesenheit von 0 oder 250 ng/ml Dox kultiviert und jeweils nach dem Aushungern mit 0 oder 50 ng/ml EGF stimuliert. Anschließend wurden die Proben in Immunoblot-Analysen mit EGFR- oder EGFRpTyr1045-spezifischen Antikörpern untersucht (Abb. 3.4.7). Die Expression der transmembranen Antikörperfragmente wurde mit einem CD8 α -spezifischen Antikörper bestätigt (Daten nicht gezeigt).

Weder die Inkubation mit Dox allein noch die Expression des TM.30 Proteins hatten einen Einfluss auf den Phosphorylierungsgrad von Tyr1045 des EGFR in A431/M2 oder MDA-MB468/M2 Zellen (Abb. 3.4.7A/C). Sowohl die Expression von 225.TM als auch von 225.TM.30 inhibierte dagegen die EGF-stimulierte Phosphorylierung des EGFR in beiden Tumorzelllinien (Abb. 3.4.7B/C). Die Inhibierung durch das 225.TM.30 Molekül in MDA-MB468/M2 Zellen war etwas geringer ausgeprägt als in A431/M2 Zellen. Darüber hinaus hemmten die transmembranen Antikörperfragmente auch die endogene, ohne EGF-Stimulierung bereits vorhandene Phosphorylierung von Tyr1045, teils vollständig. Diese endogene Phosphorylierung von Tyr1045 in A431/M2 Zellen war, wie für Wildtyp A431 Zellen (vgl. Abb. 3.2.7), bereits sehr hoch, so dass kaum mehr eine Signalverstärkung im Immunoblot nach EGF-Stimulierung zu beobachten war (Abb. 3.4.7A/B). Weiterhin resultierte die Induktion der Expression von 225.TM, wie z.T. bereits im konstitutiven Expressionssystem beschrieben (vgl. Abb. 3.2.7), in A431/M2/i225.TM und MDA-MB468/M2/i225.TM Zellen in einem verringerten Gesamt-EGFR-Signal (Abb. 3.4.7B/C). Ähnliches wurde zwar auch für A431/M2/i225.TM.30 Zellen beobachtet ist aber dort, wie durch die Analyse von γ -Tubulin bestätigt, auf das Auftragen von reduzierten Gesamt-Protein-Mengen und nicht auf die induzierte 225.TM.30 Expression zurückzuführen (Abb. 3.4.7B). Dagegen wurde, wie nach konstitutiver Expression von 225.TM.30 in MDA-MB468 Zellen (vgl. Abb. 3.2.5), eine verringertes apparentes Molekulargewicht von EGFR in MDA-MB468/M2/i225.TM.30 Zellen detektiert (Abb. 3.4.7C).

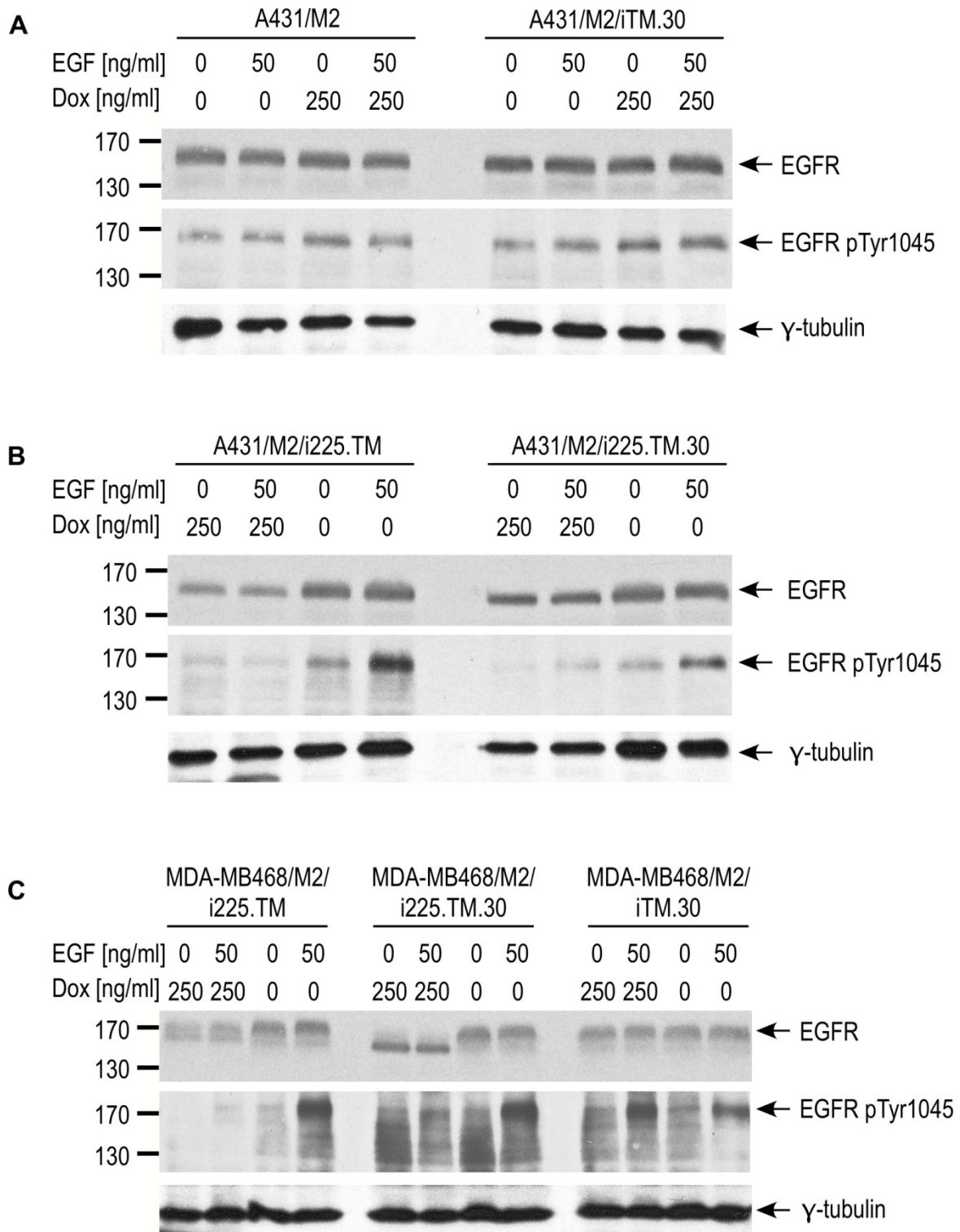


Abbildung 3.4.7 Analyse der EGFR-Aktivierung in A431/M2 (A/B) bzw. MDA-MB468/M2 (C) Zellen nach Induktion der Expression transmembraner Antikörperfragmente. Zellen wurden für 72 h mit 0 bzw. 250 ng/ml Dox inkubiert, anschließend über Nacht in 0,5% FCS-haltigem Medium ausgehungert und am nächsten Tag mit 0 oder 50 ng/ml EGF für 15 min bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden Zelllysate hergestellt, mittels SDS-PAGE aufgetrennt und auf eine Membran transferiert. Die Phosphorylierung des EGFR-pTyr1045 wurde mittels Immunoblot analysiert. Der Nachweis von Gesamt-EGFR Protein und γ -Tubulin dienten als Kontrollen.

3.4.5 Einfluss der Expression von 225.TM, 225.TM.30 und TM.30 auf das Wachstum EGFR-positiver Tumorzellen

Im nächsten Schritt wurde die Proliferation EGFR-positiver oder -negativer Zellen nach induzierter 225.TM.30, 225.TM oder TM.30 Proteinexpression untersucht. Gleiche Zahlen mit transmembranen Antikörperkonstrukten transduzierter oder parentaler EGFR-überexprimierender A431/M2 und MDA-MB468/M2 Zellen wurden in 96-well Platten in Triplikaten ausgesät und in Anwesenheit von steigenden Dox (0, 50, 250 oder 1000 ng/ml) Konzentrationen kultiviert. Nach 24, 48, 72 und 96 h (Tag 1 bis Tag 4) wurde zur Bestimmung der Anzahl proliferierender Zellen ein MTT-Metabolisierungsassay durchgeführt. Die Absorption der nicht induzierten Zellen an Tag 1 wurde auf 1 gesetzt. Die Ergebnisse sind in Abbildung 3.4.8 zusammengefasst.

Die Proliferation der 225.TM.30-, 225.TM- und TM.30-exprimierenden Zellen nahm mit zunehmender Dox-Konzentration signifikant ab (Reduktion um ~30% bei 1000 ng/ml Dox). Für parentale A431/M2 oder MDA-MB468/M2 Zellen konnte kein Einfluss von Dox auf das Wachstum beobachtet werden. Daher ist die beobachtete Wachstumshemmung in den transduzierten EGFR-exprimierenden Zellen direkt auf die Aktivität der 225.TM.30, 225.TM und TM.30 Proteine zurückzuführen.

Um auch spätere Effekte der induzierten Proteinexpression auf das Wachstum der A431/M2 und MDA-MB468/M2 Zellen zu ermitteln, wurden gleiche Zellzahlen in Triplikaten in 24-well Platten ausgesät und für 7 bis 14 Tage in ständiger Anwesenheit von 0, 50, 250 oder 1000 ng/ml Dox kultiviert. Um Unterschiede in der erreichten Zellzahl nach Beendigung des Experiments bestimmen zu können, wurden Kristallviolett-Färbungen (vgl. Abschnitt 2.2.23) durchgeführt (Abb. 3.4.9).

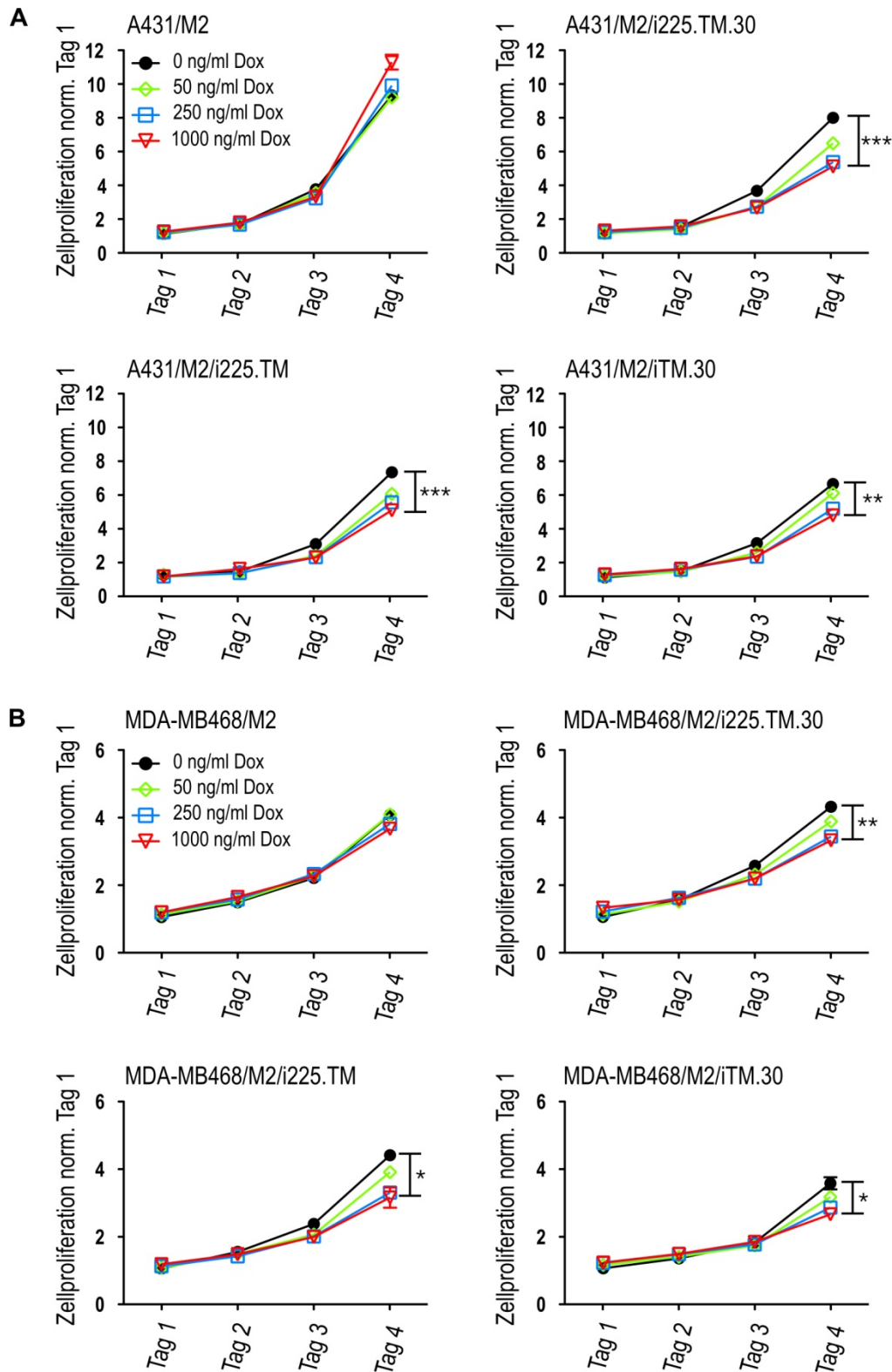


Abbildung 3.4.8 Proliferation EGFR-überexprimierender Zellen nach Induktion der Expression transmembraner Antikörperfragmente. Mit transmembranen Antikörperkonstrukten transduzierte und parentale A431/M2 (**A**) bzw. MDA-MB468/M2 (**B**) Zellen wurden in gleichen Zellzahlen in Triplikaten in 96-well Platten ausgesät und mit 0 (schwarze Kreise), 50 (grüne Rauten), 250 (blaue Quadrate) oder 1000 (rote Dreiecke) ng/ml Dox kultiviert. Nach 24, 48, 72 und 96 h (Tag 1 bis Tag 4) wurde die Proliferation mit Hilfe eines MTT-Metabolisierungsassays untersucht. Die Mittelwerte normalisiert auf den Wert der nicht induzierten Zellen (0 ng/ml Dox) an Tag 1 \pm SEM sind dargestellt. *: $p < 0,05$; **: $p < 0,01$; ***: $p < 0,001$.

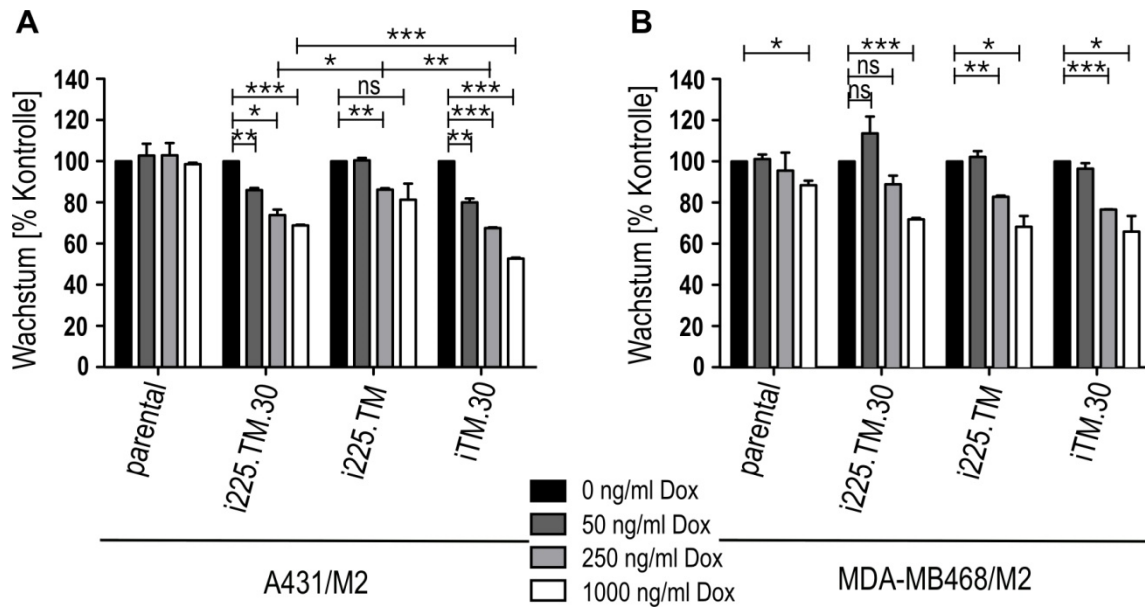


Abbildung 3.4.9 Langzeitwachstum EGFR-überexprimierender Zellen nach Induktion der Expression transmembraner Antikörperfragmente. Mit transmembranen Antikörperkonstrukten transduzierte und parentale A431/M2 (**A**) bzw. MDA-MB468/M2 (**B**) Zellen wurden in gleichen Zellzahlen in Triplikaten in 24-well Platten ausgesät und mit 0 (schwarz), 50 (dunkelgrau), 250 (hellgrau) oder 1000 (weiß) ng/ml Dox für 7 bis 14 Tage kultiviert. Das Medium wurde zweimal wöchentlich gewechselt. Am Ende der Testperiode wurden die Zellen fixiert und das Zellwachstum wurde in einem Kristallviolett-Assay untersucht. Die Mittelwerte normalisiert auf den Wert der nicht induzierten Zellen (0 ng/ml Dox) wurden aufgetragen. ns: nicht signifikant; *: $p < 0,05$; **: $p < 0,01$; ***: $p < 0,001$.

Parentale A431/M2 Zellen zeigten keine Reduktion des Zellwachstums bei konstanter Anwesenheit von Dox über einen längeren Zeitraum (Abb. 3.4.9A). Bei MDA-MB468/M2 Zellen wurde in diesen Langzeituntersuchungen ein leicht reduziertes Wachstum (~10%) nach Inkubation mit 1000 ng/ml Dox (weiß) beobachtet (Abb. 3.4.9B). In 225.TM.30-, 225.TM- und TM.30-exprimierenden MDA-MB468/M2 und A431/M2 Zellen wurde dagegen eine deutliche Antikörperfragment-vermittelte Wachstumshemmung beobachtet, die mit steigender Dox-Konzentration zunahm. In A431/M2 Zellen war der Langzeiteffekt (bei 1000 ng/ml Dox) des TM.30 Proteins (50% Reduktion) signifikant stärker als der Effekt der 225.TM.30 (30%) oder 225.TM (20%) Proteine (Abb. 3.4.9A), wobei auch der Unterschied zwischen 225.TM.30 und 225.TM signifikant war. In MDA-MB468/M2 Zellen lösten alle Proteine etwa die gleiche Zellwachstumshemmung (30%) aus (Abb. 3.4.9B).

Diese Effekte waren spezifisch für EGFR-exprimierende Zellen. Keines der transmembranen Antikörperfragmente hatte einen Einfluss auf das Kurz- oder Langzeitwachstum von MDA-MB453/M2 Zellen (Abb. 3.4.10).

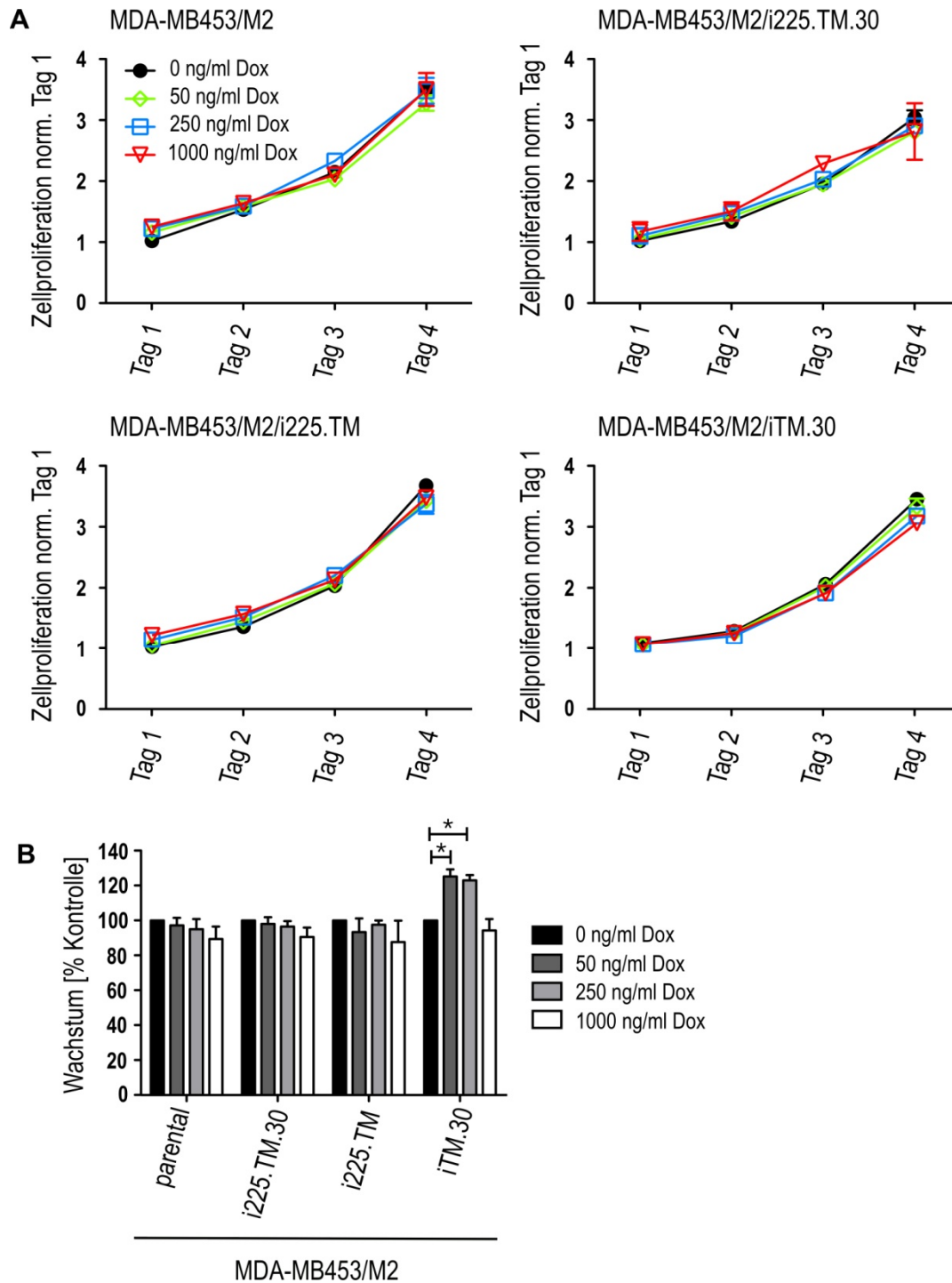


Abbildung 3.4.10 Proliferation EGFR-negativer Tumorzellen nach Induktion der Expression transmembraner Antikörperfragmente. Mit transmembranen Antikörperkonstrukten transduzierte und parentale MDA-MB453/M2 Zellen wurden in gleichen Zellzahlen in Triplikaten in 96-well Platten **(A)** bzw. 24-well Platten **(B)** ausgesät und mit 0 (schwarze Kreise/schwarze Balken), 50 (grüne Rauten/dunkelgraue Balken), 250 (blaue Quadrate/hellgraue Balken) oder 1000 (rote Dreiecke/weiße Balken) ng/ml Dox kultiviert. **(A)** Nach 24, 48, 72 und 96 h (Tag 1 bis Tag 4) wurde die Proliferation mit Hilfe eines MTT-Metabolisierungsassays untersucht. Die Mittelwerte normalisiert auf den Wert der nicht induzierten Zellen (0 ng/ml Dox) an Tag 1 \pm SEM sind dargestellt. **(B)** Die Zellen wurden 7 bis 14 Tage kultiviert und das Medium zweimal wöchentlich gewechselt. Am Ende der Testperiode wurden die Zellen fixiert und das Zellwachstum wurde in einem Kristallviolett-Assay untersucht. Die Mittelwerte normalisiert auf den Wert der nicht induzierten Zellen (0 ng/ml Dox) \pm SEM wurden aufgetragen. *: $p < 0,05$.

Um zu untersuchen, ob dem reduzierten Wachstum der EGFR-positiven A431/M2 und MDA-MB468/M2 Zellen nach Induktion der Antikörperfragment Expression eine erhöhte Apoptose zugrunde liegt, wurde der Anteil Annexin V-positiver Zellen nach 72 h Inkubation mit 0 oder 250 ng/ml Dox in FACS-Experimenten verglichen (Abb. 3.4.11).

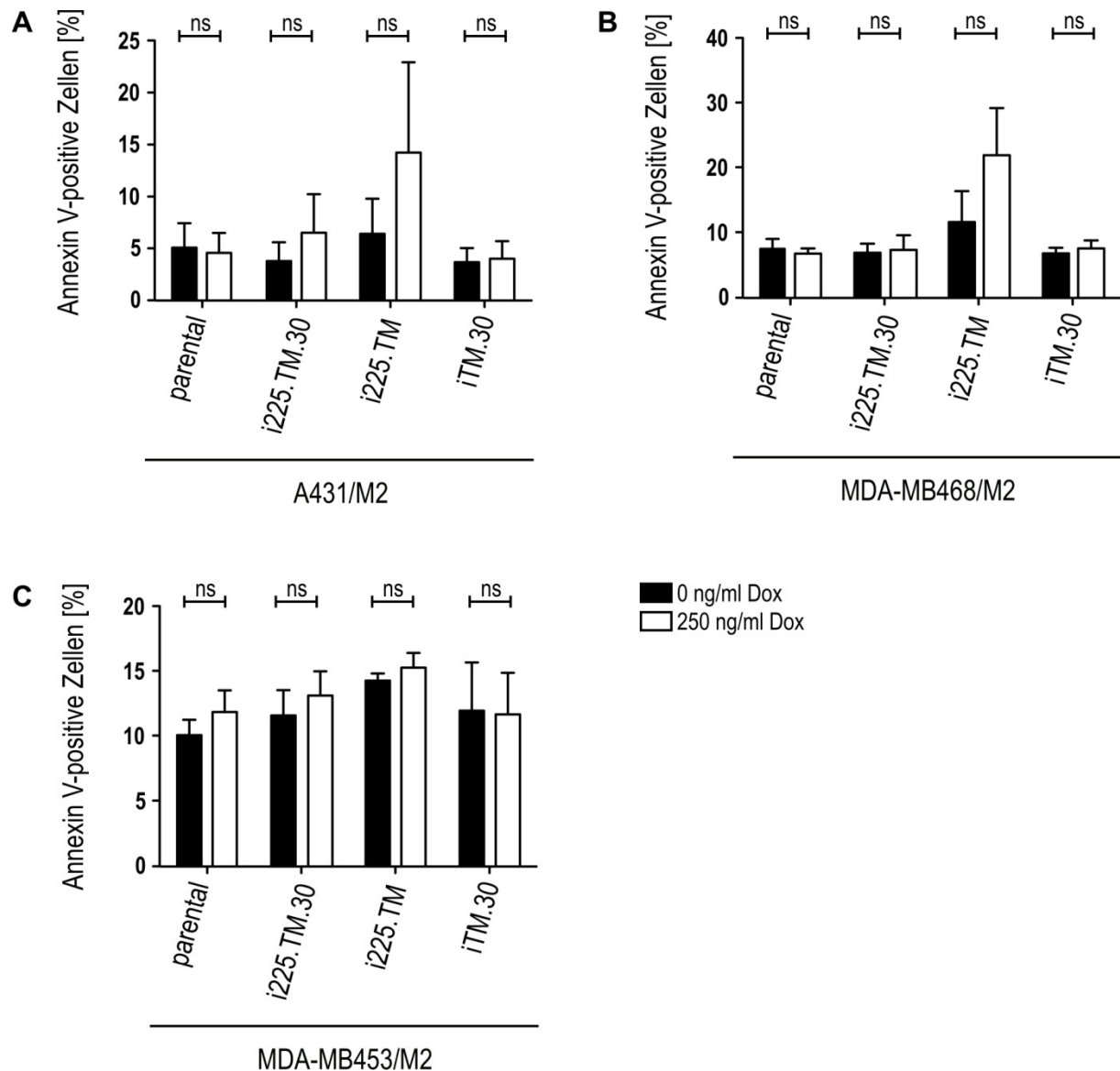


Abbildung 3.4.11 Anteil apoptotischer Zellen nach Induktion der Expression transmembraner Antikörperfragmente. Mit transmembranen Antikörperkonstrukten transduzierte und parentale A431/M2 (A), MDA-MB468/M2 (B) bzw. MDA-MB453/M2 (C) Zellen wurden für 72 h mit 0 (schwarz) oder 250 (weiß) ng/ml Dox inkubiert und anschließend wurde der Anteil apoptotischer, Annexin V-positiver Zellen mittels FACS-Analyse bestimmt. Die Mittelwerte \pm SEM aus drei unabhängigen Experimenten sind dargestellt. ns: nicht signifikant.

Nach induzierter Expression des 225.TM Proteins wurde sowohl in A431/M2 (Abb. 3.4.11A) als auch in MDA-MB468/M2 Zellen (Abb. 3.4.11B) ein verglichen mit nicht induzierten Zellen zwei- bis dreifach erhöhter Anteil Annexin V-positiver Zellen nachgewiesen. Da dieser Effekt in beiden EGFR-exprimierenden Zelllinien zu beobachten war, ist eine 225.TM-vermittelte

Apoptoseinduktion, trotz fehlender statistischer Signifikanz, wahrscheinlich. Die induzierte Expression von 225.TM.30 und TM.30 hatte keinen signifikanten Einfluss auf den Anteil apoptotischer Zellen (Abb. 3.4.11). EGFR-negative MDA-MB453/M2 Zellen zeigten generell, auch ohne Dox Inkubation, einen relativ hohen Anteil apoptotischer Zellen (~10%), der sich nach induzierter Expression der transmembranen Antikörperfragmente nicht weiter erhöhte (Abb. 3.4.11C).

Um zu bestätigen, dass die in A431/M2 beschriebene Wachstumsinhibition nach Induktion der Expression von 225.TM.30, 225.TM und TM.30 spezifisch auf die Expression der transmembranen Antikörperfragmente in diesen Zellen zurückzuführen war, wurde das Wachstumsverhalten und der Anteil apoptotischer Zellen auch in induzierbar Luziferase-EGFP- und scFv(30)-exprimierenden Kontrollzellen wie oben beschrieben untersucht (Abb. 3.4.12). A431/M2/iscFv(30) Zellen wurden durch Transduktion von A431/M2 Zellen mit dem pES.T6-iscFv(30)-SE Konstrukt (Abb. 3.4.12A) generiert und exprimieren nach Dox-Induktion das zytoplasmatische scFv(30) Antikörperfragment (Hyland *et al.*, 2003).

Dabei wurde in diesen Kontrollzellen keine signifikante Erhöhung des Anteils Annexin V-positiver Zellen (Abb. 3.4.12B) bzw. keine Reduktion des Lang- oder Kurzzeitwachstums (Abb. 3.4.12C/D) beobachtet. Die Dox-induzierte Expression des Luziferase-EGFP und des scFv(30) Proteins wurde dabei in FACS und/oder Immunoblot-Analysen nachgewiesen (Daten nicht gezeigt). Dies bestätigt, dass das reduzierte Wachstum 225.TM.30-, 225.TM- und TM.30-exprimierender A431/M2 Zellen nicht durch die generelle Überexpression eines exogenen Proteins verursacht wird, sondern spezifisch für die transmembranen Antikörperfragmente in EGFR-positiven Zellen ist.

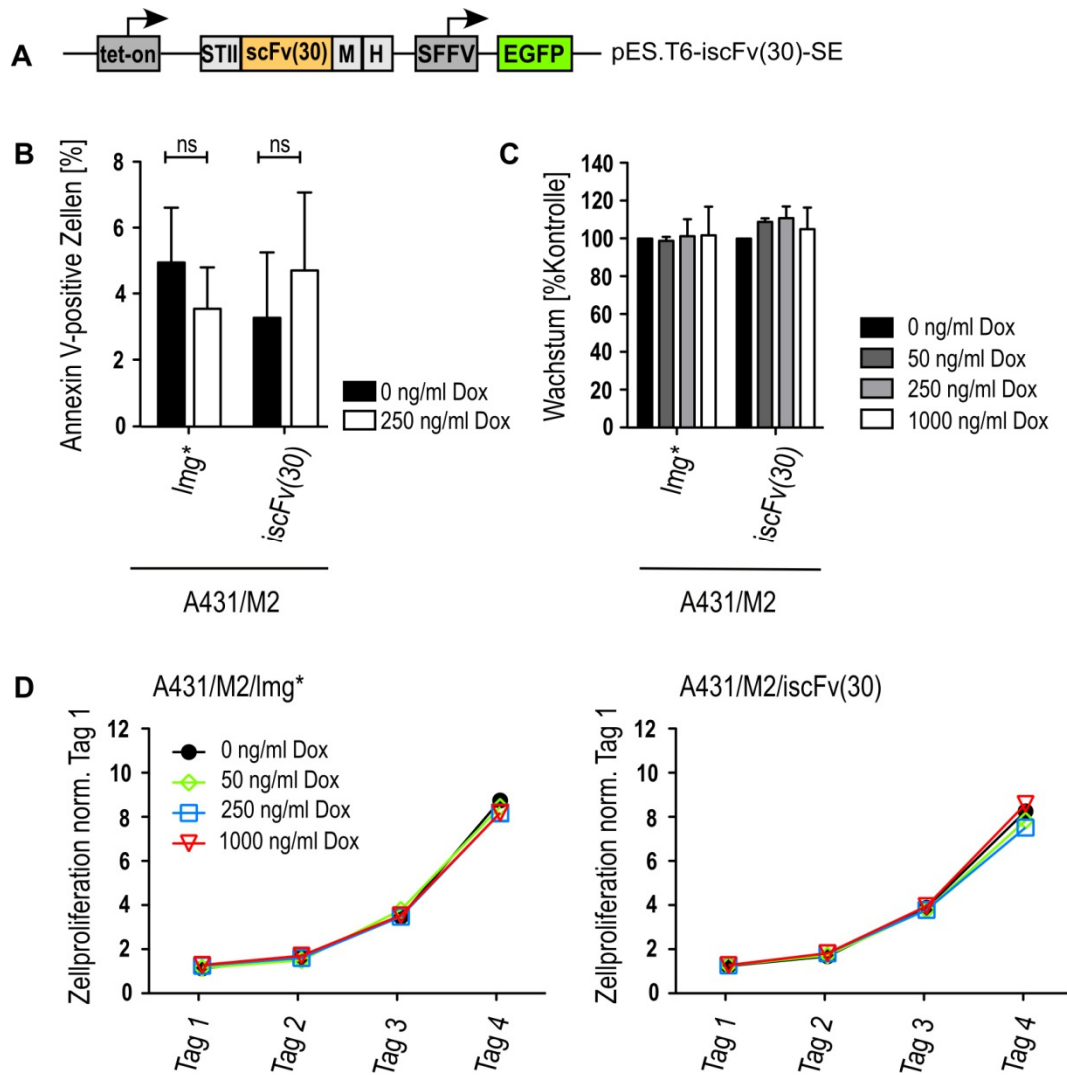


Abbildung 3.4.12 Apoptose- und Proliferationsanalyse von A431/M2/Img* und A431/M2/iscFv(30) Kontrollzellen. (A) Schematische Darstellung des pES.T6-iscFv(30)-SE Konstrukts. STII: Strep-tag II M: Myc-tag; H: Hexahistidin-tag. (B) Die Zellen wurden für 72 h mit 0 (schwarz) oder 250 (weiß) ng/ml Dox inkubiert und der Anteil apoptotischer, Annexin V-positiver Zellen in FACS-Experimenten untersucht. Der Mittelwert \pm SEM aus drei unabhängigen Experimenten ist dargestellt. (C) Gleiche Zellzahlen wurden in Triplikaten in 24-well Platten ausgesät und mit 0 (schwarz), 50 (dunkelgrau), 250 (hellgrau) oder 1000 (weiß) ng/ml Dox für 7-14 Tage kultiviert. Das Medium wurde zweimal wöchentlich gewechselt. Am Ende der Testperiode wurden die Zellen fixiert und das Zellwachstum wurde in einem Kristallviolett-Assay untersucht. Die Mittelwerte normalisiert auf den Wert der nicht induzierten Zellen (0 ng/ml Dox) wurden aufgetragen. ns: nicht signifikant. (D) Die Zellen wurden in gleichen Zellzahlen in Triplikaten in 96-well Platten ausgesät und mit 0 (schwarze Kreise), 50 (grüne Rauten), 250 (blaue Quadrate) oder 1000 (rote Dreiecke) ng/ml Dox kultiviert. Nach 24, 48, 72 und 96 h (Tag 1 bis Tag 4) wurde die Proliferation mit Hilfe eines MTT-Metabolisierungsassays untersucht. Die Mittelwerte normalisiert auf den Wert der nicht induzierten Zellen (0 ng/ml Dox) an Tag 1 \pm SEM sind dargestellt.

3.4.6 Intrazelluläre Lokalisierung von EGFR und transmembranen Antikörperfragmenten

In 225.TM.30- und 225.TM-exprimierenden EGFR-positiven Zellen war der Rezeptor signifikant von der Oberfläche herunterreguliert. In Gesamtzelllysaten wurde jedoch, im Fall

von 225.TM nur eine geringe, im Fall von 225.TM.30 gar keine Änderung des EGFR-Gehalts beobachtet (vgl. Abschnitt 3.4.3). Daher wurde die genaue Lokalisation des EGFR in diesen Zellen mittels konfokaler Laserscanning Mikroskopie (CLSM) ermittelt (vgl. Abschnitt 2.2.24). Dabei wurde auch die Lokalisierung der transmembranen Antikörperfragmente, v.a. der nur schwach an der Oberfläche exprimierten 225.TM.30 und TM.30 Moleküle (vgl. Abschnitt 3.4.2), mit untersucht. Da in Co-IP Studien eine Bindung aller drei transmembranen Antikörperfragmente an EGFR nachweisbar war (vgl. Abschnitt 3.4.2), wurde ebenfalls eine mögliche Co-Lokalisierung der Moleküle mit EGFR analysiert. Dazu wurden mit transmembranen Antikörperkonstrukten transduzierte MDA-MB468/M2 Zellen für 72 h in Anwesenheit von 0 oder 1000 ng/ml (um eine möglichst hohe Proteinexpression zu erreichen) Dox auf Deckgläschen kultiviert, anschließend auf diesen fixiert und zur Färbung intrazellulärer Proteine permeabilisiert. Die Färbung des EGFR erfolgte mit einem AF647-gekoppelten EGFR-spezifischen Antikörper. Gleichzeitig wurden die 225.TM, 225.TM.30 und TM.30 Proteine mit einem CD8 α -spezifischen Antikörper, gefolgt von einem AF546-gekoppelten Zweitantikörper angefärbt (Abb. 3.4.13). Der Zellkern wurde in allen Proben mit DAPI sichtbar gemacht. Für alle in dieser Arbeit gezeigten CLSM-Experimente wurden Einzel- sowie Sekundärantikörper-Kontrollen durchgeführt. Diese ergaben keine unspezifischen Signale und sind daher nicht gezeigt.

In nicht induzierten Zellen war, wie erwartet, kein CD8 α -positives Signal (rot) detektierbar und die EGFR-Färbung (gelb) fand sich hauptsächlich an der Zelloberfläche (Abb. 3.4.13, jeweils linke Spalte). Nach Expression von 225.TM.30 oder TM.30 Protein (Abb. 3.1.13 B/C) wurden die transmembranen Antikörpermoleküle zusammen mit EGFR in perinukleären Kompartimenten (weißer Pfeil) nachgewiesen. Weder für 225.TM.30- noch für TM.30-exprimierende Zellen waren deutliche CD8 α -Oberflächensignale detektierbar. Die Co-Lokalisation von EGFR mit 225.TM.30, aber nicht TM.30, im Inneren der Zellen führte zu einer starken Reduktion der EGFR-Oberflächenfärbung. Das CD8 α -positive Signal in 225.TM-exprimierenden Zellen (Abb. 3.4.13A) wurde sowohl im Zytoplasma als auch an der Zelloberfläche detektiert. Auch in diesen Zellen war eine reduzierte EGFR-Oberflächenexpression zu beobachten. Weiterhin war eine leichte Zunahme EGFR-positiver, kleiner Vesikel im Zellinneren sichtbar, die möglicherweise Endosomen repräsentieren. Eine Co-Lokalisation von EGFR und 225.TM wurde an der Zelloberfläche detektiert.

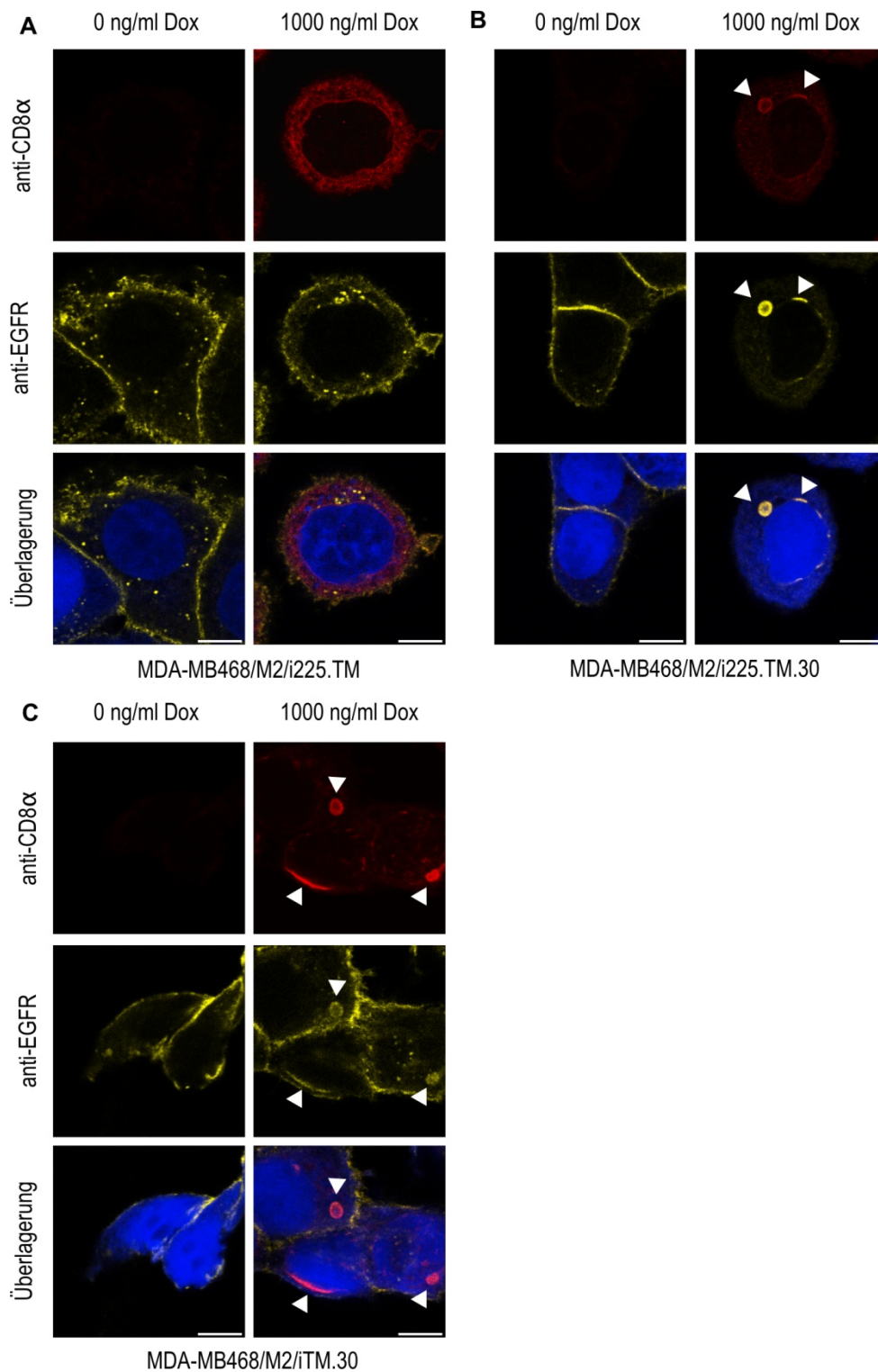


Abbildung 3.4.13 Lokalisierung von transmembranen Antikörperfragmenten und EGFR in MDA-MB468/M2 Zellen. MDA-MB468/M2/i225.TM (A), i225.TM.30 (B) oder iTM.30 (C) Zellen wurden auf Deckgläschen mit 0 oder 1000 ng/ml Dox für 72 h kultiviert. Anschließend wurden die Zellen fixiert, permeabilisiert und mit CD8α-spezifischem Antikörper und AF546-gekoppeltem Zweitantikörper (rot) sowie AF647-gekoppeltem EGFR-spezifischem Antikörper (gelb) doppelt gefärbt. DAPI-Färbung (blau) diente der Visualisierung der Zellkerne. Die Lokalisierung der Proteine wurde mittels konfokaler Laserscanning Mikroskopie bestimmt. Die AF546-, AF647- und DAPI-Kanäle wurden übereinandergelegt, um eventuelle Co-Lokalisierungen (weiße Pfeile) sichtbar zu machen. Einzelebenen eines z-Stapels sind gezeigt. (Größenstandard = 7,5 µm).

In EGFR-negativen MDA-MB453/M2 Zellen wurde in CLSM-Studien nach Dox-Induktion nur eine schwache Expression von 225.TM, 225.TM.30 und TM.30 detektiert (Abb. 3.4.14). Die Signale verteilten sich dabei für die 225.TM und 225.TM.30 Proteine über das gesamte Zytoplasma, während die TM.30 Signale in perinukleären Strukturen zu finden waren.

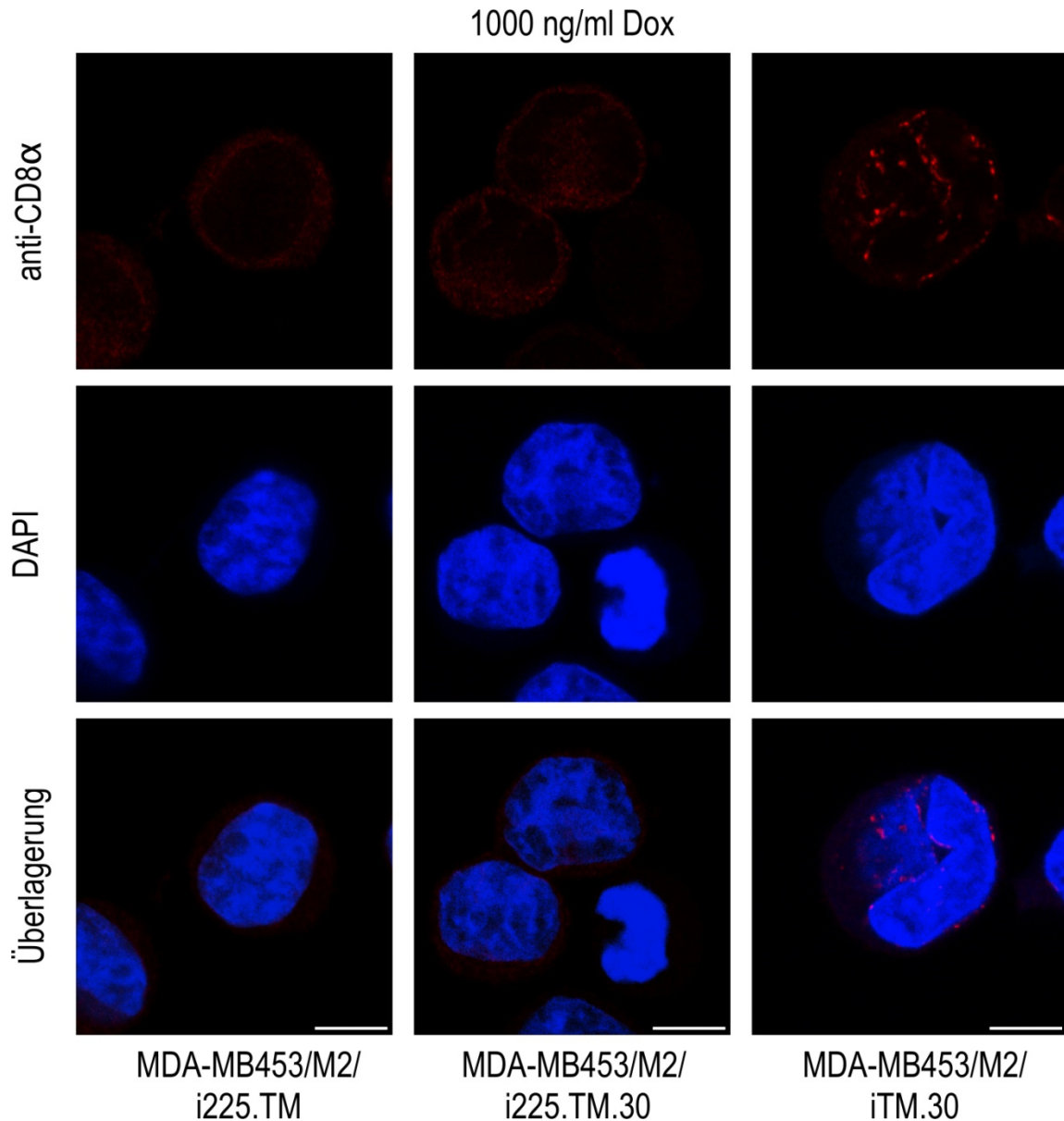


Abbildung 3.4.14 Lokalisierung von transmembranen Antikörperfragmenten in EGFR-negativen MDA-MB453/M2 Zellen. MDA-MB453/M2/i225.TM (links), i225.TM.30 (Mitte) oder iTM.30 (rechts) Zellen wurden auf Deckgläschen mit 0 oder 1000 ng/ml Dox für 72 h kultiviert. Anschließend wurden die Zellen fixiert, permeabilisiert und mit CD8 α -spezifischem Antikörper und AF546-gekoppeltem Zweitantikörper (rot) gefärbt. DAPI-Färbung (blau) diente der Visualisierung der Zellkerne. Die Lokalisierung der Proteine wurde mittels konfokaler Laserscanning Mikroskopie bestimmt. Die AF546- und DAPI-Kanäle wurden übereinandergelegt. Einzelebenen eines z-Stapels sind gezeigt. (Größenstandard = 7,5 μ m).

Um die perinukleären Kompartimente, in denen 225.TM.30 und TM.30 Proteine mit EGFR co-lokalisieren, genauer zu untersuchen, wurden induzierte mit transmembranen

Antikörperkonstrukten transduzierte oder parentale MDA-MB468/M2 Zellen mit AF647-gekoppeltem EGFR-spezifischem Antikörper und an AF594-gekoppeltem Concanavalin A als Marker für das endoplasmatische Retikulum (ER) gefärbt (Abb. 3.4.15). Der Zellkern wurde mittels DAPI sichtbar gemacht.

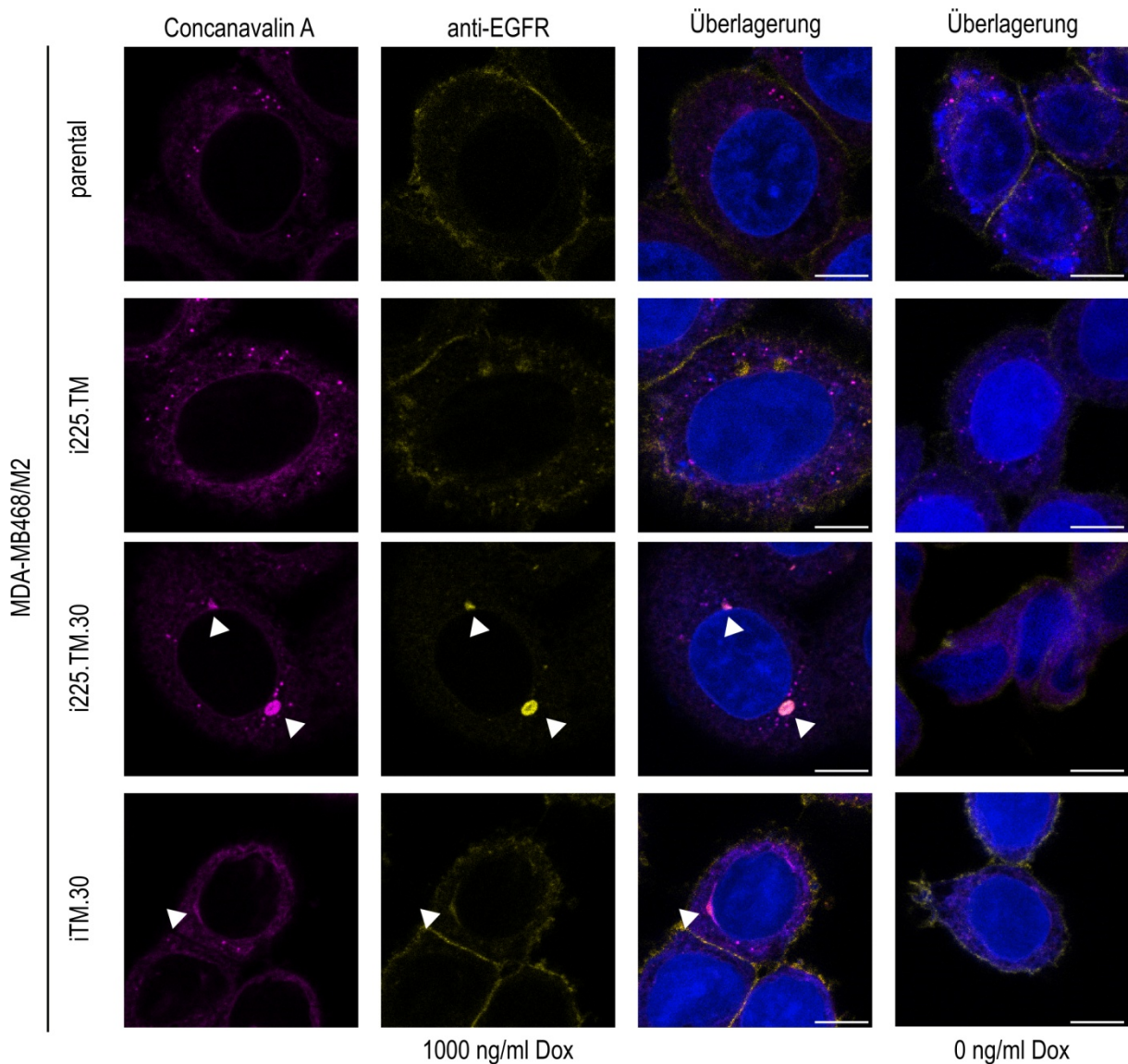


Abbildung 3.4.15 Lokalisierung von EGFR nach Expression transmembraner Antikörperfragmente in MDA-MB468/M2 Zellen. MDA-MB468/M2, i225.TM, i225.TM.30 oder iT.M.30 Zellen wurden auf Deckgläschen mit 0 oder 1000 ng/ml Dox für 72 h kultiviert. Anschließend wurden die Zellen fixiert, permeabilisiert und mit AF647-gekoppeltem EGFR-spezifischem Antikörper (gelb) und dem AF594-gekoppelten ER-Marker Concanavalin A (lila) doppelt gefärbt. DAPI-Färbung (blau) diente der Visualisierung der Zellkerne. Die Lokalisierung des EGFR wurde mittels konfokaler Laserscanning Mikroskopie bestimmt. Die AF594-, AF647- und DAPI-Kanäle wurden übereinandergelegt, um mögliche Co-Lokalisierungen (weiße Pfeile) sichtbar zu machen. Einzelebene eines z-Stapels sind gezeigt. (Größenstandard = 7,5 µm).

In 225.TM.30- und TM.30-, aber nicht in 225.TM-exprimierenden oder parentalen Zellen wurde eine Co-Lokalisation (weißer Pfeil) der Concanavalin A (lila)- und EGFR (gelb)-

Signale beobachtet. Daraus kann geschlossen werden, dass EGFR zusammen mit den 225.TM.30 oder TM.30 Proteinen im ER lokalisiert ist.

3.4.7 Auslösung einer ER-Stress-Antwort der Zelle nach Expression transmembraner Antikörperfragmente

Wie bisher gezeigt kann das reduzierte Wachstum TM.30-exprimierender EGFR-positiver Zellen nicht auf eine reduzierte Oberflächenexpression oder verminderte Liganden-abhängige Aktivierung von EGFR zurückgeführt werden (vgl. Abschnitte 3.4.4). Das TM.30 Protein wurde jedoch komplexiert mit EGFR im ER detektiert (vgl. Abschnitt 3.4.6). Eine ER Lokalisierung von EGFR wurde zuvor in, durch Glukosemangel oder Behandlung mit einem alkalischen Reagenz, gestressten Zellen beschrieben (Cai *et al.*, 1998; Liu *et al.*, 2006). In diesen Studien wurde die EGFR Lokalisierung im ER auch mit der Auslösung einer ER-Stress-Antwort in Zusammenhang gebracht. Daher wurde die Möglichkeit der Auslösung einer ER-Stress-Antwort nach Induktion der Expression transmembraner Antikörperfragmente untersucht. Dazu wurde das Expressionsniveau der ER-Stress Markerproteine Proteindisulfidisomerase (PDI) und BIP (Grp78) (Hampton, 2000; Turano *et al.*, 2002) in Immunoblot-Analysen mit transmembranen Antikörperkonstrukten transduzierter und parentaler A431/M2, MDA-MB468/M2 und MDA-MB453/M2 Zellen nach Induktion mit 0 oder 250 ng/ml Dox analysiert.

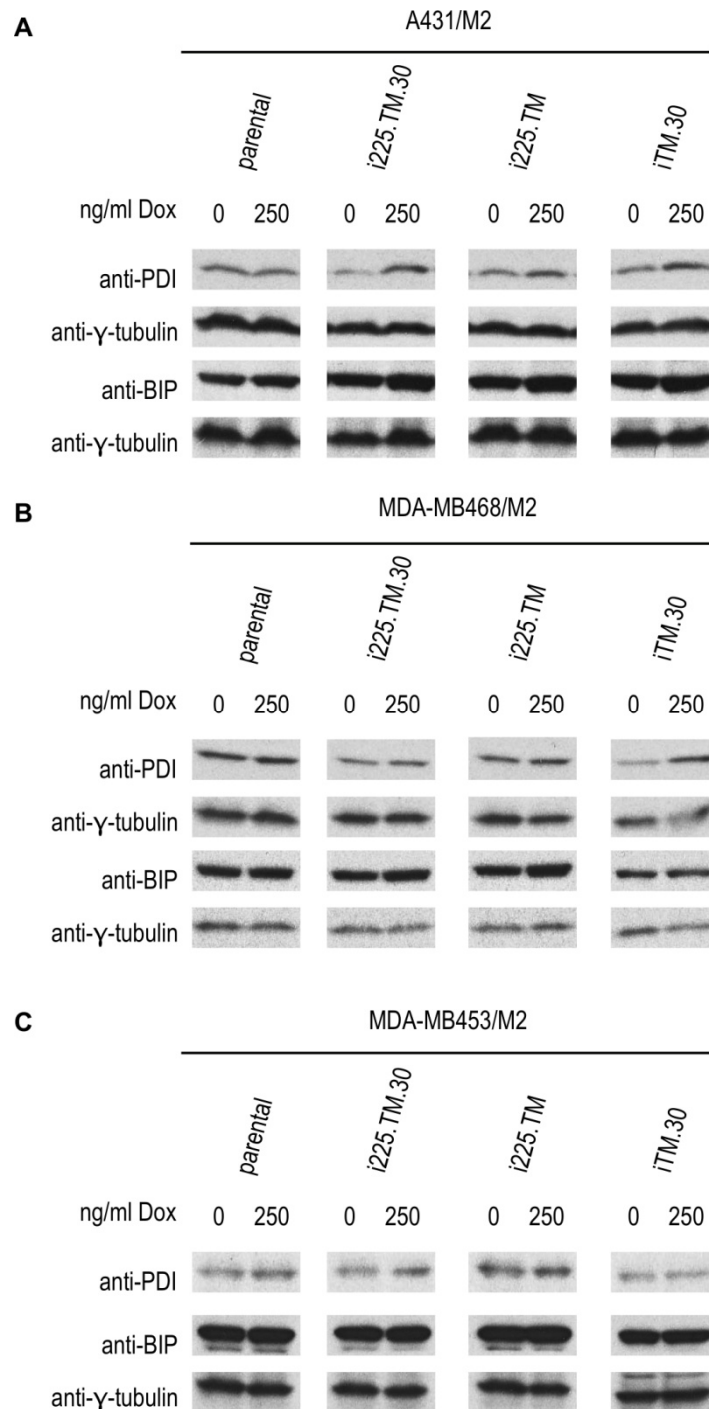


Abbildung 3.4.16 ER-Stress-Analyse in A431/M2 (A), MDA-MB468/M2 (B) und MDA-MB453/M2 (C) Zellen nach Induktion der Expression transmembraner Antikörperfragmente. Parentale, 225.TM.30-, 225.TM- oder TM.30-exprimierende Zellen wurden für 72 h mit 0 oder 250 ng/ml Dox inkubiert, Gesamtzelllysate hergestellt und diese mittels SDS-PAGE aufgetrennt und auf eine Membran übertragen. Die ER-Stress-Proteine PDI und BIP wurden in Immunoblot-Analysen mit entsprechenden Antikörpern untersucht. γ -Tubulin diente als Ladekontrolle.

Die induzierte Expression der Proteine 225.TM.30, TM.30 und in einem geringen Ausmaß die von 225.TM führte in A431/M2 Zellen zu einer Erhöhung der PDI Proteinmengen (Abb. 3.4.16A). Parentale Zellen zeigten nach Dox Inkubation keine Änderung der Mengen dieses

Proteins. Eine Erhöhung der BIP Proteinmengen wurde bereits in parentalen A431/M2 Zellen nach Dox-Inkubation nachgewiesen. Diese stieg geringfügig in induzierten A431/M2/iTM.30 Zellen. In EGFR-negativen MDA-MB453/M2 Zellen führte die Expression der transmembranen Antikörperfragmente zu keiner veränderten Antikörper-vermittelten BIP- oder PDI-Expression (Abb. 3.4.16C). In MDA-MB468/M2 Zellen wurden hauptsächlich nach Expression von TM.30 erhöhte PDI Proteinmengen detektiert. Die Expression von 225.TM und 225.TM.30 führte in diesen Zellen dagegen zu keiner relevanten Veränderung der PDI- und BIP-Mengen verglichen mit nicht induzierten Zellen (Abb. 3.4.16B).

Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass zumindest die Expression von TM.30 in EGFR-positiven Tumorzellen eine ER-Stress-Antwort auslösen könnte. In beiden EGFR-positiven Zelllinien wurde nach TM.30 Expression eine erhöhte PDI Proteinmenge detektiert. Dieses könnte das reduzierte Wachstum TM.30-exprimierender Zellen erklären.

3.4.8 Zusammenfassung der Abschnitte 3.4.1-3.4.7

In diesem Teil der Arbeit wurde ein System für die Dox-induzierte Expression der bi- und monospezifischen transmembranen Antikörperfragmente 225.TM.30, 225.TM und TM.30 etabliert. Trotz einer ähnlichen Gesamtproteinmenge nach Induktion, untersucht in Immunoblot-Analysen, wurde in FACS-Experimenten eine unterschiedliche Oberflächenexpression der Antikörperfragmente beobachtet. Die Proteinmenge an der Oberfläche nahm von 225.TM über 225.TM.30 zu TM.30 hin ab und schien im Zusammenhang mit der Menge an exprimiertem EGFR in den untersuchten Tumorzellen zu stehen (vgl. Abschnitt 3.4.2). Weiterhin konnte in Co-IP Experimenten die Bindung aller drei transmembranen Antikörperfragmente an EGFR bestätigt werden (Abschnitt 3.4.3). Die Expression von 225.TM oder 225.TM.30, aber nicht TM.30 Protein, in EGFR-exprimierenden, aber nicht ErbB2-exprimierenden, Zellen führte zu einer Reduktion der EGFR-Oberflächenexpression. Zudem war in 225.TM-exprimierenden MDA-MB468/M2 und A431/M2 Zellen eine leichte Reduktion der EGFR-Gesamtproteinmenge und in MDA-MB468/M2/i225.TM.30 Zellen ein reduziertes apparentes EGFR-Molekulargewicht zu beobachten. Die reduzierte EGFR-Oberflächenexpression korrelierte mit einer Inhibition der EGF-stimulierten Aktivierung des Rezeptors nach 225.TM oder 225.TM.30 Expression (Abschnitt 3.4.4). Weiterhin wurde nach induzierter Expression von 225.TM, 225.TM.30 und TM.30 in EGFR-positiven aber nicht -negativen, Zellen eine verminderte Kurz- und Langzeitproliferation beobachtet. Diese war aber, mit Ausnahme 225.TM-exprimierender Zellen, nicht mit einer erhöhten Apoptoserate der Zellen verbunden (Abschnitt 3.4.5). Konfokale Laserscanning Mikroskopie in MDA-MB468/M2 Zellen zeigte eine Co-Lokalisation von EGFR und 225.TM.30 sowie TM.30 Protein im ER, während 225.TM Moleküle und EGFR zusammen an der Zelloberfläche

detektiert wurden (Abschnitt 3.4.6). Die Ergebnisse der Untersuchung der ER-Stressmarkerproteine PDI und BIP weisen auf eine ER-Stress-Antwort ausgelöst durch die Expression des transmembranen Antikörperfragments TM.30 hin. Dies könnte das reduzierte Wachstum TM.30-exprimierender EGFR-positiver Tumorzellen erklären.

3.5 Generierung eines EGFR- und ErbB2-bindenden bispezifischen transmembranen Antikörperfragments

Wang und Kollegen haben gezeigt, dass ein bispezifischer Antikörper, hergeleitet aus dem EGFR-spezifischen mAk Cetuximab und dem ErbB2-spezifischen mAk Trastuzumab, den einzelnen mAk hinsichtlich der Wachstumsinhibition von Brustkrebszellen überlegen ist (Wang *et al.*, 2012). Dieses Antikörpermolekül bindet an die extrazellulären Domänen der beiden ErbB-Rezeptoren und induziert deren Internalisierung.

In dieser Arbeit wurde untersucht, welche Effekte eine simultane Bindung an die extrazelluläre Domäne von ErbB2 und intrazelluläre Domäne von EGFR durch ein bispezifisches transmembranes Antikörperfragment auf ErbB2-positive MDA-MB453, EGFR- und ErbB2-positive A431 (geringe ErbB2 Expression (Hynes *et al.*, 1989)) und EGFR- positive MDA-MB468 Zellen hat. Das hierzu generierte 5.TM.30 Molekül entspricht weitgehend dem Aufbau von 225.TM.30, wobei das EGFR-ECD-spezifische scFv(225) Antikörperfragment durch das ErbB2-ECD-spezifische scFv(FRP5) Fragment (Wels *et al.*, 1992) ersetzt wurde (Abb. 3.5.1). ScFv(FRP5) bindet im Bereich der ersten 222 Aminosäuren der ErbB2-Sequenz (Gerstmayer *et al.*, 1997; Grada *et al.*, 2013). Das monospezifische transmembrane Antikörperfragment 5.TM wurde als Kontrolle untersucht.

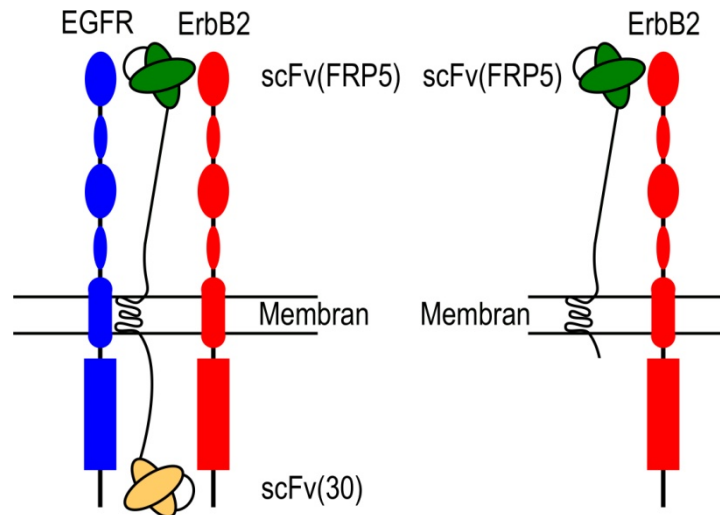


Abbildung 3.5.1 Schematische Darstellung des Aufbaus und der Bindungsstellen der mono- und bispezifischen transmembranen Antikörperfragmente 5.TM und 5.TM.30. 5.TM besteht aus einem, mittels einer CD8 α Gelenk- und CD28 Transmembranregion, in der Membran verankerten scFv(FRP5) Antikörperfragment, das an die extrazelluläre Domäne (AS 1-222) des ErbB2 Rezeptors bindet. 5.TM.30 besitzt zusätzlich ein C-terminales EGFR-ICD-spezifisches scFv(30) Antikörperfragment.

3.5.1 Konstruktion des Antikörperfragments 5.TM.30

Zur Generierung (Abb. 3.5.2) der 5.TM.30 Sequenz wurde die SP.225.M Sequenz im pMA-225.TM.30 Konstrukt über die vorhandenen *NcoI* und *BstXI* Schnittstellen durch die SP-scFv(FRP5) Sequenz aus einem kodonoptimierten pMK-5.TM Konstrukt (Schönfeld, unveröffentlicht) ersetzt. Das resultierende pMA-5.TM.30 sowie das pMK-5.TM Konstrukt dienen im Folgenden als *templates* für PCRs, in denen die Sequenzen 5.TM.30 bzw. 5.TM mit 5' *EcoRI* und 3' *Sall* Schnittstellen amplifiziert wurden. Diese Sequenzen wurden anschließend über *EcoRI/XhoI* in das pES.T6-x-SE Plasmid eingefügt. Die Transfervektoren pES.T6-i5.TM.30-SE und pES.T6-i5.TM-SE wurden zur Generierung entsprechender γ -retroviraler Vektorpartikel genutzt (vgl. Abschnitt 2.2.14), mit denen anschließend A431/M2, MDA-MB468/M2 und MDA-MB453/M2 Zellen transduziert wurden (vgl. Abschnitt 2.2.16).

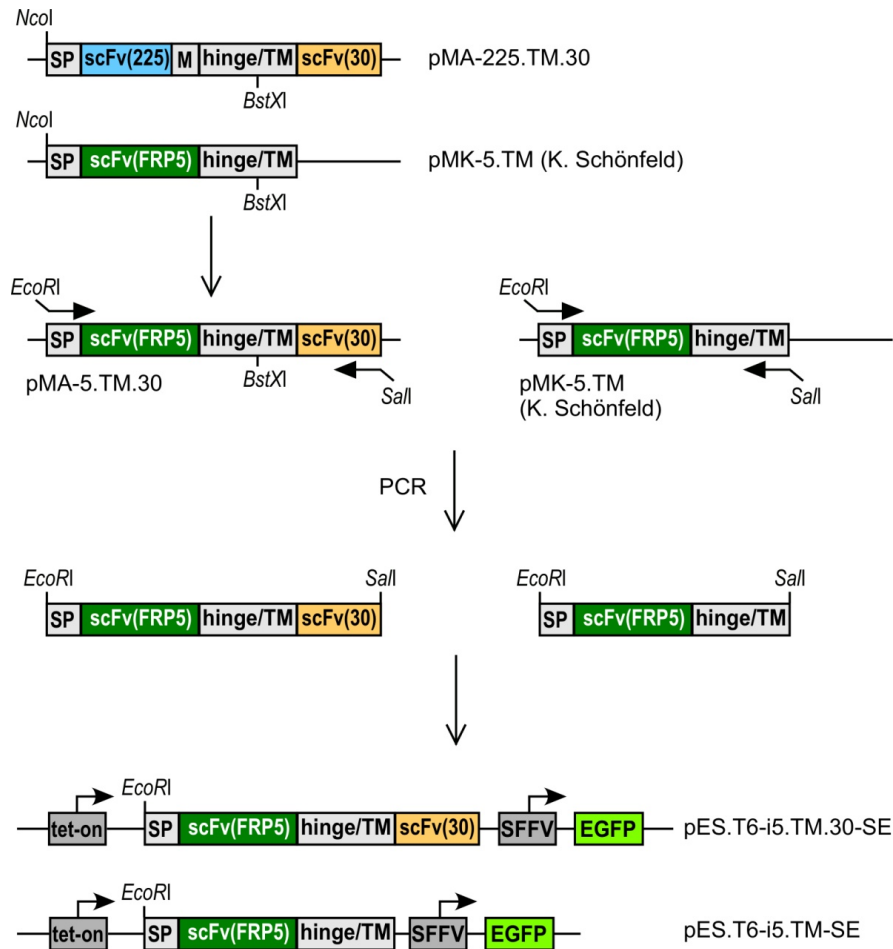


Abbildung 3.5.2 Ableitung der 5.TM.30 und 5.TM Konstrukte. Klonierungsstrategie für die Herstellung der pES.T6-i5.TM.30-SE und pES.T6-i5.TM-SE Plasmide, die für ein transmembranes ErbB2-ECD- und EGFR-ICD-bispezifisches 5.TM.30 Antikörperfragment bzw. das membranständige ErbB2-ECD-spezifische scFv(FRP5) Molekül, 5.TM, kodieren. Nähere Erläuterungen siehe Text. SP: Signalpeptid der IgG schweren Kette; scFv(FRP5): bindet an die extrazelluläre Domäne des ErbB2 Rezeptors innerhalb der AS-Sequenz 1-222; hinge/TM: CD8 α Gelenkregion (AS 117-178) und CD28 Transmembranregion (AS 151-185); scFv(30): EGFR-ICD-spezifisches scFv-Antikörperfragment.

3.5.2 Induzierte Expression von 5.TM.30 und Bindung an EGFR

Mit ES.T6-i5.TM.30-SE und ES.T6-i5.TM-SE Vektorpartikeln transduzierte, EGFP-positive Tumorzellen wurden mittels Durchflusszytometrie-basierter Zellseparation angereichert und die Expression der transmembranen Antikörperfragmente wurde nach 72 h Dox-Induktion (0 oder 250 ng/ml) analysiert. Da 5.TM.30 und 5.TM keinen Myc-tag tragen, erfolgte der Nachweis der 5.TM.30- und 5.TM-Oberflächenexpression in FACS-Analysen mittels eines rekombinanten ErbB2-Fc Fusionsproteins, das von scFv(FRP5) gebunden wird, gefolgt von einem APC-gekoppelten Fc-spezifischen Antikörper (Abb. 3.5.3). Die Expression der Antikörperfragmente wurde zudem in Immunoblot-Analysen mit FRP5- und CD8 α -spezifischen Antikörpern bestätigt (Daten nicht gezeigt).

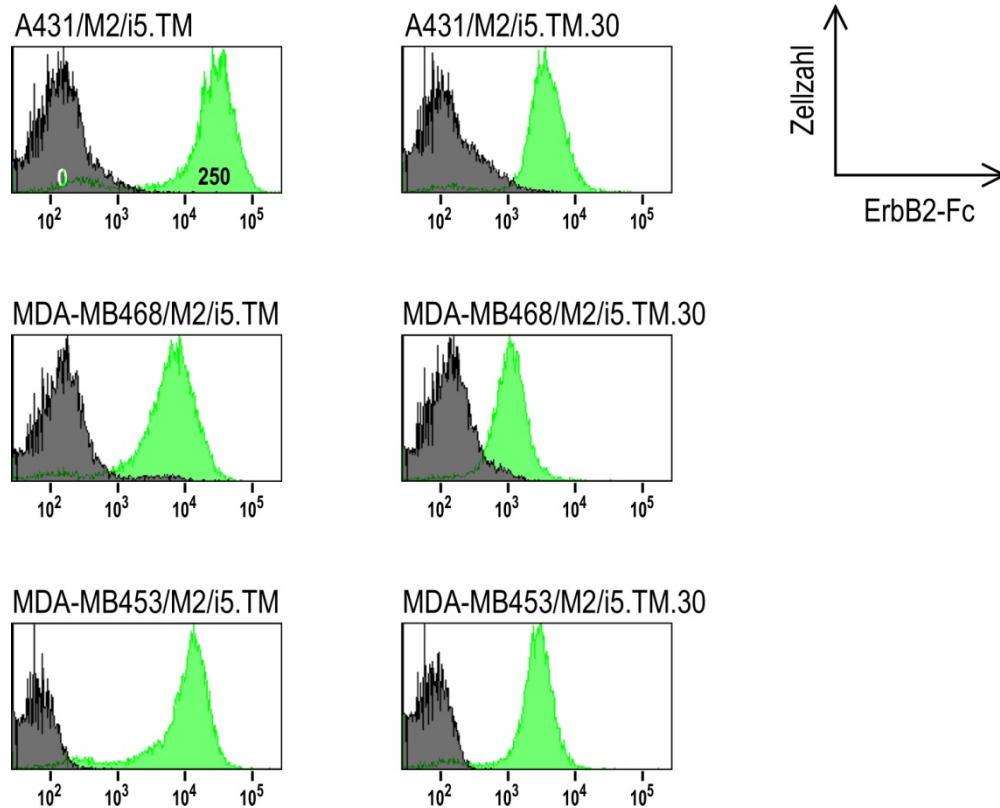


Abbildung 3.5.3 Nachweis der induzierten Oberflächenexpression der 5.TM und 5.TM.30 Proteine. Mit transmembranen Antikörperkonstrukten transduzierte A431/M2 (oben), MDA-MB468/M2 (Mitte) und MDA-MB453/M2 (unten) Zellen wurden für 72 h mit 0 (grau) bzw. 250 (grün) ng/ml Dox kultiviert. Anschließend erfolgte der Nachweis der 5.TM bzw. 5.TM.30 Expression in FACS-Experimenten mit rekombinantem ErbB2-Fc Fusionsprotein und APC-gekoppeltem Zweitantikörper.

Die Dox-induzierte Expression der 5.TM.30 und 5.TM Antikörperfragmente wurde auf allen EGFR- und/oder ErbB2-positiven Zelllinien nachgewiesen (Abb. 3.5.3). Während auf den ErbB2-positiven A431/M2 und MDA-MB453/M2 eine etwa gleiche Oberflächenexpression der transmembranen Antikörperfragmente detektiert wurde (Abb. 3.5.3, oben und unten), war die 5.TM und 5.TM.30 Proteinmenge an der Oberfläche der ErbB2-negativen MDA-MB468/M2 Zellen etwas geringer (Abb. 3.5.3, Mitte). Dies legt nahe, dass ErbB2, ähnlich wie EGFR im Fall der 225.TM und 225.TM.30 Proteine, die 5.TM.30 und 5.TM Moleküle an der Zelloberfläche stabilisiert. Weiterhin wurde auf allen Zellen eine geringere Menge an 5.TM.30 verglichen mit 5.TM nachgewiesen. Durch die Nutzung des ErbB2-Fc Fusionsproteins wurde in diesem Experiment zudem die Bindungsaktivität der scFv(FRP5) Domäne der transmembranen Antikörperfragmente bestätigt.

Im nächsten Schritt wurde in Co-IP Studien mit A431/M2/i5.TM.30 und MDA-MB468/M2/i5.TM.30 Zellen die Bindung des bispezifischen 5.TM.30 Moleküls an EGFR untersucht. Die Zellen wurden für 72 h mit 0 oder 250 ng/ml Dox kultiviert, Co-IP Lysate hergestellt und EGFR mit an magnetische *beads* gekoppeltem EGFR-spezifischem Antikörper präzipitiert. Das Präzipitat wurde von den *beads* eluiert und das Eluat in

Immunoblot-Analysen mit CD8 α - und EGFR-spezifischen Antikörpern untersucht (Abb. 3.5.4).

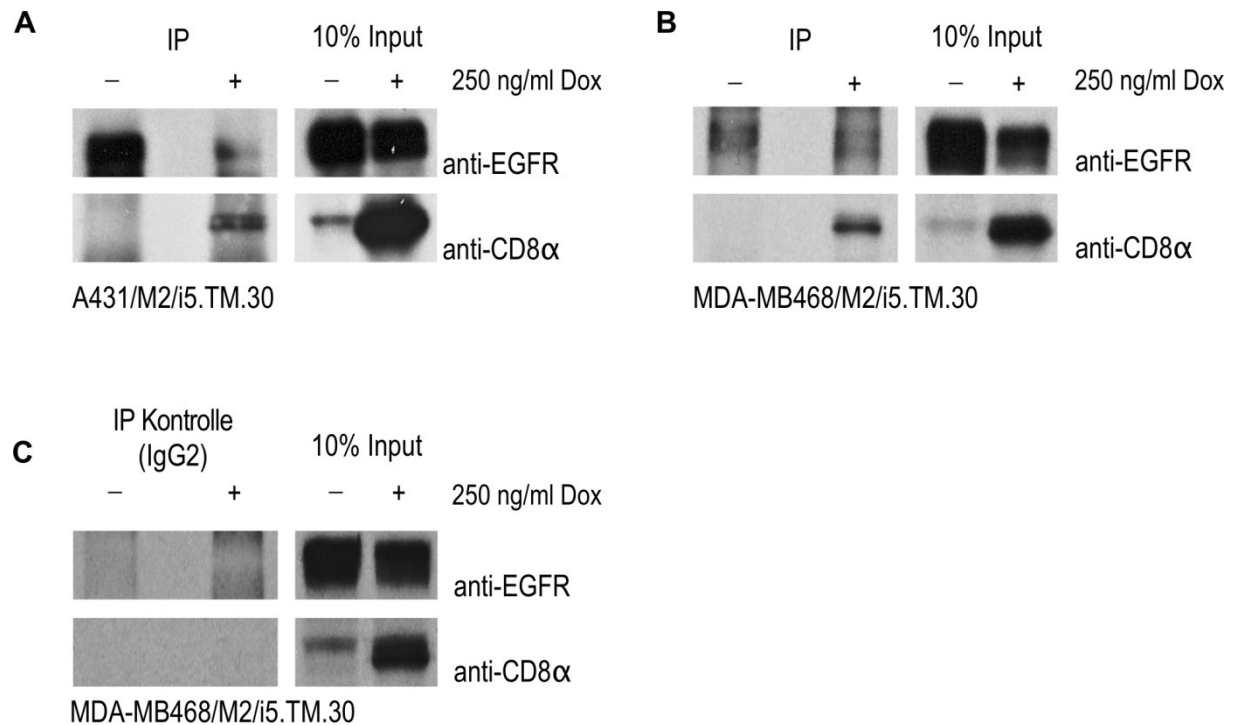


Abbildung 3.5.4 Nachweis der 5.TM.30 Bindung an EGFR in A431/M2/i5.TM.30 und MDA-MB468/M2/i5.TM.30 Zellen. Mit ES.T6-i5.TM.30 transduzierte A431/M2 (A) bzw. MDA-MB468/M2 (B)/(C) Zellen wurden für 72 h mit 0 bzw. 250 ng/ml Dox kultiviert. Anschließend wurden Gesamtzellextrakte hergestellt. (A)/(B) Die Interaktion von 5.TM.30 mit EGFR wurde in Co-Immunpräzipitationen (IP) untersucht. EGFR wurde mit einem an magnetische *beads* gekoppelten EGFR-spezifischen Antikörper präzipitiert und das Präzipitat anschließend in Immunoblot-Analysen mit EGFR- bzw. CD8 α -spezifischen Antikörpern untersucht. Als Kontrolle wurden 10% des verwendeten Gesamtzellextrakts (Input) aufgetragen. Als weitere Kontrolle wurde die Präzipitation mit einem irrelevanten IgG2 Antikörper durchgeführt (C).

Eine Co-Präzipitation des 5.TM.30 Proteins mit EGFR wurde sowohl in A431/M2/i5.TM.30 (Abb. 3.5.4A) als auch in MDA-MB468/M2/i5.TM.30 (Abb. 3.5.4B) Zellen nachgewiesen. Bei der Verwendung eines Kontroll-IgG zur Präzipitation war dagegen kein EGFR oder 5.TM.30 Protein im Präzipitat vorhanden (Abb. 3.5.4C). In vergleichbaren Experimenten mit A431/M2/i5.TM und MDA-MB468/M2/i5.TM Zellen wurde keine Bindung des 5.TM Moleküls an EGFR nachgewiesen (Daten nicht gezeigt). Dies zeigt eine spezifische Bindung des 5.TM.30 Proteins an EGFR vermittelt durch das scFv(30) Antikörperfragment.

Somit wurde eine Bindung der scFv(FRP5) und scFv(30) Domänen im 5.TM.30 Antikörperfragment an die jeweiligen Zielantigene bestätigt.

3.5.3 Einfluss von 5.TM.30 auf die Expression von EGFR und ErbB2

In den nachfolgenden Experimenten wurde der mögliche Einfluss der induzierten Expression von 5.TM.30 und 5.TM auf die Oberflächen- und Gesamtexpression von ErbB2 und EGFR

untersucht. Dazu wurden parentale oder mit Antikörperkonstrukten transduzierte A431/M2, MDA-MB453/M2 und MDA-MB468/M2 Tumorzellen für 72 h in Anwesenheit von 0 oder 250 ng/ml Dox kultiviert und anschließend entweder Immunoblot- oder FACS-Analysen mit ErbB2- bzw. EGFR-spezifischen Antikörpern durchgeführt (Abb. 3.5.5). Für die Detektion von ErbB2 an der Zelloberfläche wurde der Antikörper Herceptin verwendet, der ein extrazelluläres Epitop nahe der Transmembrandomäne von ErbB2 bindet und nicht mit FRP5 kompetiert (Cho *et al.*, 2003).

Während die induzierte Expression von 5.TM.30 in einer signifikant verringerten ErbB2-Oberflächenexpression (Reduktion von ~30%) in MDA-MB453/M2 Zellen resultierte, war die Menge von ErbB2 an der Zelloberfläche nach induzierter Expression von 5.TM geringfügig erhöht (~20%) (Abb. 3.5.5C). Auch die Gesamtmenge an ErbB2 Protein in MDA-MB453/M2/i5.TM.30 Zellen, untersucht in Immunoblots, war nach Dox-Induktion eindeutig verringert (Abb. 3.5.5B, rechts). Dieser Effekt war 5.TM.30- und nicht Dox-spezifisch, da in Anwesenheit von Dox kultivierte parentale MDA-MB453/M2 Zellen keine Veränderung der ErbB2-Expression zeigten (Abb. 3.5.5B, links).

Ebenso resultierte die induzierte Expression von 5.TM.30 in A431/M2 Zellen in einer deutlichen und von 5.TM in einer geringen Reduktion des ErbB2-Gesamtproteins (Abb. 3.5.5A, rechts und Mitte). Allerdings wurde bereits in Dox-induzierten parentalen A431/M2 Zellen eine leicht verringerte ErbB2-Gesamtproteinmenge detektiert (Abb. 3.5.5A, links), so dass die geringe Reduktion der ErbB2-Mengen in induzierten A431/M2/i5.TM Zellen wahrscheinlich ebenfalls durch Dox ausgelöst wurde.

Zusammengenommen resultierte die induzierte Expression von 5.TM.30 in ErbB2-positiven Tumorzellen in einer verringerten ErbB2-Gesamt- und -Oberflächenexpression.

Weiterhin wurde in Immunoblots von induzierten A431/M2/i5.TM.30 Zellen eine eindeutige und von induzierten A431/M2/i5.TM Zellen eine minimale Reduktion der Gesamt-EGFR Mengen detektiert (Abb. 3.5.5E, rechts und Mitte). Eine ähnlich geringfügige Verringerung der EGFR-Expression wurde auch in induzierten MDA-MB468/M2/i5.TM.30 Zellen beobachtet (Abb. 3.5.5E, links). Die EGFR-Oberflächenexpression, untersucht in FACS-Analysen, veränderte sich dagegen weder in parentalen noch in i5.TM.30-transduzierten A431/M2 und MDA-MB468/M2 Zellen nach Dox Induktion (Abb. 3.5.5D).

Aus all diesen Experimenten könnte auf eine 5.TM.30-induzierte Degradation von ErbB2 und EGFR geschlossen werden.

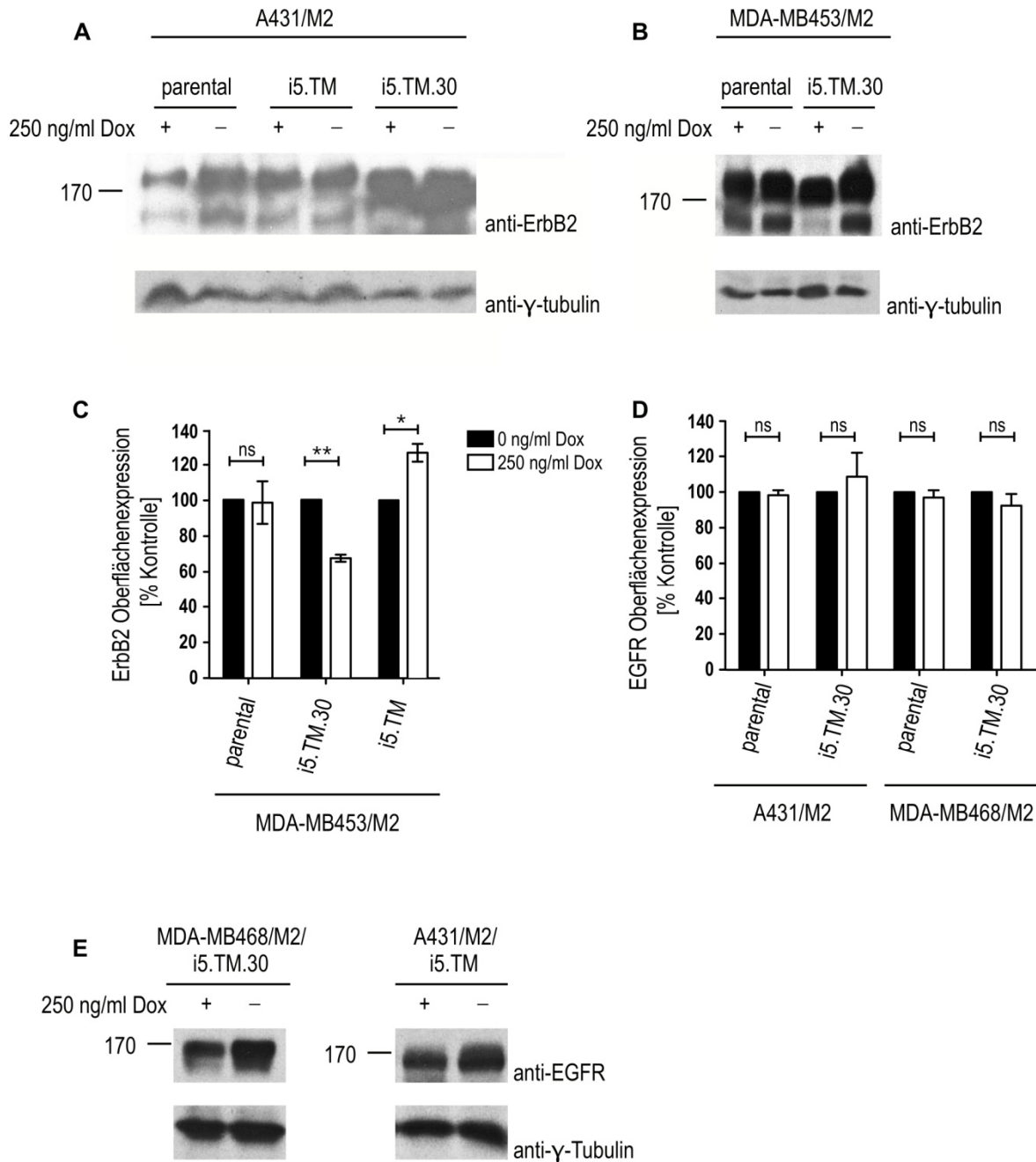


Abbildung 3.5.5 Analyse der EGFR- und ErbB2-Expression in Tumorzellen nach induzierter Expression der Antikörperfragmente 5.TM und 5.TM.30. Parentale, i5.TM oder i5.TM.30 transduzierte A431/M2 (A)/(D)/(E), MDA-MB468/M2 (D)/(E) bzw. MDA-MB453/M2 (B)/(C) Zellen wurden für 72 h mit 0 (schwarz) bzw. 250 (weiß) ng/ml Dox kultiviert. Anschließend wurden entweder Gesamtzellextrakte hergestellt oder die Zellen in FACS-Experimenten untersucht. **(A)/(B)** Immunoblot-Analyse der A431/M2 (A) bzw. MDA-MB453/M2 (B) Gesamtzellextrakte mit einem ErbB2-spezifischen Antikörper. **(C)/(D)** Analyse der ErbB2- (C) bzw. EGFR-Oberflächenexpression (D) in MDA-MB453/M2 (C) bzw. A431/M2 und MDA-MB468/M2 Zellen (D) in FACS-Analysen. ns: nicht signifikant; *: $p < 0.05$; **: $p < 0.01$. **(E)** Immunoblot-Analyse der MDA-MB468/M2/i5.TM.30, A431/M2/i5.TM und A431/M2/i5.TM.30 Gesamtzellextrakte mit einem EGFR-spezifischen Antikörper. γ -Tubulin diene als Ladekontrolle (A)/(B)/(E).

3.5.4 Einfluss der Expression von 5.TM und 5.TM.30 auf das Wachstum EGFR- und ErbB2-positiver Zellen

Im nächsten Schritt wurde untersucht, ob die Expression der 5.TM oder 5.TM.30 Proteine zu einem veränderten Wachstum von A431/M2, MDA-MB468/M2 und MDA-MB453/M2 Zellen führt. Dazu wurden wie in den Abschnitten 2.2.22 und 3.4.5 beschrieben MTT-Metabolisierungsassays in Anwesenheit steigender Dox-Konzentrationen durchgeführt (Abb. 3.5.6).

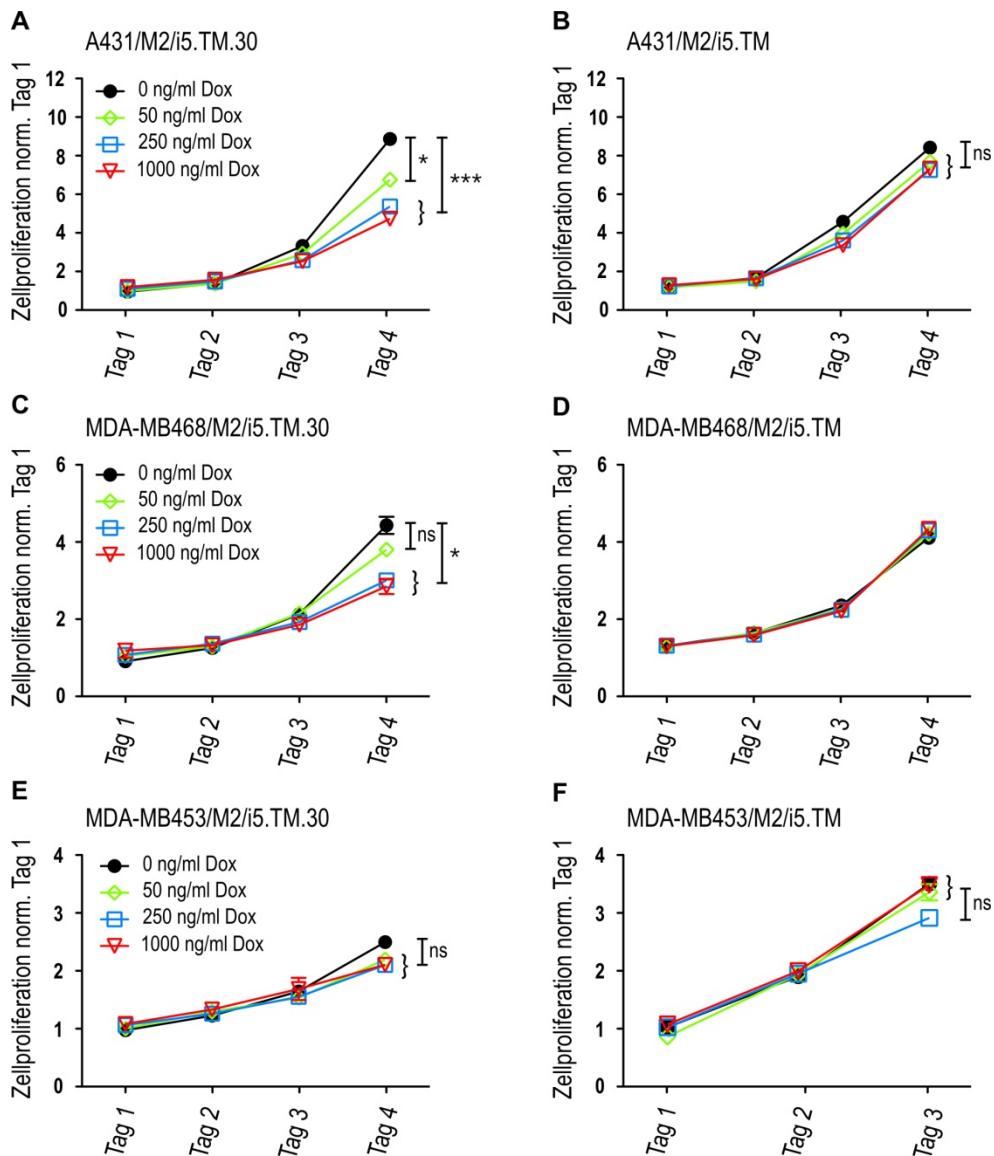


Abbildung 3.5.6 Proliferation von Tumorzellen nach Induktion der Expression transmembraner Antikörperfragmente. Mit i5.TM.30 ((A)/(C)/(E)) und i5.TM ((B)/(D)/(F)) Antikörperkonstrukten transduzierte A431/M2 ((A)/(B)), MDA-MB468/M2 ((C)/(D)) und MDA-MB453/M2 ((E)/(F)) Zellen wurden in gleichen Zellzahlen in Triplikaten in 96-well Platten ausgesät und mit 0 (schwarze Kreise), 50 (grüne Rauten), 250 (blaue Quadrate) oder 1000 (rote Dreiecke) ng/ml Dox kultiviert. Nach 24, 48, 72 und 96 h (Tag 1 bis Tag 4) wurde die Proliferation mit Hilfe eines MTT-Metabolisierungsassays untersucht. Die Mittelwerte normalisiert auf den Wert der nicht induzierten Zellen (0 ng/ml Dox) an Tag 1 \pm SEM sind dargestellt. ns: nicht signifikant; *: $p < 0,05$; ***: $p < 0,001$.

Die Expression des 5.TM Proteins zeigte in keiner der untersuchten Zelllinien einen Einfluss auf die Proliferation (Abb. 3.5.6B/D/F). Interessanterweise war nur das Wachstum der EGFR-positiven A431/M2 und MDA-MB468/M2 Zellen nach Expression des 5.TM.30 Proteins signifikant inhibiert, während MDA-MB453/M2/i5.TM.30 Zellen keine signifikante, Wachstumsreduktion in Anwesenheit von Dox zeigten (Abb. 3.5.6A/C/E). Zur weiteren Abklärung der Antikörper-vermittelten Effekte auf das Zellwachstum wurden Langzeitassays (Kristallviolett-Assays) in Anwesenheit steigender Dox-Konzentrationen, wie in den Abschnitten 2.2.23 und 3.4.5 beschrieben, durchgeführt (Abb. 3.5.7).

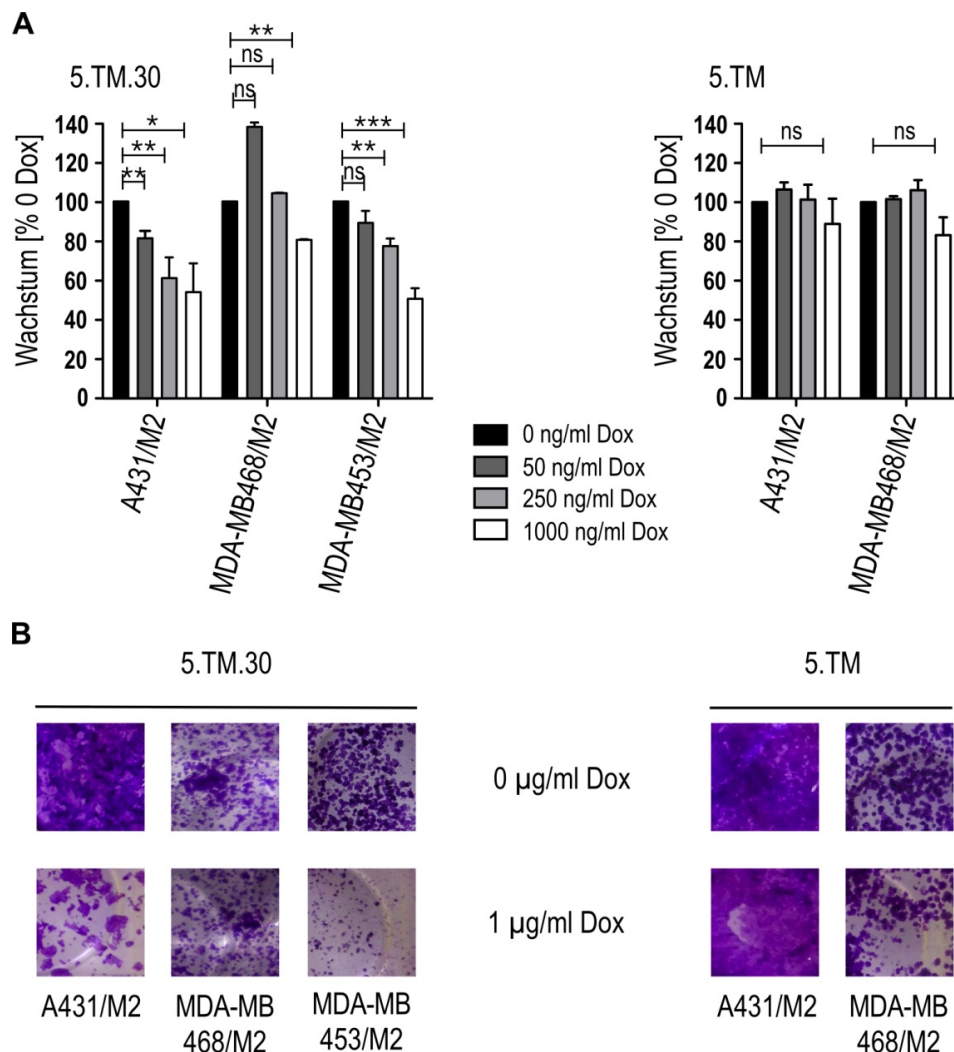


Abbildung 3.5.7 Langzeitwachstum von Tumorzellen nach Induktion der Expression von 5.TM.30 und 5.TM. (A) Mit i5.TM.30 (links) und i5.TM (rechts) Antikörperkonstrukten transduzierte A431/M2, MDA-MB468/M2 und MDA-MB453/M2 Zellen wurden in gleichen Zellzahlen in Triplikaten in 24-well Platten ausgesät und mit 0 (schwarz), 50 (dunkelgrau), 250 (hellgrau) oder 1000 (weiß) ng/ml Dox für 7-14 Tage kultiviert. Das Medium wurde zweimal wöchentlich gewechselt. Am Ende der Testperiode wurden die Zellen fixiert und das Zellwachstum wurde in einem Kristallviolett-Assay untersucht. Die Mittelwerte normalisiert auf den Wert der nicht induzierten Zellen (0 ng/ml Dox) wurden aufgetragen. ns: nicht signifikant; *: $p < 0,05$; **: $p < 0,01$; ***: $p < 0,001$. (B) Repräsentative Bilder der Kristallviolett-gefärbten Zellen aus (A).

Auch in Langzeitexperimenten wurde kein Einfluss des ErbB2-spezifischen 5.TM Proteins auf das Wachstum EGFR-exprimierender Zellen beobachtet (Abb. 3.5.7A, rechts). Die leichte Reduktion des Wachstums von MDA-MB468/M2/i5.TM Zellen in Anwesenheit von 1000 ng/ml Dox wurde auch für parentale MDA-MB468/M2 Zellen detektiert (vgl. Abb. 3.4.9B). ErbB2-überexprimierende MDA-MB453/M2/i5.TM Zellen wurden aufgrund von Kontamination der Zellen nicht näher untersucht. Die induzierte Expression des 5.TM.30 Proteins in EGFR/ErbB2-positiven A431/M2 und ErbB2-positiven MDA-MB453/M2 Zellen reduzierte das Wachstum auf die Hälfte nicht induzierter Zellen (Abb. 3.5.7A, links). Das Wachstum von EGFR-positiven MDA-MB468/M2/i5.TM.30 Zellen wurde zu 20% inhibiert. Daraus kann geschlossen werden, dass das 5.TM.30 Protein sowohl einen Effekt auf das Langzeitwachstum EGFR- als auch ErbB2-exprimierender Tumorzellen hat. Dabei war die i5.TM.30-vermittelte Wachstumsinhibition von ErbB2-exprimierenden A431/M2 und MDA-MB453/M2 Zellen in Langzeitstudien deutlich stärker ausgeprägt als die von ErbB2-negativen, aber EGFR-exprimierenden MDA-MB468/M2 Zellen.

Um herauszufinden, ob das reduzierte Wachstum der 5.TM.30-exprimierenden Zellen auf eine erhöhte Apoptoserate zurückzuführen ist, wurde die 5.TM.30 oder 5.TM Expression in A431/M2, MDA-MB468/M2 und MDA-MB453/M2 Zellen durch 250 ng/ml Dox induziert und der Anteil Annexin V-positiver Zellen im Vergleich mit nicht induzierten Zellen untersucht (Abb. 3.5.8).

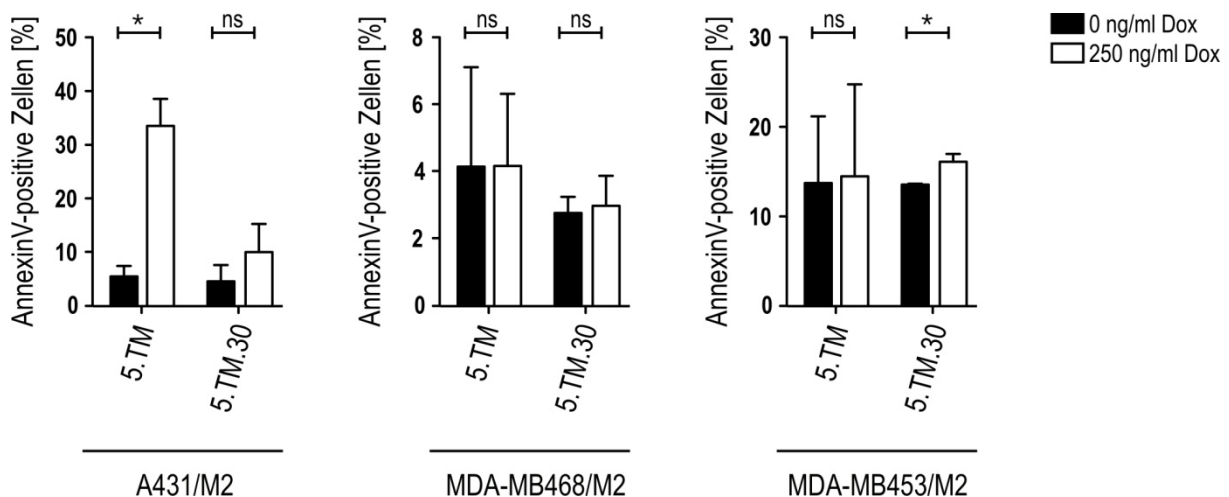


Abbildung 3.5.8 Untersuchung des Anteils apoptotischer Zellen nach Induktion der 5.TM.30 und 5.TM Proteinexpression. Mit i5.TM.30 und i5.TM Antikörperkonstrukten transduzierte A431/M2 (links), MDA-MB468/M2 (Mitte) und MDA-MB453/M2 (rechts) Zellen wurden für 72 h mit 0 (schwarz) oder 250 (weiß) ng/ml Dox inkubiert und anschließend der Anteil apoptotischer, Annexin V-positiver Zellen mittels FACS-Analyse bestimmt. Die Mittelwerte \pm SEM aus drei unabhängigen Experimenten sind dargestellt. ns: nicht signifikant; *: $p < 0,05$.

MDA-MB468/M2 Zellen wiesen weder nach 5.TM noch nach 5.TM.30 Expression eine erhöhte Apoptoserate auf (Abb. 3.5.8, Mitte). Das Gleiche galt für MDA-MB453/M2/i5.TM

Zellen (Abb. 3.5.8, rechts). Die induzierte Expression von 5.TM.30 Protein in ErbB2-positiven MDA-MB453/M2 und A431/M2 Zellen führte zu einer leichten Erhöhung des Anteils apoptotischer Zellen, die allerdings in A431/M2 Zellen nicht statistisch signifikant war (Abb. 3.5.8, links/rechts). Überraschenderweise zeigten A431/M2/i5.TM Zellen in Anwesenheit von Dox einen 5-fach erhöhten Anteil apoptotischer Zellen, obwohl insgesamt kein reduziertes Wachstum dieser Zellen beobachtet werden konnte (vgl. Abb. 3.5.6/7). Dieser Anstieg des Anteils apoptotischer Zellen kann nicht durch die Inkubation mit Dox ausgelöst sein, wie für parentale A431/M2 Zellen gezeigt (vgl. Abb. 3.4.11A). Allerdings wurde in FACS-Analysen von A431/M2/i5.TM Zellen nach Inkubation mit steigenden Dox-Konzentrationen eine Dox-abhängige Reduktion (bis 30% bei 1000 ng/ml Dox; Daten nicht gezeigt) des Anteils EGFP-positiver Zellen in der Kultur detektiert. Die Durchflusszytometrie-basierte Zellseparation EGFP-positiver A431/M2/i5.TM Zellen resultierte in einer etwa 92% EGFP-positiven Zellpopulation. Eventuell können nach Induktion der 5.TM Expression die in der Kultur vorhandenen parentalen A431/M2 Zellen schneller wachsen, so dass in den Proliferationsassays kein Unterschied des Wachstums verglichen mit nicht induzierten Zellen detektiert wird, obwohl mit i5.TM Antikörperkonstrukten transduzierte Zellen z.T. in Apoptose gehen.

3.5.5 Lokalisierung von 5.TM.30 und EGFR in Tumorzellen

Im Folgenden wurde die Lokalisation der 5.TM und 5.TM.30 Proteine in EGFR-positiven MDA-MB468/M2 und ErbB2-positiven MDA-MB453/M2 Zellen in CLSM Experimenten untersucht. Die Zellen wurden für 72 h in Anwesenheit von 0 oder 1000 ng/ml Dox auf Deckgläschen kultiviert, fixiert und permeabilisiert. Die Färbung erfolgte für EGFR-negative MDA-MB453/M2 Zellen mit CD8 α -spezifischem Antikörper gefolgt von AF546-gekoppeltem Zweitantikörper (Abb. 3.5.9A). MDA-MB468/M2 Zellen wurden zusätzlich mit einem AF647-gekoppelten EGFR-spezifischen Antikörper gefärbt (Abb. 3.5.9B).

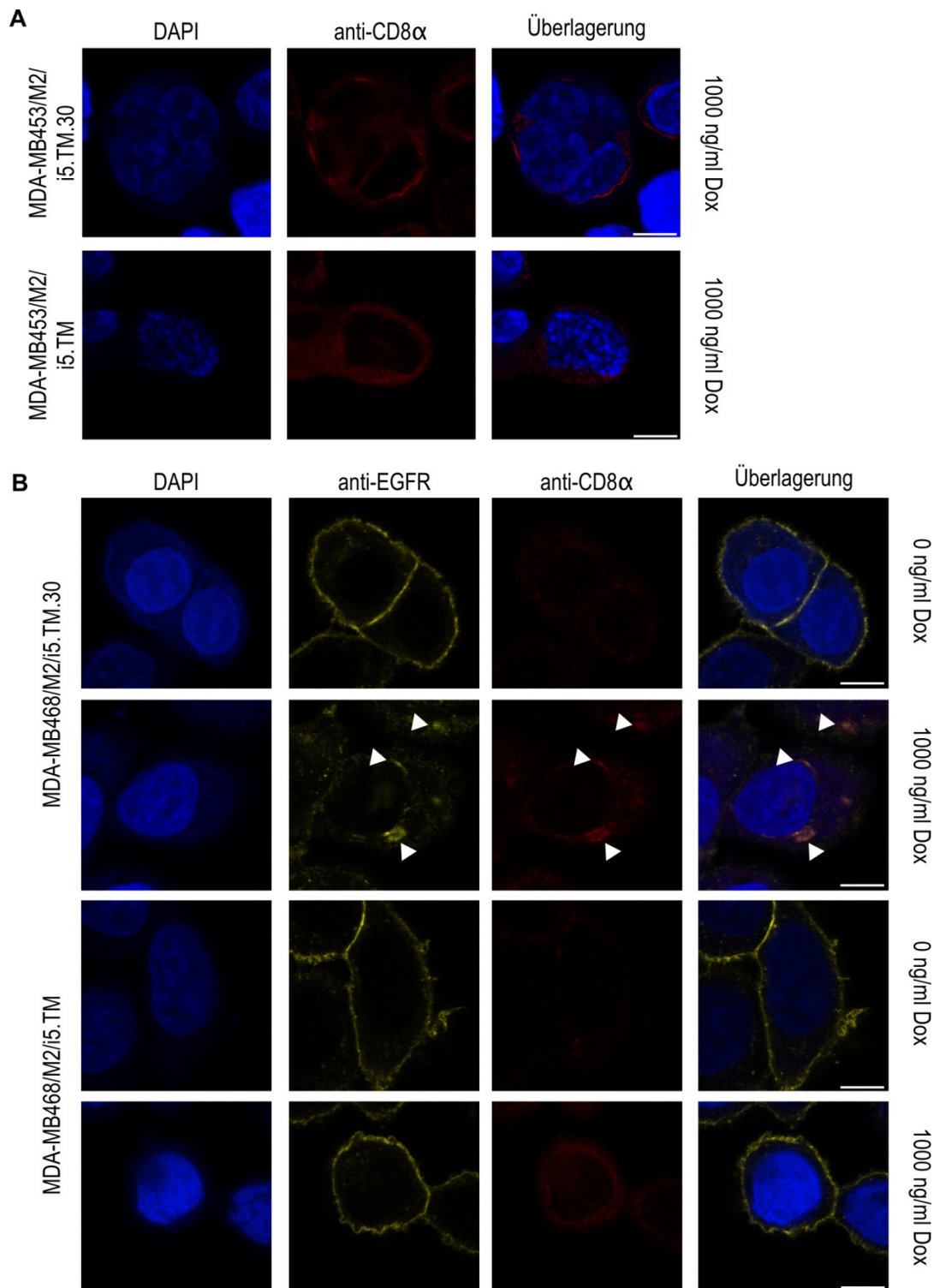


Abbildung 3.5.9 Intrazelluläre Lokalisation der 5.TM.30 oder 5.TM Moleküle. Mit transmembranen Antikörperperfragmentkonstrukten transduzierte MDA-MB453/M2 (**A**) oder MDA-MB468/M2 (**B**) Zellen wurden auf Deckgläschen ausgesät und für 72 h mit 0 oder 1000 ng/ml Dox kultiviert. Anschließend wurden die Zellen fixiert, permeabilisiert und mit den angegebenen Antikörpern gefärbt. (**A**) Färbung mit CD8 α -spezifischem Antikörper und AF546-gekoppeltem Zweitantikörper (rot). Nur die mit 1000 ng/ml Dox induzierten Proben sind gezeigt. (**B**) Zusätzlich zu CD8 α wurde hier auch mit einem AF647-gekoppelten EGFR-spezifischen Antikörper (gelb) gefärbt. DAPI (blau) diente zur Visualisierung der Zellkerne. Die Überlagerung der AF546-, AF647- und DAPI-Kanäle diente der Untersuchung einer möglichen Co-Lokalisierung (weiße Pfeile) einzelner Signale. Einzelebenen eines z-Stapels sind gezeigt. (Größenstandard = 7,5 μ m).

In ErbB2-positiven MDA-MB453/M2 Zellen wurde das 5.TM Protein im Zytoplasma und auf der Zelloberfläche verteilt detektiert (Abb. 3.5.9A, unten), während das 5.TM.30 Protein auf der Zelloberfläche vorlag (Abb. 3.5.9A, oben). Dies bestätigt die in FACS-Experimenten gezeigte Oberflächenexpression der transmembranen Antikörperfragmente.

Auch in EGFR-positiven MDA-MB468/M2 Zellen lagen 5.TM und 5.TM.30 im Zytoplasma sowie an der Zelloberfläche vor; zudem wurde das 5.TM.30 Protein in perinukleären Kompartimenten detektiert (Abb. 3.5.9B, rot). Während nach induzierter Expression von 5.TM.30 EGFR (gelb) mit diesem Protein in perinukleären Kompartimenten co-lokalisierte (weiße Pfeile), wurde nach induzierter Expression von 5.TM EGFR ausschließlich an der Zelloberfläche detektiert (Abb. 3.5.9B). Die im Vergleich zu nicht induzierten Zellen reduzierte EGFR-Oberflächenexpression in induzierten MDA-MB468/M2/i5.TM.30 Zellen war in vorherigen FACS-Experimenten (vgl. Abb. 3.5.5D) nicht beobachtet worden. Bei dem perinukleären Kompartiment, in dem EGFR und 5.TM.30 gemeinsam detektiert wurden, handelt es sich wahrscheinlich, wie für 225.TM.30- und TM.30-exprimierende MDA-MB468/M2 Zellen gezeigt (Abb. 3.4.15), um das ER.

Nachfolgend wurde untersucht, ob die induzierte Expression von 5.TM.30, wie zuvor für 225.TM.30 und TM.30 beobachtet (Abb. 3.4.16), eine ER-Stress-Antwort der Tumorzellen auslösen kann. Hierzu wurde das Expressionsniveau von PDI und BIP Proteinen analysiert (Abb. 3.5.10).

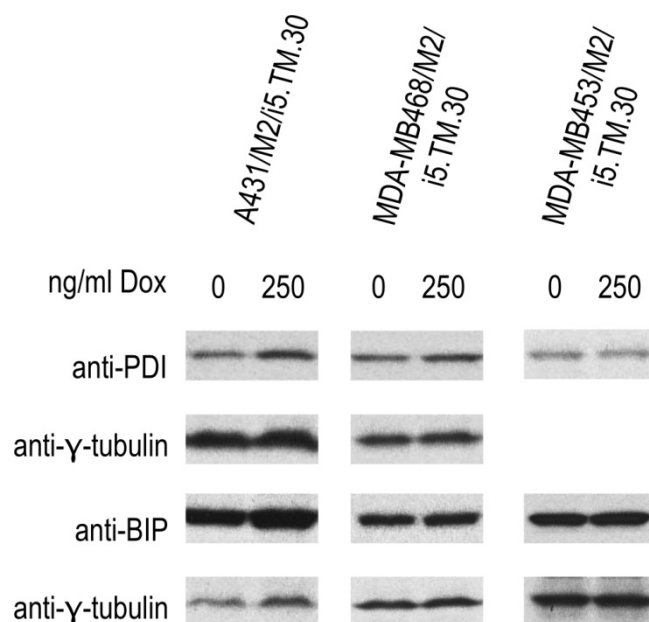


Abbildung 3.5.10 ER-Stress-Analyse in 5.TM.30-exprimierenden Tumorzellen. Mit i5.TM.30 Konstrukten transduzierte A431/M2 (links), MDA-MB468/M2 (Mitte) und MDA-MB453/M2 (rechts) Zellen wurden für 72 h mit 0 oder 250 ng/ml Dox inkubiert, Gesamtzelllysate hergestellt und diese mittels SDS-PAGE aufgetrennt und auf eine Membran übertragen. Die ER-Stress-Proteine PDI und BIP wurden in Immunoblot-Analysen mit entsprechenden Antikörpern untersucht. γ -Tubulin diente als Ladekontrolle.

Tatsächlich wurde in 5.TM.30-exprimierenden A431/M2 Zellen eine deutliche Erhöhung der PDI Proteinmenge festgestellt (Abb. 3.5.10, links). Für die entsprechenden MDA-MB468/M2 Zellen wurde dagegen nur ein geringfügig erhöhtes PDI Signal detektiert (Abb. 3.5.10, Mitte). Induzierte MDA-MB453/M2/5.TM.30 Zellen zeigten keinen relevanten Unterschied zu nicht induzierten Zellen in der PDI oder BIP Expression (Abb. 3.5.10, rechts). Das erhöhte PDI-Expressionsniveau in A431/M2/i5.TM.30 und MDA-MB468/M2/i5.TM.30 Zellen weist darauf hin, dass ER-Stress eine mögliche Ursache für das reduzierte Wachstum induzierter Zellen sein könnte (vgl. Abb. 3.5.6/7).

3.5.6 Zusammenfassung der Abschnitte 3.5.1-3.5.5

In diesem Teil der Arbeit wurde ein ErbB2- und EGFR-bispezifisches transmembranes Antikörperfragment (5.TM.30) generiert. Das 5.TM.30 Protein sowie ein 5.TM Kontrollprotein wurden in FACS-Experimenten auf der Oberfläche EGFR- bzw. ErbB2-positiver Zellen nachgewiesen (Abb. 3.5.3). Weiterhin wurde die Bindungsaktivität von beiden, im 5.TM.30 Molekül enthaltenen, scFv-Domänen bestätigt: scFv(FRP5) band an rekombinantes ErbB2-Fc Fusionsprotein (Abb. 3.5.3) und scFv(30) band, wie in Co-IP Studien gezeigt, an EGFR (Abb. 3.5.4). Die induzierte Expression von 5.TM.30 in A431/M2 und MDA-MB468/M2 Zellen resultierte zwar in einer geringfügigen Reduktion der Gesamt-EGFR Mengen, aber nicht in einer veränderten EGFR-Oberflächenexpression (Abb. 3.5.5D/E). Weiterhin führte die Expression von 5.TM.30 in ErbB2-positiven Zellen zu einer verringerten ErbB2-Oberflächen- und -Gesamtexpression (Abb. 3.5.5A-C). Die verringerten ErbB2-Mengen zusammen mit der in induzierten A431/M2/i5.TM.30 und MDA-MB453/M2/i5.TM.30 beobachteten erhöhten Apoptoserate (Abb. 3.5.8) sind mögliche Erklärungen für das reduzierte Wachstum dieser Zellen (Abb. 3.5.6 und 3.5.7).

Zudem resultierte die induzierte Expression von 5.TM.30 in ErbB2-negativen, aber EGFR-positiven MDA-MB468/M2 Zellen in einer Wachstumsinhibition (Abb. 3.5.6 und 3.5.7). Diese könnte durch die geringfügig verringerte EGFR-Gesamtmenge zusammen mit der Induktion von ER-Stress ausgelöst werden (Abb. 3.5.5E und 3.5.10). Letzteres steht wahrscheinlich im Zusammenhang mit der Co-Lokalisation von EGFR und 5.TM.30 im ER (Abb. 3.5.9B).

Interessanterweise wurde in induzierten A431/M2/5.TM Zellen zwar eine stark erhöhte Apoptoserate, aber keine Wachstumsinhibition der Gesamtzellpopulation beobachtet (Abb. 3.5.6-3.5.8).

4 Diskussion

Die Mitglieder der ErbB-Rezeptortyrosinkinase-Familie, v.a. EGFR und ErbB2, spielen eine wichtige Rolle bei der Regulation essentieller zellulärer Prozesse wie Proliferation, Überleben und Migration. Über- oder Fehlaktivierungen dieser Rezeptoren werden mit der Krebsentstehung in Zusammenhang gebracht (Zandi *et al.*, 2007). Aufgrund dessen stand in den letzten Jahrzehnten die Entwicklung von Therapeutika, die spezifisch mit der transformierenden Signaltransduktion von EGFR und ErbB2 interferieren, im Fokus der Wissenschaft (Burgess, 2008). Bis heute stehen zwei Klassen von ErbB-Antagonisten für eine Reihe von Indikationen als Therapeutika in der Klinik zur Verfügung. Zum einen mAk, wie Cetuximab oder Trastuzumab und zum anderen TKI, wie Erlotinib oder Gefitinib (Ciardiello und Tortora, 2008). In den vergangenen Jahren wurde zudem in präklinischen Studien gezeigt, dass der Einsatz einer Kombination aus mAk und TKI den Monotherapien überlegen sein kann (Huang *et al.*, 2004; Matar *et al.*, 2004). Neben diesen Strategien wurde experimentell nachgewiesen, dass es möglich ist, durch die Expression von scFv-Antikörperfragmenten innerhalb einer Zelle (Intrabodies) die Signaltransduktion von Proteinen wie p21 Ras, IL2-Rezeptor oder ErbB-RTKs zu inhibieren (Beerli *et al.*, 1994; Beerli *et al.*, 1996; Cochet *et al.*, 1998; Richardson *et al.*, 1998; Alvarez *et al.*, 2000; Dechant *et al.*, 2008). Auch die autokrine Sekretion eines vom mAk 225 (muriner Vorläufer von Cetuximab) abgeleiteten Intrabodies (scFv(225)) führte zu einer Hemmung der EGF-induzierten Rezeptoraktivierung (Beerli *et al.*, 1994). In vorangegangenen Studien der Arbeitsgruppe wurden zytoplasmatisch exprimierbare, EGFR-ICD-spezifische scFv-Antikörperfragmente (u.a. scFv(30)) isoliert (Hyland *et al.*, 2003). Diese hatten allerdings als lösliche zytoplasmatische Moleküle, trotz spezifischer Bindung an EGFR, keinen Einfluss auf die Rezeptorphosphorylierung oder das Wachstum EGFR-exprimierender Zellen (Hyland, 2003). Dennoch könnten solche Antikörperfragmente durch Kombination mit weiteren funktionellen Domänen und/oder Änderung ihrer intrazellulären Lokalisation zur Modulation der EGFR-Aktivität nutzbar gemacht werden.

Entsprechend war das Ziel dieser Arbeit die Untersuchung des Einflusses von bispezifischen transmembranen Antikörperfragmenten, die simultan die intrazelluläre Domäne von EGFR und die extrazelluläre Domäne von EGFR oder ErbB2 (225.TM.30 bzw. 5.TM.30) binden, auf die Rezeptorexpression und -Lokalisation, sowie die Proliferation Rezeptor-exprimierender Tumorzellen.

4.1 Bestimmung der Bindungsstelle des EGFR-spezifischen Antikörperfragments scFv(30)

Das zur Generierung bispezifischer transmembraner Antikörperfragmente genutzte scFv(30) Molekül wurde in vorangegangenen Arbeiten der Arbeitsgruppe mit einem kombinierten *Phage Display* und *Yeast Two-Hybrid Screening* aus einer scFv-Antikörperfragment-Bibliothek isoliert (Hyland *et al.*, 2003). Die Kenntnis der Bindungsstelle eines in Fusionsproteinen verwendeten Antikörperfragments ist für die Interpretation von nachfolgenden Ergebnissen von Vorteil. Daher wurde bereits in vorangegangenen Arbeiten damit begonnen, das Epitop von scFv(30) zu bestimmen (Müller, 2009). Die dazu verwendete Peptid SPOT-Technik, bei der 8-18mer Peptide auf einer Membran synthetisiert werden, stellt eine Möglichkeit dar, sowohl lineare als auch diskontinuierliche Antikörperepitope zu ermitteln (Reineke *et al.*, 2001; Frank, 2002). In der vorangegangenen Arbeit wurde die Bindungsstelle des scFv(30)-Fragments auf ein lineares Epitop innerhalb der Aminosäuresequenz 1153-1170 (FPKEAKPNGIFKGSTAEN) am C-terminalen Ende des EGFR eingegrenzt. Die Bestimmung des minimalen Epitops erfolgte über die Untersuchung N- und C-terminaler Verkürzungen dieser Sequenz im Rahmen dieser Arbeit.

Die Bindungsspezifität des dazu verwendeten rekombinanten scFv(30) Proteins, das bereits in vorangegangenen Arbeiten (Müller, 2009) bakteriell exprimiert wurde, wurde zunächst in Bindungsexperimenten mit Lysaten von EGFR-exprimierenden Tumorzellen bestätigt (Abb. 3.1.1). Hierbei wurden neben dem Signal, das die Bindung des scFv(30) an EGFR in Lysaten EGFR-positiver MDA-MB468 Zellen (bei 170 kDa) nachweist, auch zwei weitere Signale bei etwa 120 kDa und etwa 75 kDa detektiert. Da diese auch bei Lysaten der EGFR-negativen MDA-MB453 Kontrollzellen und nach alleiniger Inkubation mit Streptavidin-AP (SA-AP) beobachtet wurden, handelt es sich hierbei offensichtlich um von SA-AP gebundene Proteine, die keinen Bezug zu EGFR haben. Diese Signale könnten stattdessen die Proteine Pyruvat- (130 kDa; UniProt: P11498), Propionyl-CoA- (80 kDa; UniProt: P05165) und Methylcrotonyl-CoA-Carboxylase (80 kDa; UniProt: Q96RQ3) darstellen, da diese als prosthetische Gruppe den endogenen Streptavidin-Bindungspartner Biotin enthalten (Chaiet und Wolf, 1964).

Zur Eingrenzung des scFv(30) Epitops wurden die N- und C-terminal-verkürzten Peptide der oben genannten Sequenz synthetisiert, auf Membranen gespottet und anschließend mit dem rekombinanten scFv(30) Protein sowie StrepTactin®-HRP (ST-HRP) analysiert (Abb. 3.1.2A). Dabei zeigten das N-terminal-verkürzte Peptid GIFKGSTAEN (AS 1161-1170) und das C-terminal-verkürzte Peptid FPKEAKPNGIFKGSTAE (AS1153-1169) ähnliche Signale wie das Referenzpeptid. Für die Peptide IFKGSTAEN (AS 1162-1170), FPKEAKPNGIFKGSTA (AS 1153-1168) und FPKEAKPNGIFKGST (AS 1153-1167) wurden

ebenfalls Signale detektiert. Da diese allerdings deutlich schwächer waren als das Signal des Referenzpeptids, kann davon ausgegangen werden, dass diesen Sequenzen für die effiziente scFv-Bindung wichtige Aminosäuren fehlen. Entsprechend enthalten die Peptide mit den AS 1161-1170 und AS 1153-1169 sehr wahrscheinlich das vollständige Epitop. Um dies zu bestätigen, wurde die Überlappsequenz dieser beiden Peptide, GIFKGSTAE (AS 1161-1169), sowie ein Peptid der gleichen Aminosäurezusammensetzung aber mit veränderter Reihenfolge in ähnlichen Experimenten untersucht. Die Bindung durch das scFv(30) Protein wurde nur für das GIFKGSTAE-, aber nicht für das Kontrollpeptid nachgewiesen (Abb. 3.1.2B). Dies bestätigt die Sequenzabhängigkeit der scFv-Bindung.

Die scFv(30)-Bindestelle innerhalb des EGFR (AS 1161-1169) liegt in der linearen Sequenz weit entfernt von der Kinasedomäne (AS 688-955). Daher hat wahrscheinlich allein die Bindung des scFv(30) Moleküls an EGFR keinen Einfluss auf die Kinaseaktivität. Dies legen auch Analysen des EGFR-Phosphorylierungsgrads nach EGF-Stimulierung in scFv-Antikörperfragment-exprimierenden Zellen nahe (Hyland *et al.*, 2003). In den erwähnten Experimenten wurden allerdings die dem Antikörperepitop am nächsten gelegenen autophosphorylierbaren Tyrosine (1148 und 1173) nicht gesondert untersucht (Olayioye *et al.*, 2000). Eventuell könnte die Bindung des scFv Proteins, aufgrund der Größe des Moleküls, diese autophosphorylierbaren Tyrosine abschirmen und damit die Phosphorylierung behindern. Eine Inhibition der Tyr1148- oder Tyr1173-Phosphorylierung nach EGF-Stimulierung wurde allerdings, in während dieser Arbeit durchgeführten Experimenten, in zytosolisch scFv(30)-exprimierenden Tumorzellen nicht beobachtet (Daten nicht gezeigt).

4.2 Generierung von Tumorzellen, die EGFR-mono- und -bispezifische transmembrane Antikörperfragmente konstitutiv exprimieren

In den letzten Jahren wurde experimentell gezeigt, dass der Einsatz einer Kombination aus zwei antagonistischen EGFR-spezifischen mAk, im Vergleich zu den Monotherapien, eine effektivere Rezeptorinhibition zur Folge hat (Friedman *et al.*, 2005; Dechant *et al.*, 2008; Kamat *et al.*, 2008; Pedersen *et al.*, 2010; Spangler *et al.*, 2010). Darauf aufbauend wurden kürzlich mehrere EGFR-bispezifische Moleküle (Nanobodies, DARPins und SEED-Antikörper) beschrieben, die an unterschiedliche Epitope in der extrazellulären EGFR-Domäne (ECD) binden und ihren jeweiligen monospezifischen Varianten in der Inhibition des Wachstums maligner Zellen signifikant überlegen sind (Boersma *et al.*, 2011; Roovers *et al.*, 2011; Kelton *et al.*, 2012).

Weiterhin verstärkte die zusätzliche Gabe von TKI, wie Erlotinib oder Gefitinib die Cetuximab-vermittelte Wachstumsinhibition und Apoptoseinduktion in mehreren

Krebszelllinien (Huang *et al.*, 2004; Matar *et al.*, 2004). Daher wurde in dieser Arbeit ein neuartiges Molekül generiert, das simultan die EGFR-ECD und die EGFR-ICD (225.TM.30) bindet. Dafür wurde das EGFR-ECD-spezifische scFv(225) Antikörperfragment über eine CD8 α Gelenkregion und CD28 Transmembrandomäne mit dem EGFR-ICD-spezifischen scFv(30) Antikörperfragment verbunden (Abb. 3.2.1 und 3.2.2). Ein Signalpeptid (SP) der IgG schweren Kette wurde 5' der scFv(225) Sequenz angefügt, um den Transport des Moleküls über den sekretorischen Weg an die Zellmembran zu gewährleisten. Die Funktionalität dieses Signalpeptids wurde bereits für andere transmembrane Proteine mit extrazellulärer scFv-Domäne nachgewiesen (Uherek *et al.*, 2002; Sahm *et al.*, 2012). Das scFv(225) Antikörperfragment besitzt, wie der therapeutisch eingesetzte mAk Cetuximab, die variablen Domänen der schweren und leichten Kette des murinen mAk 225 (Goldstein *et al.*, 1995; Wels *et al.*, 1995). Es bindet an die EGFR-Ligandenbindungsdomäne III (Li *et al.*, 2005; Hartmann *et al.*, 2010). Die für die Expression in humanen Zellen kodonoptimierte Sequenz des scFv(225) mit 5' Signalpeptid und 3' Gelenkregion, Transmembrandomäne und für diese Arbeit irrelevanten Sequenzabschnitten lag bereits vor (pMK-225.TM.28z; Schönfeld, unpubliziert) und wurde zur Generierung des EGFR-bispezifischen Antikörperfragments genutzt (Abb. 3.2.2). Dazu wurden zunächst die irrelevanten intrazellulären Domänen durch scFv(30) ersetzt und das resultierende 225.TM.30 Konstrukt in das lentivirale Transferplasmid pSIEW überführt. Dieses enthält zudem, zur späteren Identifikation transduzierter Zellen, die cDNA des *EGFP* Gens unter Kontrolle einer IRES (Demaison *et al.*, 2002). Das pS-225.TM-IEW Kontrollplasmid (Genßler, unpubliziert) kodiert ein membranständiges monospezifisches scFv(225) Fragment ohne scFv(30) Domäne. Um die 225.TM.30 und 225.TM cDNAs stabil in die genomische DNA der Tumorzellen zu integrieren, wurden mit den entsprechenden pSIEW-Transferplasmiden VSV-G-pseudotypisierte lentivirale Vektorpartikel produziert (Abb. 3.2.3). Die Pseudotypisierung mit dem VSV-G Glykoprotein dient dabei der Erweiterung des Tropismus der generierten viralen Vektorpartikel auf nahezu alle Säugerzellen (Cronin *et al.*, 2005). Die Transduktion der untersuchten Tumorzelllinien (A431, MDA-MB468 und MDA-MB453) mit diesen viralen Vektorpartikeln resultierte in einem Anteil von 40-80% EGFP-positiver Zellen. Diese wurden anschließend mittels einmaliger Durchflusszytometrie-basierter Zellseparation auf über 90% angereichert, und anschließend analysiert.

Die Gesamtexpression der 225.TM und 225.TM.30 Proteine war in EGFR-positiven A431 und MDA-MB468 Zellen vergleichbar mit der in ErbB2-positiven MDA-MB453 Zellen (Abb. 3.2.4A). Die Oberflächenexpression von 225.TM und 225.TM.30 nahm jedoch von A431 über MDA-MB468 zu MDA-MB453 Zellen hin ab (Abb. 3.2.4B). Eventuell benötigen die transmembranen Antikörperfragmente die Bindung an EGFR, um stabil an der Oberfläche

gehalten zu werden. Dafür spricht, dass A431 Zellen unter den untersuchten Zelllinien tatsächlich die höchste EGFR-Oberflächendichte haben ($\sim 3 \times 10^6$ /Zelle), gefolgt von MDA-MB468 Zellen ($1,9 \times 10^6$) (Kawamoto *et al.*, 1983; Filmus *et al.*, 1985). MDA-MB453 Zellen sind EGFR-negativ (Jeschke *et al.*, 1995). Diese Verteilung ist in etwa mit der konstitutiven Oberflächenexpression der 225.TM und 225.TM.30 Proteine korrelierbar. Weiterhin war zu beobachten, dass das 225.TM Protein in deutlich höheren Mengen an der Zelloberfläche vorlag als das 225.TM.30 Protein. Dies deckt sich mit den Beobachtungen aus CLSM-Studien, dass das 225.TM.30 Protein in MDA-MB468 und A431 Zellen überwiegend im ER lokalisiert war, während 225.TM an der Zelloberfläche und im Zytosol detektiert wurde (Daten nicht gezeigt). Diese Ergebnisse wurden nachfolgend auch im induzierbaren Expressionssystem bestätigt (Abb. 3.4.2 und 3.4.13).

4.3 Einfluss der konstitutiven Expression von transmembranen

Antikörperfragmenten auf EGFR und das Wachstum von Tumorzellen

Nach der konstitutiven Expression von 225.TM Protein in EGFR-exprimierenden A431 und MDA-MB468 Zellen wurde eine 50%-ige Reduktion der EGFR-Oberflächenexpression beobachtet. A431/225.TM.30 Zellen zeigten sogar 60% und MDA-MB468/225.TM.30 75% weniger EGFR an der Zelloberfläche als Wildtypzellen (Abb. 3.2.5B). Die Bindung des murinen mAk 225, von dem scFv(225) abgeleitet wurde, an EGFR in epithelialen A431 und KB Tumorzellen führte zu einer Internalisierung des Rezeptors (Sunada *et al.*, 1986). Daher könnte die in dieser Arbeit beobachtete Reduktion der EGFR-Oberflächenexpression in transmembrane Antikörperfragmente-exprimierenden Zellen auf eine scFv(225)-vermittelte Internalisierung des Rezeptors zurückzuführen sein. Die signifikant geringere Menge an EGFR-Oberflächenmolekülen auf 225.TM.30-exprimierenden Zellen verglichen mit 225.TM-exprimierenden Zellen weist auf einen zusätzlichen oder abweichenden Mechanismus der EGFR-Oberflächenregulation des bispezifischen Antikörpermoleküls hin. Dafür spricht auch, dass in Immunoblots von MDA-MB468/225.TM.30 aber nicht MDA-MB468/225.TM Zellen ein verringertes apparentes EGFR-Molekulargewicht von etwa 130-150 kDa zu beobachten war. Dies könnte zum einen durch die reduzierte Phosphorylierung des Rezeptors erklärbar sein (Abb. 3.2.7 und 3.4.7). Zum anderen, wie bereits in anderen Arbeiten gezeigt, könnte das verringerte apparente Molekulargewicht auf eine veränderte Glykosylierung des Rezeptors zurückzuführen sein (Soderquist und Carpenter, 1984; Graus-Porta *et al.*, 1995; Cai *et al.*, 1998; Ling *et al.*, 2009). Dafür spricht auch die Lokalisierung des EGFR zusammen mit dem 225.TM.30 Protein in MDA-MB468 und A431 Zellen im ER (Abb. 3.4.13 und 3.4.15 und Daten nicht gezeigt). Ein verringertes EGFR-Molekulargewicht wurde in A431/225.TM.30 Zelllysaten allerdings nicht gefunden (Abb. 3.2.5A). Dieser anscheinend unterschiedliche

EGFR-Glykosylierungsstatus nach 225.TM.30 Expression könnte in weiterführenden Arbeiten, auch in zusätzlichen EGFR-exprimierenden Zelllinien genauer untersucht werden. Weiterhin wurde in Immunoblot-Analysen z.T. eine reduzierte Gesamt-EGFR Menge in Zellen, die konstitutiv 225.TM und 225.TM.30 exprimieren, detektiert (Abb. 3.2.7). Diese Beobachtung ist für 225.TM-exprimierende A431 und MDA-MB468 Zellen auch in dem in Abb. 3.2.5 gezeigten Experiment zu beobachten. In diesen Blots ist zwar das EGFR-Signal mit dem der Wildtypzellen vergleichbar, die Blots der γ -Tubulin-Ladekontrolle zeigen allerdings jeweils, dass deutlich mehr A431/225.TM bzw. MDA-MB468/225.TM Lysat aufgetragen wurde als Lysat von parentalen Zellen (Abb. 3.2.5). Da nachfolgend auch in induzierbar 225.TM-exprimierenden A431/M2 und MDA-MB468/M2 Zellen geringere EGFR-Gesamt mengen als in nicht induzierten Zellen detektiert wurden (Abb. 3.4.5 und 3.4.7), kann, wie für Cetuximab gezeigt (Hadari *et al.*, 2004), auf eine 225.TM-vermittelte EGFR-Degradation geschlossen werden. Weder für die konstitutive noch für die induzierbare Expression von 225.TM.30 wurde in weiteren Experimenten eine EGFR-Degradation detektiert (Abb. 3.2.5, 3.4.5 und 3.4.7).

Der mAk 225 hat eine höhere Bindungsaffinität für EGFR als dessen natürliche Liganden EGF und TGF α , und kompetiert mit deren Bindung. Außerdem löst er, im Gegensatz zu EGF die Internalisierung des Rezeptors aus ohne diesen zu aktivieren, wodurch die EGFR-Signaltransduktion gehemmt wird (Sunada *et al.*, 1986; Goldstein *et al.*, 1995). Ebenso wie von Beerli für den sekretierbaren scFv(225) Intrabody gezeigt (Beerli *et al.*, 1994), wurde in dieser Arbeit nach der Expression der 225.TM und 225.TM.30 Proteine eine deutliche Inhibition der EGF-stimulierten Phosphorylierung des EGFR nachgewiesen (Abb. 3.2.7 und 3.4.7). Die Expression dieser transmembranen Antikörperfragmente in MDA-MB468 Zellen führte dabei zu einer kompletten Inhibition der Liganden-stimulierten Phosphorylierung der untersuchten autophosphorylierbaren Tyrosine (pTyr992, 1045, 1148 und 1173) (Abb. 3.2.7, rechts) (Olayioye *et al.*, 2000). Außerdem wurde auch die Src-vermittelte Phosphorylierung des in der Aktivierungsschleife liegenden Tyr845 gehemmt (Sato *et al.*, 1995; Stover *et al.*, 1995). In A431 Zellen wurde bereits ohne Zugabe von exogenem EGF ein starkes Phosphorylierungssignal nachgewiesen, das nach EGF-Stimulierung nur gering oder gar nicht verstärkt wurde (Abb. 3.2.7, links und Abb. 3.4.7). Bereits 1980 wurde die sog. „autokrine Hypothese“ publiziert, die besagt, dass Tumorzellen EGFR durch die Produktion und Sekretion von TGF α unabhängig von endo- oder parakrinen Wachstumsfaktoren aktivieren können (Sporn und Todaro, 1980). Diese Hypothese wurde u.a. für A431 Zellen von Reiss und Kollegen bestätigt (Reiss *et al.*, 1991). Wie in der vorliegenden Arbeit gezeigt wurde auch diese autokrine Rezeptoraktivierung durch die Expression von 225.TM und 225.TM.30 Molekülen vollständig inhibiert. Nach der zusätzlichen exogenen Stimulierung mit

EGF konnte die EGFR-Autophosphorylierung in 225.TM-exprimierenden A431 Zellen komplett gehemmt werden und der EGFR-Phosphorylierungsgrad in A431/225.TM.30 Zellen erreichte nicht das Niveau von parentalen Zellen. Durch die exogene Zugabe von 50 ng/ml EGF übersteigt im letzteren Fall wahrscheinlich die Menge an vorhandenem Wachstumsfaktor im Kulturmedium die 225.TM.30-Oberflächenexpression, so dass noch eine partielle Rezeptoraktivierung möglich ist. Die, verglichen mit 225.TM.30, deutlich höhere Dichte an 225.TM Molekülen an der Zelloberfläche (Abb. 3.2.4 und 3.4.2) scheint die Wachstumsfaktoren dagegen komplett kompetieren zu können.

Die Hyperaktivierung von MAPK- und PI3K-Signaltransduktionskaskaden durch fehlregulierten EGFR induziert u.a. die starke Proliferation und Invasivität von Tumorzellen (Schlessinger, 2000; Yarden, 2001; Zandi *et al.*, 2007). Diese wurde durch die Behandlung der Zellen mit dem mAk 225 (Sato *et al.*, 1983; Fan *et al.*, 1993) oder durch die Expression des sekretierbaren scFv(225) Intrabody inhibiert (Beerli *et al.*, 1996). Sowohl nach Expression von 225.TM.30 als auch 225.TM wurde in dieser Arbeit eine verglichen mit parentalen Zellen um die Hälfte reduzierte Proliferation der EGFR-überexprimierenden A431 und MDA-MB468 Zellen detektiert (Abb. 3.2.8). Dies ist wahrscheinlich auf die transmembrane Antikörper-vermittelte Rezeptorinternalisierung und Inhibierung der Liganden-stimulierten EGFR-Aktivierung zurückzuführen. Der Proliferationsnachteil der 225.TM.30- und 225.TM-exprimierenden gegenüber parentalen Zellen wurde auch während deren kontinuierlicher Kultivierung deutlich. Die nach der Transduktion auf EGFP-Expression angereicherten Zellpools enthielten etwa 5-10% nicht transduzierte parentale Zellen, die im Verlauf der Kultivierung die transduzierten Zellen aus der Kultur verdrängten (Abb. 3.2.9).

Die Expression der transmembranen Antikörperfragmente 225.TM.30 und 225.TM in EGFR-negativen, aber ErbB2-positiven MDA-MB453 Zellen (Abb. 3.2.4) hatte weder einen Einfluss auf die ErbB2-Expression (Abb. 3.2.6), noch auf die Proliferation dieser Zellen (Abb. 3.2.8). Dies zeigt, dass die durch 225.TM.30 und 225.TM Moleküle ausgelösten Effekte auf die Rezeptor-Expression und die Proliferation von Tumorzellen EGFR-spezifisch sind.

Weiterhin zeigte sich bei der Untersuchung der EGFR-Oberflächenexpression von MDA-MB468/225.TM.30 Zellen in späten Passagen (> P9), bei Analyse der EGFP-positiven Population, eine deutliche Reduktion der oben beschriebenen Effekte (Daten nicht gezeigt). Dabei war trotz 225.TM.30-Expression, die auch in dieser Passage nachgewiesen wurde (Daten nicht gezeigt), die EGFR-Oberflächenexpression weniger reduziert als direkt nach der Transduktion. Dies lässt auf eine Resistenzentwicklung gegenüber den inhibitorischen Effekten des 225.TM.30 Proteins innerhalb der transduzierten Zellpopulation über die Zeit schließen. Aus diesem Grund und da der Anteil EGFP-positiver Zellen in kontinuierlicher

Kultur rückläufig war, wurden weitere Analysen der Effekt der transmembranen Antikörperfragmente in einem induzierbaren System vorgenommen.

4.4 Generierung von Tumorzellen zur induzierbaren Expression transmembraner Antikörperfragmente

Das Tetracyclin-induzierbare Expressionssystem ist mit über 10000 Publikationen (Stand März 2013) das am häufigsten eingesetzte induzierbare Expressionssystem (www.tetsystems.com). Seine Einsatzgebiete reichen von der Zellkultur über Protozoen und Insekten bis hin zu Pflanzen und Säugetieren (Gatz und Quail, 1988; Baron und Bujard, 2000; Meissner *et al.*, 2005; Wang *et al.*, 2005; Schonig *et al.*, 2013). Es bietet eine effektive, präzise und reversible Kontrolle der zeitlichen und quantitativen Komponenten der Genexpression. Verglichen mit anderen induzierbaren Systemen, wie Hormon-induzierbaren Systemen, erreicht das Tet-induzierbare System die höchsten maximalen Expressionslevel (Meyer-Ficca *et al.*, 2004). Da die in diesem System verwendete Promotorregion (Loew *et al.*, 2010) allerdings erst nach dem Einbau in das Wirtsgenom und dem damit einhergehenden Verlust der nicht von den LTR flankierten Plasmidrückgrat-Komponenten, keine basale, uninduzierte Expression des zu regulierenden Gens mehr zulässt, sollte das Tet-System nicht durch transiente Transfektion, sondern durch viralen Gentransfer in die Wirtszelle eingebracht werden (Gossen und Bujard, 1992; Gossen *et al.*, 1993; Paulus *et al.*, 1996; Freundlieb *et al.*, 1997). Daher wurde in dieser Arbeit ein sequentieller γ -retroviraler Gentransfer zunächst des reversen Tetracyclin-kontrollierten Transaktivators (rtTA; M2) (Urlinger *et al.*, 2000) und anschließend des zu regulierenden Gens 3' von einer optimierten tet-induzierbaren Promotorregion (T6) (Loew *et al.*, 2010) durchgeführt (siehe Abschnitte 3.3.1 und 3.3.2).

Das pES.1-2(M2N)p Plasmid kodiert für das M2 Gen, kontrolliert von einem konstitutiven humanen Phosphoglyzerinkinase 1 (hPGK) Promotor, gefolgt von einer IRES und dem *Neomycin* Resistenzgen zur Selektion. Es wurden *Gibbon Ape Leukemia Virus* (GALV)-pseudotypisierte γ -retrovirale Vektorpartikel generiert. GALV ist ein γ -Retrovirus, das den auf einer Vielzahl verschiedener Zellen exprimierten GALV Rezeptor Glvr1, einen Phosphattransporter, zum Zelleintritt nutzt (Miller und Miller, 1994). Eine Reihe von Zelllinien (A431, MDA-MB468, MDA-MB453, MDA-MB231, Cos-7 und Hela) wurden mit den M2-kodierenden Vektorpartikeln transduziert und erfolgreich transduzierte Zellen über die Neomycin-Resistenz durch die Kultivierung in G418-haltigem Medium angereichert. Zusätzlich wurde die Integration des M2 Gens in die genomische DNA der Zellen mittels PCR bestätigt (Abb. 3.3.2). Da kein Antikörper zur Detektion des M2 Proteins zur Verfügung stand, wurde dessen Expression indirekt über funktionelle Studien nachgewiesen. Dazu

wurden die M2-transduzierten Zellen mit γ -retroviralen Vektorpartikeln transduziert, die für ein EGFP-Luziferase (EGFP-Luz; Img*) Fusionsprotein, kontrolliert von dem T6-Promotor, kodieren (Loew *et al.*, 2010). Die Zellen wurden direkt nach der Transduktion mit 0 oder 500 ng/ml Doxycyclin (Dox) inkubiert, um die EGFP-Luz Expression zu aktivieren. Die Nutzung von Dox anstelle von Tetracyclin ergab sich aus der 100-fach höheren Affinität für das M2 Protein und der größeren Stabilität von Dox (Gossen *et al.*, 1995). Die basale EGFP-Luz Expression lag deutlich unter 1%, was die „Geschlossenheit“ des Systems bestätigt (Abb. 3.3.3). Der Anteil EGFP-positiver Zellen nach Dox-Induktion lag in A431/M2/Img* Zellen bei 10%, in MDA-MB468/M2/Img* Zellen bei 11% und in MDA-MB453/M2/Img* Zellen bei 28%. Da die maximale Induktion der EGFP-Luz Expression kontrolliert durch den T6-Promotor für 300 ng/ml Dox beschrieben wurde (Loew *et al.*, 2010), kann davon ausgegangen werden, dass die hier erreichten Induktionswerte maximal sind. Die niedrigen Anteile EGFP-positiver Zellen weisen daher auf eine niedrige Transduktionseffizienz des EGFP-Luz Vektors hin. Daher wurden die Zellen für weitere Analysen für 72 h mit 500 ng/ml Dox inkubiert und anschließend wurden EGFP-positive Zellen mittels einmaliger Durchflusszytometrie-basierter Zellseparation angereichert. Im MDA-MB468/M2/Img* Zellpool lagen danach nach Dox-Induktion etwa 70% EGFP-positive Zellen vor (Daten nicht gezeigt). Anhand der induzierbaren Expression des EGFP-Luz Proteins, auch in MDA-MB231/M2/Img*, Cos-7/M2/Img* und Hela/M2/Img* Zellen (Daten nicht gezeigt), kann indirekt auf die Expression des funktionalen M2 Proteins geschlossen werden. Die Analyse der maximalen Induktion der EGFP-Luz Expression wurde in dieser Arbeit exemplarisch mit MDA-MB468/M2/Img* Zellen gezeigt. Die Untersuchung der anderen M2-exprimierenden Zelllinien ergab vergleichbare Ergebnisse. Der maximale Anteil EGFP-positiver Zellen wurde nach 72-stündiger Induktion mit 1000 ng/ml Dox erreicht (Abb. 3.3.4 und 3.3.5). Dabei wurde im Bereich von 50-250 ng/ml Dox ein annähernd linearer Anstieg des Anteils EGFP-positiver Zellen beobachtet (Abb. 3.3.4). Loew und Kollegen erreichten das Expressionsmaximum in einem vergleichbaren System mit dem Img*-Konstrukt in Hela Zellen bereits bei 300 ng/ml (Loew *et al.*, 2010). Weiterhin wurde in derselben Arbeit die maximale T6-kontrollierte ErbB2-Expression in MDA-MB231.Ro Zellen erst mit 1000 ng/ml Dox induziert. Die maximale Induzierbarkeit scheint somit sowohl von der Zelllinie als auch von dem zu induzierenden Gen abzuhängen. Ein weiterer Faktor, der in Betracht gezogen werden muss, ist die Menge an rtTA Protein, die exprimiert wird (Baron und Bujard, 2000). Daher kann gefolgert werden, dass die für MDA-MB468/M2/Img* erhaltene maximale Induktion bei 1000 ng/ml für eine adäquate Etablierung des Tet-induzierbaren Systems in diesen Zellen spricht. Auch die Kinetik der induzierten EGFP-Luz Expression ist vergleichbar mit publizierten Ergebnissen (Wang *et al.*, 2001; Loew *et al.*, 2010). Bereits nach 3 h war ein schwaches EGFP-Signal in

einem geringen Teil der Zellen detektierbar (Abb. 3.3.5). Dieses stieg über 72 h hinweg kontinuierlich an. Längere Induktionszeiten wurden nicht untersucht. Die Untersuchung der Abschaltkinetik ergab, dass nach 72-stündiger Dox-Induktion und 24 h Dox-Entzug noch keine Veränderung im Anteil EGFP-positiver MDA-MB468/M2/Img* Zellen zu beobachten war (Abb. 3.3.6). Die Intensität des EGFP-Signals sank allerdings nach 24 h um etwa ein Drittel. Laut Literatur reagiert der tTA und damit auch der rtTA innerhalb von 5 min auf die Gabe oder den Entzug von Dox (Clement *et al.*, 1999). In dieser Studie wurde allerdings die Expression kurzlebiger Intron-RNAs untersucht. Um die Abschaltung der Expression von Proteinen nach Dox-Entzug zu beurteilen, müssen allerdings auch die Stabilität der vor Entzug induzierten mRNA und die Halbwertszeit des bereits exprimierten Proteins, sowie die Halbwertszeit des Induktors berücksichtigt werden. Dox hat eine Halbwertszeit von etwa 24 h (www.drugs.com) und sollte damit bei einer Untersuchung 96 h nach Dox-Gabe und 24 h nach dem Wechsel des Mediums zu Dox-freiem Medium keine Rolle mehr spielen. Die Halbwertszeit von EGFP liegt allerdings bei etwa 26 h (Li *et al.*, 1998; Corish und Tyler-Smith, 1999) und ist auch im EGFP-Luz Fusionsprotein nicht deutlich verändert (Day *et al.*, 1998). Somit ist die hier beobachtete stabile EGFP-Luz Expression 24 h nach Dox-Entzug auf die Halbwertszeit des Proteins zurückzuführen. Ein Teil des Proteins ist dabei nach 24 h bereits abgebaut, was die Reduktion der MFI erklärt. Experimente, die den vollständigen Abbau des zu untersuchenden Proteins nach Dox-Entzug voraussetzen, sollten entsprechend frühestens 48 h nach dem Mediumwechsel durchgeführt werden.

Zur maximalen Induktion der Proteinexpression wären zusammengekommen eine Inkubation mit 1000 ng/ml Dox für 72 h ideal. Aufgrund von widersprüchlichen Aussagen in der Literatur zur Toxizität von Dox im μM -Bereich wurden allerdings die Experimente zur Untersuchung von transmembranen Antikörperfragmenten standardmäßig bei 250 ng/ml Dox durchgeführt (Mayford *et al.*, 1996; Bohl *et al.*, 1997; Ermak *et al.*, 2003). Diese Konzentration ist sicher nicht toxisch für Zellen und induziert etwa 75% der maximalen Proteinmenge (Abb. 3.3.4). Nur in Wachstums- und CLSM-Studien wurde auch eine Dox-Konzentration von 1000 ng/ml eingesetzt.

4.5 Einfluss der induzierten Expression EGFR-spezifischer transmembraner Antikörperfragmente auf Tumorzellen

Zur Klonierung induzierbarer Konstrukte wurde von A. Kinner (AG Grez, Georg-Speyer-Haus) das Plasmid pES.T6-x-PGK-Puro(rev) zur Verfügung gestellt. Dieses (Abschnitt 2.1.3) enthält zur Selektion transduzierter Zellen das Puromycin-Resistenzgen unter der Kontrolle des konstitutiven PGK Promotors. Da die Selektion mittels einer Antibiotika-Resistenz zeitaufwendig und kostspielig ist, wurde die PGK-Puro(rev)-Kassette zunächst durch eine

SFFV-EGFP-Kassette zur konstitutiven Expression des EGFP Proteins, ausgetauscht. Diese erlaubt die Anreicherung transduzierter Zellen mittels Durchflusszytometrie-basierter Zellseparation. Die Analyse konstitutiv 225.TM.30- und 225.TM-exprimierender EGFR-positiver Tumorzellen ergab Hinweise auf eine unterscheidbare Rezeptor-Oberflächenregulation durch die beiden Antikörpermoleküle. Daher wurde neben Konstrukten, die eine induzierbare Expression der 225.TM und 225.TM.30 Antikörperfragmente erlauben, zusätzlich das pES.T6-iTM.30-SE Plasmid generiert. Dieses ermöglicht die induzierbare Expression und Untersuchung des monospezifischen TM.30 Moleküls, dem die scFv(225)-Domäne fehlt. Die Zelllinien A431/M2, MDA-MB468/M2 und MDA-MB453/M2 wurden mit i225.TM.30-, i225.TM- und iTM.30-kodierenden γ -retroviralen Vektorpartikeln transduziert und EGFP-positive Zellen angereichert. Die für das konstitutive System beschriebenen Beobachtungen der 225.TM.30 und 225.TM Gesamt- und Oberflächenexpression (vgl. Abschnitt 4.3) wurden im induzierbaren System bestätigt (Abb. 3.4.2). Die Detektion der 225.TM- und 225.TM.30-Oberflächenexpression mit dem Myc-tag-spezifischen Antikörper 9E10 lieferte fast ausschließlich Signale für EGFR-positive Zellen (Abb. 3.4.2A/B). Auf EGFR-negativen MDA-MB453/M2 Zellen wurde dagegen nur ein schwaches 225.TM aber kein 225.TM.30 Signal nachgewiesen (Abb. 3.4.2C). Die Zugänglichkeit des Myc-tag Epitops kann, wenn es wie im Fall der transmembranen Antikörperfragmente nicht N- oder C-terminal sondern innerhalb eines Fusionsproteins lokalisiert ist, blockiert sein. Entsprechend könnte der Myc-tag erst durch eine Konformationsänderung der 225.TM und 225.TM.30 Proteine nach der Bindung an EGFR für den Detektionsantikörper zugänglich sein. Der Nachweis der 225.TM- und 225.TM.30-Oberflächenexpression auf MDA-MB453/M2 Zellen mit einem EGFR-Fc Fusionsprotein, das von scFv(225) gebunden wird, ergab allerdings die gleichen Ergebnisse (Abb. 3.4.3), wie für den Myc-tag-spezifischen Antikörper beschrieben, so dass nicht von falsch negativen Ergebnissen ausgegangen werden kann. Das TM.30 Protein war, obwohl es in Lysaten aller Zelllinien vergleichbar nachgewiesen wurde, ausschließlich an der Oberfläche von A431/M2/iTM.30 Zellen in geringer Menge detektierbar (Abb. 3.4.2). In CLSM-Studien mit Dox-induzierten MDA-MB468/M2/iTM.30 und MDA-MB453/M2/iTM.30 Zellen wurde das TM.30 Protein vornehmlich in einem perinukleären Kompartiment, sehr wahrscheinlich dem ER, lokalisiert detektiert (Abb. 3.4.13). Da auch das 225.TM.30, aber nicht das 225.TM Protein in diesem Kompartiment nachgewiesen wurde, spielt hierfür sehr wahrscheinlich die scFv(30)-Domäne eine Rolle. Ein zytoplasmatisch exprimiertes scFv(30) Protein ohne TM-Domäne wurde in früheren Arbeiten innerhalb des Zytosols und komplexiert mit EGFR an der Innenseite der Zellmembran detektiert (Hyland *et al.*, 2003). Während die TM.30 Sequenz ein Signalpeptid für den Transport in den sekretorischen Weg enthält, wurde auch

bei entsprechender Analyse kein kryptisches ER-Retentionssignal identifiziert. Der Mechanismus, der zur Zurückhaltung des TM.30 Proteins und größtenteils auch des 225.TM.30 Proteins im ER verantwortlich ist, muss daher in weiterführenden Arbeiten noch untersucht werden. So könnte über ein Faltungsproblem der scFv(30)-Domäne durch die Verbindung mit der TM-Domäne spekuliert werden. Dieses könnte zu einer kurzfristigen ER-Retention führen, um die korrekte Faltung mit Hilfe von Chaperonen zu vollenden. Allerdings wäre dann zu postulieren, dass dieses Faltungsproblem die Bindungsfähigkeit des scFv(30) Antikörperfragments nicht negativ beeinflusst (siehe unten).

In Co-IP Experimenten mit EGFR-positiven A431/M2 und MDA-MB468/M2 Zellen wurde die Bindung aller drei induzierbar exprimierten transmembranen Antikörperfragmente an EGFR eindeutig nachgewiesen (Abb. 3.4.4). Diese Ergebnisse werden von der beobachteten Co-Lokalisation von EGFR mit 225.TM.30 und TM.30 im ER, sowie 225.TM an der Zellmembran gestützt (Abb. 3.4.13 und 3.4.15). Daraus kann klar geschlossen werden, dass sowohl das scFv(225), als auch das scFv(30) Antikörperfragment als Transmembranvarianten spezifisch an EGFR binden. Zur eindeutigen Klärung der Frage, ob beide scFv-Domänen im bispezifischen 225.TM.30 Molekül gleichzeitig aktiv sind, könnten beispielsweise Kompetitionsanalysen mit mAk 225/Cetuximab durchgeführt werden.

Ähnlich wie für das konstitutive System diskutiert, resultierte die induzierte Expression von 225.TM.30 und 225.TM Protein in einer signifikant verringerten (50-70%) EGFR-Oberflächenexpression und einer leicht reduzierten EGFR-Gesamtproteinmenge in 225.TM-exprimierenden Zellen (Abb. 3.4.5 und 3.4.7). Auch in diesen Experimenten hatte das 225.TM.30 Protein einen signifikant größeren Effekt auf die EGFR-Oberflächenexpression als 225.TM (Abb. 3.4.5A). Das verringerte apparente EGFR-Molekulargewicht wurde in induzierten MDA-MB468/M2/i225.TM.30 Zellen ebenfalls reproduziert (Abb. 3.4.5B und 3.4.7C). Eine Veränderung der EGFR-Level in iTM.30-exprimierenden Zellen wurde nicht beobachtet. Dennoch war in CLSM-Studien mit MDA-MB468/M2/iTM.30 Zellen eine klare Co-Lokalisation von EGFR und TM.30 im ER erkennbar (Abb. 3.4.13 und 3.4.15). Folglich wäre es möglich, dass das ER-retendierte TM.30 Protein, dessen scFv(30) Domäne in korrekter topologischer Orientierung des Moleküls im Zytoplasma vorliegt, neu synthetisierten EGFR zumindest teilweise im ER zurückhält.

Der Phosphorylierungsgrad des EGFR in An- und Abwesenheit von Dox und EGF wurde exemplarisch für das Phosphotyrosin 1045 untersucht. Hierbei wurden sämtliche für das konstitutive System diskutierten Ergebnisse (vgl. Abschnitt 4.3) reproduziert. Dox allein hatte in parentalen M2-exprimierenden Zellen keine Auswirkungen auf die EGFR-Phosphorylierung, woraus auf 225.TM- und 225.TM.30-spezifische Effekte in i225.TM- und i225.TM.30-exprimierenden A431/M2 und MDA-MB468/M2 Zellen geschlossen werden

kann. Die Expression von iTM.30 hatte weder einen Einfluss auf den EGFR-Phosphorylierungsgrad in A431/M2 noch in MDA-MB468/M2 Zellen. Da das TM.30 Protein weder die Internalisierung des EGFR bewirkte noch die für die Ligandenkompetition verantwortliche scFv(225)-Domäne enthält, war dieses Ergebnis nicht unerwartet. Wie im konstitutiven System resultierte die induzierte Expression der Antikörperfragmente nicht in einer veränderten ErbB2-Expression in MDA-MB453/M2 Zellen (Abb. 3.4.6). Dies bestätigt erneut die EGFR-Spezifität dieser Proteine.

Anhand der bisherigen Ergebnisse kann die unterschiedliche Funktionsweise der drei transmembranen Antikörperfragmente wie in Abbildung 4.5.1 gezeigt modellhaft zusammengefasst werden. Die Bindung von 225.TM an EGFR führt wie in dieser Arbeit gezeigt ähnlich wie der mAk 225/Cetuximab zu einer Internalisierung und teilweisen Degradation des Rezeptors. In CLSM-Studien von i225.TM-exprimierenden MDA-MB468/M2 Zellen wurde EGFR außerdem in intrazellulären Vesikeln detektiert, die Endo- oder Lysosomen entsprechen könnten (Abb. 3.4.13 und 3.4.15). Eine nähere Untersuchung dieser Kompartimente steht jedoch noch aus. Da nach 225.TM Expression eine fast vollständige Hemmung der Phosphorylierung des EGFR zu beobachten war, kompetiert 225.TM offenbar wie der parentale mAk 225/Cetuximab mit EGF um die Bindung an den Rezeptor. Die Expression von iTM.30 hat dagegen weder einen Einfluss auf die Expression noch die Phosphorylierung des EGFR. Dennoch konnten EGFR/TM.30-Komplexe im ER nachgewiesen werden. Dies spricht für eine Inhibierung des Transports des neu synthetisierten Rezeptors an die Zelloberfläche. Das 225.TM.30 Protein könnte beide Mechanismen der monospezifischen Moleküle kombinieren. So wurde nach Expression von 225.TM.30 in EGFR-exprimierenden Tumorzellen ebenso wie für 225.TM eine Rezeptorinternalisierung und Hemmung der Phosphorylierung beobachtet. Der zu 225.TM gesteigerte negative Effekt auf die EGFR-Oberflächenexpression ließe sich dadurch erklären, dass das ER-ständige 225.TM.30 Protein, wie TM.30, neu gebildeten EGFR im ER zurückhält. Da auch eine deutliche Menge an EGFR/i225.TM.30 Komplexen im ER von induzierten MDA-MB468/M2/i225.TM.30 Zellen detektiert wurde, erscheint diese Hypothese schlüssig.

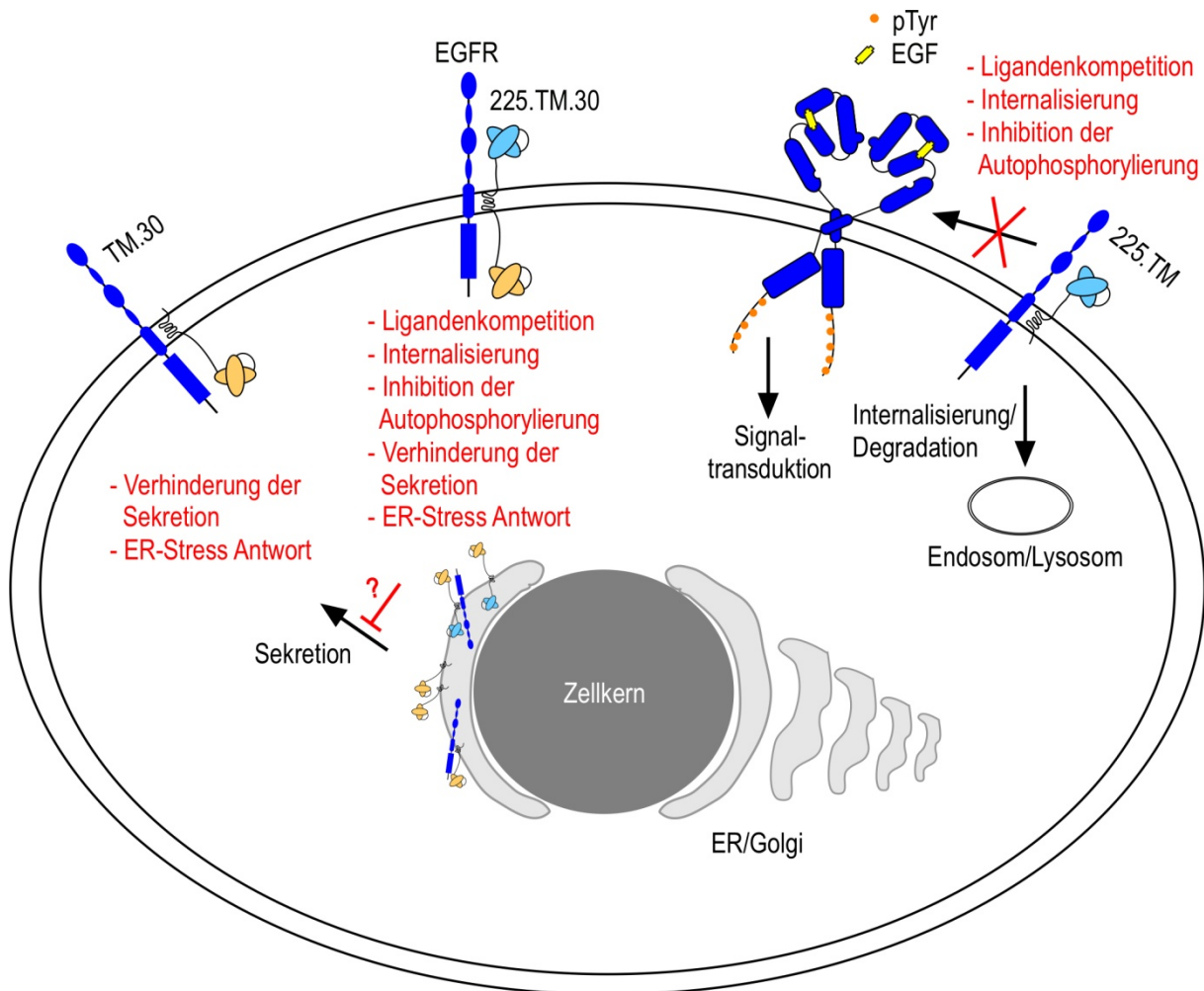


Abbildung 4.5.1 Mögliche Funktionsweise der mono- und bispezifischen transmembranen Antikörperfragmente. ER: endoplasmatisches Retikulum; Golgi: Golgi Apparat; pTyr: Phosphotyrosin
Weitere Erläuterungen im Text.

Die induzierte Expression der drei transmembranen Antikörperfragmente resultierte in Abhängigkeit von der Dox- und damit Protein-Konzentration in einem reduzierten Wachstum EGFR-exprimierender Tumorzellen (Abb. 3.4.8-3.4.10). Im Fall der i225.TM und i225.TM.30 Proteine geht diese Wachstumsinhibition wahrscheinlich, wie für das konstitutive System beschrieben, auf eine gehemmte Signaltransduktion des EGFR zurück, vermittelt durch die Internalisierung und Inhibition der Phosphorylierung des Rezeptors. Auffällig in den Langzeitstudien ist zum einen, dass sowohl 225.TM.30 als auch TM.30, aber nicht 225.TM in A431/M2 Zellen bereits bei niedrigen Dox-Konzentrationen (50 ng/ml) zu einer signifikanten Wachstumsinhibition führten. Zum anderen wurde die stärkste Wachstumsreduktion bei 250 und 1000 ng/ml Dox in iTM.30-exprimierenden A431/M2 Zellen beobachtet, gefolgt von i225.TM.30 und i225.TM (Abb. 3.4.9A). Somit erscheinen die TM.30 und 225.TM.30 Moleküle verglichen mit 225.TM als effektivere Wachstumsinhibitoren. Dieser Effekt war

allerdings auf A431/M2 Zellen beschränkt. In MDA-MB468/M2 Zellen machte der Typ des exprimierten Antikörperfragments keinen Unterschied bei der Wachstumshemmung (Abb. 3.4.9B). Möglicherweise besteht ein Unterschied in der autokrinen Rezeptoraktivierung zwischen A431 und MDA-MB468 Zellen. Um eine allgemeinere Aussage über das Potential zur Wachstumsinhibierung der einzelnen Antikörperfragmente treffen zu können, müssten noch weitere EGFR-abhängige Tumorzelllinien untersucht werden.

Tetracyclin interagiert in seiner ursprünglichen Funktion als Breitbandantibiotikum mit der bakteriellen Proteinsynthese (Clark und Chang, 1965). Aufgrund der Ähnlichkeit der prokaryotischen und mitochondrialen Proteinsynthese-Maschinerie wird angenommen, dass Tetracyclin und seine Derivate in die mitochondriale Proteinsynthese eingreifen können (Saikali und Singh, 2003). Tatsächlich wurde eine Hemmung der Proliferation durch die 2- bis 4-tägige Inkubation verschiedener Tumorzelllinien, darunter MDA-MB453, mit 1-2 μM (entspricht etwa 1-2 $\mu\text{g/ml}$) Dox schon beschrieben (Fife und Sledge, 1995; Ermak *et al.*, 2003). In anderen Tumorzelllinien wie MDA-MB231 oder Primärzellen wie HUVEC wurde dagegen auch in Anwesenheit von bis zu 6 μM Dox über 7 Tage keine Wachstumshemmung beobachtet (Xie *et al.*, 2008). Somit reagieren verschiedene Zellen unterschiedlich auf die Anwesenheit von Dox. Dieser durch Dox möglicherweise ausgelöste negative Wachstumseffekt muss bei der Nutzung des Tet-induzierbaren Systems in Proliferationsassays berücksichtigt werden. Tatsächlich führte die kontinuierliche Präsenz von höheren Dox-Konzentrationen (1000 ng/ml) über 7-14 Tage in dieser Arbeit bereits zu einer etwa 10%-igen Wachstumshemmung parentaler MDA-MB453/M2 und MDA-MB468/M2, aber nicht A431/M2 Zellen (Abb. 3.4.9 und 3.4.10). Da die Proliferation transmembraner Antikörperfragmente-exprimierender MDA-MB468/M2 Zellen bei 1000 ng/ml Dox etwa 40% geringer war als die nicht induzierter Zellen, ist die durch Dox ausgelöste, unspezifische Wachstumsreduktion bei der Bewertung der hier dargestellten Ergebnisse jedoch vernachlässigbar.

Der Mechanismus der iTM.30-vermittelten Wachstumshemmung EGFR-exprimierender A431/M2 und MDA-MB468/M2 Zellen (Abb. 3.4.8 und 3.4.9) ist nicht, wie für 225.TM oder 225.TM.30, mit einem reduzierten EGFR-Oberflächen- oder -Phosphorylierungslevel erklärbar. Daher wurden zur Klärung des Mechanismus weitere Experimente durchgeführt. Während des apoptotischen Zelltods verändert sich die Membranstruktur der Zelle und es kommt zu einer Oberflächenexposition von Phosphatidylserin. Dieses kann mit hoher Affinität von Annexin V gebunden werden (van Engeland *et al.*, 1998). Zunächst wurde der Anteil apoptotischer Zellen nach Induktion der transmembranen Antikörperexpression mittels Annexin V-Färbung bestimmt. Eine iTM.30- oder i225.TM.30-vermittelte Apoptoseinduktion wurde allerdings in keiner der Tumorzelllinien beobachtet (Abb. 3.4.11). Auffällig war jedoch

ein deutlicher Anstieg apoptotischer Zellen in 225.TM-exprimierenden A431/M2 und MDA-MB468/M2 Zellen nach dreitägiger Dox-Inkubation (Abb. 3.4.11A/B). Dieser Effekt kann, wie für parentale Zellen gezeigt, nicht auf Dox zurückgeführt werden. Wu und Kollegen wiesen nach einer Kultivierung von humanen Kolonkarzinomzellen (DiFi Zelllinie) mit EGFR-saturierenden Mengen an mAk 225 einen G1-Zellzyklusarrest (nach 24 h) dieser Zellen und nachfolgend Apoptose (nach 48 h) nach (Wu *et al.*, 1995). In ähnlichen Experimenten mit A431 und MDA-MB468 Zellen war allerdings weder ein G1-Arrest noch eine Apoptoseinduktion zu beobachten (Kawamoto *et al.*, 1983; Sato *et al.*, 1983; Kawamoto *et al.*, 1984; Ennis *et al.*, 1989; Wu *et al.*, 1995). Zur Klärung der Frage, ob die Expression des i225.TM Proteins tatsächlich in A431/M2/i225.TM und MDA-MB468/M2/i225.TM Zellen zur Auslösung von Apoptose führt, könnten in weiterführenden Arbeiten zusätzliche Nachweismethoden zur Detektion von Apoptose eingesetzt werden. Dafür wäre beispielsweise der Nachweis gespaltener, aktiver Caspasen in Aktivitätsassays oder Immunoblot-Analysen sowie fragmentierter DNA in Agarosegelelektrophorese-Experimenten möglich. Weiterhin könnte es sinnvoll sein, die Detektion apoptotischer Prozesse in Langzeitstudien, nach etwa 7-14 Tagen, vorzunehmen, um mögliche späte, durch transmembrane Antikörper ausgelöste Effekte erfassen zu können.

Da induzierte A431/M2/iTM.30 und MDA-MB468/M2/iTM.30 Zellen keinen erhöhten Anteil apoptotischer Zellen aufwiesen (Abb. 3.4.11A/B), wurde untersucht, ob die generelle Dox-induzierte Überexpression eines beliebigen Proteins in A431/M2 Zellen bereits zu einer gehemmten Proliferation beiträgt. Dazu wurden A431/M2/Img* und A431/M2/iscFv(30) Zellen, die das Luz-EGFP Protein bzw. das zytoplasmatische scFv(30) Molekül (Hyland *et al.*, 2003) exprimieren, analysiert. Weder in Kurz- noch in Langzeit-Proliferationsstudien konnte ein inhibiertes Wachstum dieser Zellen in Anwesenheit von bis zu 1000 ng/ml Dox nachgewiesen werden (Abb. 3.4.12C/D). Ebenso wurde kein veränderter Anteil apoptotischer Zellen beobachtet (Abb. 3.4.12B). Somit ist die generelle Überexpression eines Proteins ebenfalls nicht für die in A431/M2/iTM.30 Zellen beobachtete Wachstumsreduktion verantwortlich.

Concanavalin A (Con A), ein Lektin, das die Bindung an α -D-Mannose und α -D-Glukose präferiert, co-lokalisiert in CLSM Studien mit Signalen von Proteindisulfidisomerase (PDI)- und Calnexin-spezifischen Antikörpern (Fiebiger *et al.*, 2002). PDI und Calnexin sind ER-ständige Proteine, wodurch auch Con A als ER-Marker eingesetzt werden kann. Es wurden allerdings auch Con A Bindungspartner im cis-Golgi Apparat beschrieben (Pavelka und Ellinger, 1985). Zusammengefasst definierten Shnyder und Hubbard Con A als einen Marker für „das ER von der Zellkernhülle bis zu den proximalen (cis) Elementen des Golgikomplexes“ (Shnyder und Hubbard, 2002). CLSM-Studien von MDA-MB468/M2/iTM.30

und MDA-MB468/M2/i225.TM.30 Zellen zeigten eine Co-Lokalisation von EGFR und TM.30 oder 225.TM.30 Molekülen in einem perinukleären Kompartiment (Abb. 3.4.13). Zudem wurde eine klare Co-Lokalisation von Con A und EGFR in diesem Kompartiment beobachtet (Abb. 3.4.15). Daher kann auf eine Lokalisierung von EGFR/225.TM.30- bzw. EGFR/TM.30-Komplexen im ER/cis-Golgi Kompartiment geschlossen werden. Eine Tunikamycin-vermittelte Inhibition der N-Glykosylierung von EGFR resultierte in einer reduzierten RTK Signalweiterleitung sowie im Verbleib des Rezeptors im ER. Weitere Beobachtungen dieser Studie zeigten zudem ein verringertes Molekulargewicht und die Komplexierung von EGFR mit dem Chaperon BiP (GRP78) (Contessa *et al.*, 2008; Ling *et al.*, 2009). In dieser Arbeit wurde nach Expression des 225.TM.30 Proteins in MDA-MB468 und MDA-MB468/M2 Zellen ebenfalls eine geringere molekulare Masse und eine verringerte Aktivierbarkeit von EGFR, sowie die Lokalisierung von EGFR/225.TM.30 Komplexen im ER nachgewiesen. Die Expression des TM.30 Proteins führte zwar nur zu einer teilweisen ER-Retention des Rezeptors, dennoch wäre es möglich, dass diese ausreicht, um das Wachstum der TM.30-exprimierenden Zellen zu inhibieren. Weiterhin wäre es möglich, dass durch die Retention der TM.30/EGFR und 225.TM.30/EGFR Komplexe im ER eine ER-Stress-Antwort (*unfolded protein response*) ausgelöst wird. Indikatoren dafür sind erhöhte BiP- und PDI-Proteinmengen in der Zelle (Ellgaard und Ruddock, 2005; Samali *et al.*, 2010). Zur Untersuchung dieser Hypothese wurden die Mengen an BiP und PDI Protein in Immunoblot-Analysen von iTM.30-, i225.TM.30- und i225.TM-transduzierten Tumorzellen in An- und Abwesenheit von Dox verglichen (Abb. 3.4.16). Tatsächlich führte die induzierte Expression von TM.30 Protein in A431/M2, aber nicht MDA-MB453/M2 Zellen zu einer erhöhten BiP und PDI Expression (Abb. 3.4.16A/C). In MDA-MB468/M2 Zellen wurde nur vermehrt PDI Protein detektiert (Abb. 3.4.16B). Dies spricht dafür, dass die Expression von TM.30 in EGFR-positiven Zellen zur Induktion von ER-Stress führt. Dieser wiederum könnte für das reduzierte Wachstum dieser Zellen verantwortlich sein. Weitere ER-Stress Marker, wie eine ungewöhnliche Splicevariante der XBP1 mRNA oder erhöhten CHOP und Phospho-eIF2 α Proteinmengen, könnte in fortführenden Arbeiten analysiert werden (Samali *et al.*, 2010). Die ER-Stress Analyse von 225.TM.30-exprimierenden Zellen ergab nur für A431/M2/i225.TM.30 aber nicht für MDA-MB468/M2/i225.TM.30 Zellen vermehrt PDI Protein (Abb. 3.4.16B).

4.6 Einfluss der induzierbaren Expression eines EGFR- und ErbB2-bindenden bispezifischen transmembranen Antikörperfragments auf Tumorzellen

ErbB2, für das bisher kein natürlicher Ligand identifiziert wurde, nimmt eine Sonderstellung in der Familie der ErbB-RTK-Familie ein (Riese und Stern, 1998; Hynes *et al.*, 2001). Der

Rezeptor liegt, im Gegensatz zu den anderen ErbB-RTK, auch ohne Ligandenbindung in einer nicht autoinhibierten, offenen Konformation vor. In dieser ist die Dimerisierungsdomäne frei zugänglich, was ErbB2 zu einem idealen Heterodimerisierungspartner macht (Cho *et al.*, 2003; Alvarado *et al.*, 2009). Tatsächlich wurde nachgewiesen, dass in Zellen, in denen neben ErbB2 auch EGFR oder ErbB3 Protein exprimiert wird, vornehmlich ErbB2-enthaltende Heterodimere gebildet werden (Graus-Porta *et al.*, 1997). Weiterhin führte die gemeinsame Expression von EGFR und ErbB2 zu einer veränderten Zellmorphologie gepaart mit einer erhöhten Motilität und einem gesteigerten metastasierenden Potential (Brandt *et al.*, 1999). Die vermehrte Transformierbarkeit dieser Zellen kann auf die Bildung von EGFR-ErbB2-Heterodimeren zurückgeführt werden. Die EGF-induzierte Heterodimerisierung von EGFR mit ErbB2 resultiert in einer verlängerten und amplifizierten Signaltransduktion (Beerli *et al.*, 1995; Graus-Porta *et al.*, 1995; Karunagaran *et al.*, 1996). Dieser liegen wahrscheinlich mehrere Mechanismen zugrunde. Zum einen wurde gezeigt, dass EGFR-ErbB2-Komplexe langsamer endozytiert und vermehrt zur Plasmamembran zurückgeführt werden (Recycling) (Wells *et al.*, 1990; Vieira *et al.*, 1996; Wang *et al.*, 1999; Hendriks *et al.*, 2003). Zum anderen bindet EGFR seinen natürlichen Liganden EGF mit deutlich höherer Affinität in einem heterodimeren Komplex, was zu einer verringerten Ligandendissoziation führt (Wada *et al.*, 1990; Beerli *et al.*, 1995; Graus-Porta *et al.*, 1995). Weiterhin wurde nach EGF-Bindung in EGFR-ErbB2-Heterodimeren ein verändertes EGFR-Phosphorylierungsmuster beschrieben (Hartman *et al.*, 2012). Die für die direkte oder indirekte Rekrutierung des c-Cbl Proteins an EGFR notwendige Phosphorylierung der Tyrosine 1045 und 1068 war in Heterodimeren stark inhibiert. Dies führte zu einer verringerten Ubiquitinierung und damit zu einer geringeren lysosomalen Degradation des Heterodimers verglichen mit dem EGFR-Homodimer.

Wird die Heterodimerisierung von EGFR und ErbB2, beispielsweise durch den mAk Pertuzumab, unterbunden, wird das transformierende Potential der Rezeptoren verringert (Hughes *et al.*, 2009). Auch der Angriff auf EGFR- und ErbB2-exprimierende Zellen mit einem von Trastuzumab und Cetuximab abgeleiteten bispezifischen Antikörper führte verglichen mit den einzelnen mAk zu einer verstärkten Wachstumsinhibition von Brustkarzinomzellen (Wang *et al.*, 2012). In dieser Arbeit wurden nun die möglichen Effekte eines ErbB2-ECD- und EGFR-ICD-bispezifischen transmembranen Antikörperfragments (5.TM.30) auf die Rezeptorexpression und Proliferation EGFR- und/oder ErbB2-exprimierender Tumorzellen im Tet-induzierbaren System untersucht. Zur Generierung dieses Moleküls wurde das vom mAk FRP5 (Harwerth *et al.*, 1992) abgeleitete scFv(FRP5) Fragment über die bereits für 225.TM beschriebene Gelenk- und Transmembrandomäne an scFv(30) gekoppelt. Die Expression des 5.TM.30 Proteins und des 5.TM Kontrollproteins,

dem die scFv(30)-Domäne fehlt, konnte sowohl in Gesamtzelllysaten als auch auf der Zelloberfläche von A431/M2, MDA-MB468/M2 und MDA-MB453/M2 Zellen bestätigt werden (Abb. 3.5.3 und Daten nicht gezeigt). Die Analyse der 5.TM.30- und 5.TM-Oberflächenexpression ergab eine erhöhte Anzahl transmembraner Antikörperfragment-Moleküle auf ErbB2-positiven A431/M2 und MDA-MB453/M2 Zellen verglichen mit ErbB2-negativen MDA-MB468/M2 Zellen. Dies legt nahe, dass ErbB2, ähnlich wie EGFR im Fall der 225.TM und 225.TM.30 Proteine, die 5.TM.30 und 5.TM Moleküle an der Zelloberfläche stabilisiert. Die Beobachtung, dass das 5.TM.30 Protein in geringeren Mengen an der Oberfläche exprimiert wird als das 5.TM Protein, lässt sich dadurch erklären, dass 5.TM.30, aber nicht 5.TM, ähnlich wie 225.TM.30 und TM.30, vermehrt in einem perinukleären Kompartiment vorliegt (Abb. 3.5.9).

Der Nachweis der transmembranen Antikörperfragmente in FACS-Analysen erfolgte mit einem ErbB2-Fc Fusionsprotein, da die 5.TM und 5.TM.30 Moleküle keinen *Myc-tag* tragen. Das scFv(FRP5) Antikörperfragment bindet, wie der parentale mAk, ein diskontinuierliches Epitop im Bereich der ersten 222 Aminosäuren der extrazellulären Domäne des ErbB2-Rezeptors (Gerstmayer *et al.*, 1997; Grada *et al.*, 2013). Die Bindung des ErbB2-Fc Fusionsproteins, das die gesamte ErbB2-ECD (AS 23-652; NCBI *Reference Sequence*: NP_004439) beinhaltet, durch 5.TM.30 und 5.TM weist somit auch die Funktionalität der scFv(FRP5) Domäne in den Fusionsproteinen nach. In Co-IP Studien mit EGFR-positiven MDA-MB468/M2/i5.TM.30 und A431/M2/i5.TM.30 Zellen wurde auch die EGFR-Bindungsaktivität des scFv(30) Antikörperfragments innerhalb des 5.TM.30 Moleküls bestätigt (Abb. 3.5.4A/B). In ähnlichen Experimenten wurde keine Bindung des 5.TM Proteins an EGFR sowie keine Bindung des 5.TM.30 Proteins an einen irrelevanten Präzipitationsantikörper beobachtet. Dies bestätigt die spezifische scFv(30)-vermittelte Bindung des 5.TM.30 Moleküls an EGFR (Abb. 3.5.4C und Daten nicht gezeigt). Da auch die scFv(225) und scFv(30) Antikörperfragmente im 225.TM.30 Molekül funktional waren (siehe Abschnitt 4.5), ist es offenbar generell möglich, ein extra- und ein intrazelluläres scFv-Antikörperfragment über eine Transmembrandomäne zu verknüpfen, ohne die Bindungsfähigkeit der einzelnen Fragmente zu beeinflussen. Ob beide scFv-Fragmente in der Lage sind, simultan an ihre Antigene zu binden, muss in weiterführenden Experimenten noch geklärt werden.

In *in vitro* Experimenten und murinen *in vivo* Modellen führte die Therapie von Pankreaskarzinomzellen mit einer Kombination der ErbB2-ECD- bzw. EGFR-ECD-spezifischen mAk Trastuzumab und Cetuximab zu einer verminderten Rezeptor-Expression (Larbouret *et al.*, 2012). Tatsächlich resultierte auch die Expression von i5.TM.30 in einer reduzierten ErbB2- und leicht verringerten EGFR-Gesamtexpression (Abb. 3.5.5A/B/E). Über

welchen Mechanismus 5.TM.30 die ErbB-Rezeptor Expression inhibiert, muss in fortführenden Arbeiten geklärt werden. Möglicherweise führt die Bindung des 5.TM.30 Proteins, analog zu 225.TM.30, zu einer Internalisierung und Degradation von EGFR-ErbB2-Heterodimeren und/oder ErbB2-Homodimeren. Dafür spricht, dass die ErbB2-Oberflächenexpression in MDA-MB453/M2/i5.TM.30 Zellen um etwa 30% reduziert war (Abb. 3.5.5C). Die Bindung des parentalen mAk FRP5 an ErbB2 bewirkt eine erhöhte Endozytoserate des Rezeptors, verglichen mit Kontrollzellen (Harwerth *et al.*, 1992; Harwerth *et al.*, 1993). Nicht nur der bivalente parentale mAk, auch das davon abgeleitete scFv(FRP5) Molekül werden, nach Bindung an ErbB2, in die Zelle aufgenommen, was für verschiedene scFv(FRP5)-enthaltende rekombinante Fusionsproteine gezeigt werden konnte (Wels *et al.*, 1992; Mahmud *et al.*, 2009). Falls dies auch für das 5.TM.30 Protein zutrifft, wäre allerdings auch eine reduzierte ErbB2-Oberflächenexpression in Anwesenheit des 5.TM Kontrollproteins zu erwarten. Diese Arbeit ergab aber keine Hemmung sondern eher einen leichten Anstieg der ErbB2-Oberflächenexpression in MDA-MB453/M2/i5.TM Zellen (Abb. 3.5.5C). Möglicherweise wird der ErbB2-Rezeptor durch die Bindung an die scFv(FRP5)-Domäne der 5.TM.30 und 5.TM Proteine internalisiert, aber anschließend durch Neusynthese und Recycling wieder an die Zelloberfläche transportiert. Das 5.TM.30 Protein wurde, wie 225.TM.30 und TM.30, auch in einem perinukleären Kompartiment, sehr wahrscheinlich dem ER, detektiert (Abb. 3.5.9). Dort wurden auch EGFR/5.TM.30-Komplexe in EGFR-exprimierenden MDA-MB468/M2/i5.TM.30 Zellen beobachtet (Abb. 3.5.9B). Möglicherweise wird auch neu synthetisierter ErbB2-Rezeptor durch das 5.TM.30 Protein im ER zurückgehalten, was zu der verringerten ErbB2-Oberflächenexpression beitragen könnte. Diese Hypothese muss in nachfolgenden Arbeiten allerdings noch weiter geprüft werden. Ebenso sollte der Effekt des 5.TM.30 Proteins auf EGFR genauer untersucht werden, da nach Expression von 5.TM.30 zwar eine minimal verringerte EGFR-Gesamtmenge, aber keine Reduktion der Oberflächenexpression beobachtet wurde (Abb. 3.5.5D/E). Das geringfügig schwächere ErbB2-Signal in Immunoblots von A431/M2/i5.TM Zelllysaten ist wahrscheinlich auf die Dox Inkubation oder ein experimentelles Artefakt zurückzuführen, da eine ähnliche Reduktion in parentalen A431/M2 Zelllysaten detektiert wurde (Abb. 3.5.5A). In EGFR-positiven A431/M2 und MDA-MB468/M2 Zellen resultierte die induzierte Expression von 5.TM.30 in einer signifikanten Wachstumsreduktion in Kurz- und Langzeitexperimenten (Abb. 3.5.6A/C und 3.5.7). Wahrscheinlich hängt diese, wie für TM.30 beschrieben, mit der Komplexierung von 5.TM.30 und EGFR im ER, und einer dadurch möglicherweise ausgelösten ER-Stress-Antwort zusammen. Tatsächlich konnten nach dreitägiger Dox-Inkubation verstärkte PDI-Signale in Immunoblots von A431/M2/i5.TM.30 und MDA-MB468/M2/i5.TM.30 Zelllysaten nachgewiesen werden (Abb. 3.5.10). Die Expression

des 5.TM Proteins hatte dagegen keinen Einfluss auf das Wachstum EGFR- und/oder ErbB2-exprimierender Zellen (Abb. 3.5.6B/D/F und Abb. 3.5.7).

Für EGFR-negative MDA-MB453/M2/i5.TM.30 Zellen wurde vier Tage nach Induktion der Proteinexpression noch kein signifikanter Effekt auf das Zellwachstum beobachtet. In Langzeitstudien wurde allerdings eine Dox-Konzentrations-abhängige Wachstumsreduktion bis zu 50% detektiert (Abb. 3.5.7). Diese korreliert mit einem, bereits nach dreitägiger Dox-Inkubation nachgewiesenen, leicht erhöhten Anteil apoptotischer Zellen (Abb. 3.5.8). Möglicher Apoptoseauslöser in 5.TM.30-exprimierenden ErbB2-positiven Zellen könnte eine aufgrund der verringerten ErbB2-Expression herunterregulierte PI3K/Akt Signaltransduktion sein, wie für den mAk Trastuzumab (Herceptin) gezeigt (Delord *et al.*, 2005). Der beobachtete 5-fach erhöhte Anteil Annexin V-positiver induzierter A431/M2/i5.TM Zellen verglichen mit nicht induzierten Zellen steht im Widerspruch zu dem nicht veränderten Wachstum dieser Zellen (Abb. 3.5.8, 3.5.6B und 3.5.7). In FACS-Analysen wurde allerdings nach dreitägiger Inkubation von A431/M2/i5.TM Zellen mit 0-1000 ng/ml Dox eine klare Dox-abhängige Reduktion des Anteils EGFP-positiver Zellen beobachtet (Daten nicht gezeigt). Entsprechend könnten nach Apoptose von A431/M2/i5.TM Zellen noch in der Kultur vorhandene parentale A431/M2 Zellen auswachsen. Dies sollte in weiterführenden Arbeiten näher untersucht werden.

4.7 Ausblick

In dieser Arbeit wurde erstmals gezeigt, dass es möglich ist, ein intra- und ein extrazellulär bindendes scFv-Antikörperfragment mittels einer Transmembrandomäne zu verbinden und dabei die Funktionalität der einzelnen scFv-Moleküle aufrecht zu erhalten. Die Expression der EGFR-bi- bzw. monospezifischen transmembranen Antikörperfragmente 225.TM.30, 225.TM und TM.30 resultierte ausschließlich in EGFR-exprimierenden Zellen in einer Wachstumsinhibition. Die 225.TM Domäne induziert dabei wahrscheinlich einerseits die Internalisierung des EGFR und verhindert andererseits durch Konkurrenz der natürlichen Liganden eine Aktivierung des Rezeptors. Inwieweit dadurch die intrazelluläre Signalweiterleitung über z.B. den MAPK-Signaltransduktionsweg beeinflusst wird, könnte in weiterführenden Arbeiten analysiert werden. Ebenso wäre es nützlich, herauszufinden, warum Antikörpermoleküle, die wie 5.TM.30, 225.TM.30 und TM.30, eine TM.30-Domäne tragen, in der ER-Membran lokalisiert vorliegen. Inwieweit die Komplexbildung von neu synthetisiertem EGFR mit 225.TM.30, TM.30 und 5.TM.30, und eventuell auch ErbB2 mit 5.TM.30 direkt zu der Induktion einer ER-Stress-Antwort führt, sollte ebenso wie die Auslösung von Apoptose in transmembrane Antikörperfragmente-exprimierenden Zellen in weiteren Studien mit längerer Dox-Induktionszeit untersucht werden. Dazu könnten auch

andere als die in dieser Arbeit genutzten Assays in Betracht gezogen werden, wie beispielsweise der Nachweis von CHOP und Phospho-eIF2 α Protein als Zeichen einer ER-Stress-Antwort (Samali *et al.*, 2010) bzw. aktivierte Caspasen oder DNA-Fragmentation als Apoptoseindikatoren. Interessant wäre es auch, herauszufinden, wie das 5.TM Protein speziell in A431/M2 Zellen Apoptose auslöst.

Da das transformierende Potential der Signalleitung von EGFR-ErbB2-Heterodimeren verglichen mit dem der Homodimere erhöht ist (Beerli *et al.*, 1995; Graus-Porta *et al.*, 1995; Karunagaran *et al.*, 1996; Brandt *et al.*, 1999), wurde bereits in einem vorläufigen Experiment damit begonnen, den möglichen Einfluss der 5.TM.30 und 5.TM Proteine auf die Heterodimerisierung der Zielrezeptoren zu analysieren (Daten nicht gezeigt). Hierzu wurden A431/M2/i5.TM.30 und A431/M2/i5.TM Zellen eingesetzt. Die Auswertung dieses Experiments war allerdings schwierig, da die ErbB2-Expression in diesen Zellen gering ist und deutlich unterhalb der von EGFR liegt (Hynes *et al.*, 1989). Es wäre sinnvoll, solche Untersuchungen zukünftig in Zellen mit vergleichbarer EGFR- und ErbB2-Expression durchzuführen.

Um den Einfluss der transmembranen Antikörperfragmente auf das Wachstum von Tumorzellen *in vivo* zu untersuchen, könnten beispielsweise die mit induzierbaren Antikörperkonstrukten transduzierten A431/M2 Zellen in einem Xenograft Modell subkutan in immundefiziente Mäuse implantiert werden. Zur Induktion der Proteinexpression könnte dann über das Trinkwasser Dox appliziert werden, um das Tumorwachstum in An- und Abwesenheit von Dox zu beobachten.

Ein Einsatz solcher transmembraner Antikörperfragmente zur Tumortherapie erscheint grundsätzlich denkbar. Allerdings müsste die cDNA der Effektorproteine hierzu spezifisch in Tumorzellen eingebracht werden. Eine Möglichkeit hierfür wäre die Verpackung der Effektor-DNA in Viren (Boldicke, 2007). Dies wurde bereits am Beispiel eines Adenovirus, das für ein ER-ständiges ErbB2-spezifisches scFv-Antikörperfragment kodiert, in klinischen Phase I Studien beschrieben (Alvarez *et al.*, 2000). Weiterhin wurde gezeigt, dass unterschiedliche Viren über die Präsentation heterologer Bindungsdomänen auf ihrer Oberfläche, spezifisch bestimmte Zellen transduzieren können (Anliker *et al.*, 2010; Bach *et al.*, 2013). Weitere Möglichkeiten der Genübertragung in Zellen stellen nicht-virale Systeme wie *naked* DNA, DNA-gekoppelte Polymere, kationische Peptid-DNA-Komplexe, Metall-überzogene DNA und Liposomen dar (Glover *et al.*, 2005; Boldicke, 2007). Sogenannte Immunliposomen sind Lipid-Doppelschichten, die sowohl Nukleinsäure und damit Expressionsplasmide, als auch Proteine umfassen können, und mittels spezifischer scFv-Antikörperfragmente an der Oberfläche gezielt an die Zielzelle herangebracht werden können (Allen, 2002). Eine mögliche therapeutische Anwendung der hier vorgestellten transmembranen

Antikörperfragmente würde umfassende weitere experimentelle Vorarbeiten erfordern. Naheliegender ist es, bispezifische transmembrane Antikörperfragmente als Werkzeuge für die Analyse von Signaltransduktionsprozessen zu nutzen. Dabei könnten andere zytosolische scFv-Fragmente spezifisch für Signalmoleküle wie Ras oder PI3K genutzt werden, um sie mittels des extrazellulären scFv-Fragments an spezielle Rezeptoren zu rekrutieren. So erscheint auch eine Rekrutierung eines intrazellulären Effektormoleküls, das mit der Signaltransduktion von z.B. ErbB-Rezeptoren interagiert, über ein extrazelluläres Rezeptor-spezifisches und intrazelluläres Effektor-spezifisches scFv-Fragment denkbar.

5 Literaturverzeichnis

- Allen, T. M. (2002). "Ligand-targeted therapeutics in anticancer therapy." *Nat Rev Cancer* **2**(10): 750-763.
- Alvarado, D., *et al.* (2009). "ErbB2 resembles an autoinhibited invertebrate epidermal growth factor receptor." *Nature* **461**(7261): 287-291.
- Alvarez, R. D., *et al.* (2000). "A cancer gene therapy approach utilizing an anti-erbB-2 single-chain antibody-encoding adenovirus (AD21): a phase I trial." *Clin Cancer Res* **6**(8): 3081-3087.
- Andersson, J., *et al.* (2004). "HER-2/neu (c-erbB-2) evaluation in primary breast carcinoma by fluorescent in situ hybridization and immunohistochemistry with special focus on intratumor heterogeneity and comparison of invasive and in situ components." *Appl Immunohistochem Mol Morphol* **12**(1): 14-20.
- Anliker, B., *et al.* (2010). "Specific gene transfer to neurons, endothelial cells and hematopoietic progenitors with lentiviral vectors." *Nat Methods* **7**(11): 929-935.
- Aplin, A. E., *et al.* (1998). "Signal transduction and signal modulation by cell adhesion receptors: the role of integrins, cadherins, immunoglobulin-cell adhesion molecules, and selectins." *Pharmacol Rev* **50**(2): 197-263.
- Arkipov, A., *et al.* (2013). "Architecture and membrane interactions of the EGF receptor." *Cell* **152**(3): 557-569.
- Awada, A. und P. G. Aftimos (2013). "Targeted therapies of solid cancers: new options, new challenges." *Curr Opin Oncol* **25**(3): 296-304.
- Bach, P., *et al.* (2013). "Specific elimination of CD133+ tumor cells with targeted oncolytic measles virus." *Cancer Res* **73**(2): 865-874.
- Baron, U. und H. Bujard (2000). "Tet repressor-based system for regulated gene expression in eukaryotic cells: principles and advances." *Methods Enzymol* **327**: 401-421.
- Baselga, J., *et al.* (2012). "Pertuzumab plus trastuzumab plus docetaxel for metastatic breast cancer." *N Engl J Med* **366**(2): 109-119.
- Baselga, J. und S. M. Swain (2009). "Novel anticancer targets: revisiting ERBB2 and discovering ERBB3." *Nat Rev Cancer* **9**(7): 463-475.
- Beerli, R. R., *et al.* (1995). "Neu differentiation factor activation of ErbB-3 and ErbB-4 is cell specific and displays a differential requirement for ErbB-2." *Mol Cell Biol* **15**(12): 6496-6505.
- Beerli, R. R., *et al.* (1994). "Autocrine inhibition of the epidermal growth factor receptor by intracellular expression of a single-chain antibody." *Biochem Biophys Res Commun* **204**(2): 666-672.
- Beerli, R. R., *et al.* (1994). "Intracellular expression of single chain antibodies reverts ErbB-2 transformation." *J Biol Chem* **269**(39): 23931-23936.
- Beerli, R. R., *et al.* (1996). "Inhibition of signaling from Type 1 receptor tyrosine kinases via intracellular expression of single-chain antibodies." *Breast Cancer Res Treat* **38**(1): 11-17.
- Bertelsen, V., *et al.* (2011). "A chimeric pre-ubiquitinated EGF receptor is constitutively endocytosed in a clathrin-dependent, but kinase-independent manner." *Traffic* **12**(4): 507-520.
- Bhowmick, N. A., *et al.* (2004). "Stromal fibroblasts in cancer initiation and progression." *Nature* **432**(7015): 332-337.
- Bill, H. M., *et al.* (2004). "Epidermal growth factor receptor-dependent regulation of integrin-mediated signaling and cell cycle entry in epithelial cells." *Mol Cell Biol* **24**(19): 8586-8599.
- Biocca, S., *et al.* (1995). "Redox state of single chain Fv fragments targeted to the endoplasmic reticulum, cytosol and mitochondria." *Biotechnology (N Y)* **13**(10): 1110-1115.
- Bird, R. E., *et al.* (1988). "Single-chain antigen-binding proteins." *Science* **242**(4877): 423-426.
- Boersma, Y. L., *et al.* (2011). "Bispecific designed ankyrin repeat proteins (DARPs) targeting epidermal growth factor receptor inhibit A431 cell proliferation and receptor recycling." *J Biol Chem* **286**(48): 41273-41285.
- Bohl, D., *et al.* (1997). "Long-term control of erythropoietin secretion by doxycycline in mice transplanted with engineered primary myoblasts." *Nat Med* **3**(3): 299-305.
- Boldicke, T. (2007). "Blocking translocation of cell surface molecules from the ER to the cell surface by intracellular antibodies targeted to the ER." *J Cell Mol Med* **11**(1): 54-70.
- Boussif, O., *et al.* (1995). "A versatile vector for gene and oligonucleotide transfer into cells in culture and in vivo: polyethylenimine." *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**(16): 7297-7301.
- Brand, T. M., *et al.* (2011). "The nuclear epidermal growth factor receptor signaling network and its role in cancer." *Discov Med* **12**(66): 419-432.
- Brandt, B. H., *et al.* (1999). "c-erbB-2/EGFR as dominant heterodimerization partners determine a motogenic phenotype in human breast cancer cells." *FASEB J* **13**(14): 1939-1949.
- Bryan, T. M., *et al.* (1995). "Telomere elongation in immortal human cells without detectable telomerase activity." *EMBO J* **14**(17): 4240-4248.
- Burgess, A. W. (2008). "EGFR family: structure physiology signalling and therapeutic targets." *Growth Factors* **26**(5): 263-274.
- Burgess, A. W., *et al.* (2003). "An open-and-shut case? Recent insights into the activation of EGF/ErbB receptors." *Mol Cell* **12**(3): 541-552.
- Burnet, M. (1957). "Cancer; a biological approach. I. The processes of control." *Br Med J* **1**(5022): 779-786.
- Cahill, D. P., *et al.* (1999). "Genetic instability and darwinian selection in tumours." *Trends Cell Biol* **9**(12): M57-60.

- Cai, B., *et al.* (1998). "Down-regulation of epidermal growth factor receptor-signaling pathway by binding of GRP78/BiP to the receptor under glucose-starved stress conditions." *J Cell Physiol* **177**(2): 282-288.
- Carpenter, G., *et al.* (1978). "Epidermal growth factor stimulates phosphorylation in membrane preparations in vitro." *Nature* **276**(5686): 409-410.
- Chaiet, L. und F. J. Wolf (1964). "The Properties of Streptavidin, a Biotin-Binding Protein Produced by Streptomyces." *Arch Biochem Biophys* **106**: 1-5.
- Chames, P. und D. Baty (2000). "Antibody engineering and its applications in tumor targeting and intracellular immunization." *FEMS Microbiol Lett* **189**(1): 1-8.
- Chattopadhyay, A., *et al.* (1999). "The role of individual SH2 domains in mediating association of phospholipase C-gamma1 with the activated EGF receptor." *J Biol Chem* **274**(37): 26091-26097.
- Cheng, N., *et al.* (2008). "Transforming growth factor-beta signaling-deficient fibroblasts enhance hepatocyte growth factor signaling in mammary carcinoma cells to promote scattering and invasion." *Mol Cancer Res* **6**(10): 1521-1533.
- Cho, H. S., *et al.* (2003). "Structure of the extracellular region of HER2 alone and in complex with the Herceptin Fab." *Nature* **421**(6924): 756-760.
- Ciardello, F. und G. Tortora (2008). "EGFR antagonists in cancer treatment." *N Engl J Med* **358**(11): 1160-1174.
- Clark, J. M., Jr. und A. Y. Chang (1965). "Inhibitors of the transfer of amino acids from aminoacyl soluble ribonucleic acid to proteins." *J Biol Chem* **240**(12): 4734-4739.
- Clement, J. Q., *et al.* (1999). "The stability and fate of a spliced intron from vertebrate cells." *RNA* **5**(2): 206-220.
- Cochet, O., *et al.* (1998). "Intracellular expression of an antibody fragment-neutralizing p21 ras promotes tumor regression." *Cancer Res* **58**(6): 1170-1176.
- Cohnheim, J. (1875). "Congenitales, quergestreiftes Muskelsarkom der Nieren." *Virchows Arch* **65**: 64-69.
- Comis, R. L. (2005). "The current situation: erlotinib (Tarceva) and gefitinib (Iressa) in non-small cell lung cancer." *Oncologist* **10**(7): 467-470.
- Contessa, J. N., *et al.* (2008). "Inhibition of N-linked glycosylation disrupts receptor tyrosine kinase signaling in tumor cells." *Cancer Res* **68**(10): 3803-3809.
- Corish, P. und C. Tyler-Smith (1999). "Attenuation of green fluorescent protein half-life in mammalian cells." *Protein Eng* **12**(12): 1035-1040.
- Counter, C. M., *et al.* (1992). "Telomere shortening associated with chromosome instability is arrested in immortal cells which express telomerase activity." *EMBO J* **11**(5): 1921-1929.
- Coussens, L., *et al.* (1985). "Tyrosine kinase receptor with extensive homology to EGF receptor shares chromosomal location with neu oncogene." *Science* **230**(4730): 1132-1139.
- Coussens, L. M. und Z. Werb (1996). "Matrix metalloproteinases and the development of cancer." *Chem Biol* **3**(11): 895-904.
- Cronin, J., *et al.* (2005). "Altering the tropism of lentiviral vectors through pseudotyping." *Curr Gene Ther* **5**(4): 387-398.
- Datta, S. R., *et al.* (1999). "Cellular survival: a play in three Akts." *Genes Dev* **13**(22): 2905-2927.
- Daub, H., *et al.* (1996). "Role of transactivation of the EGF receptor in signalling by G-protein-coupled receptors." *Nature* **379**(6565): 557-560.
- Davies, M. A. und Y. Samuels (2010). "Analysis of the genome to personalize therapy for melanoma." *Oncogene* **29**(41): 5545-5555.
- Day, R. N., *et al.* (1998). "Dual-function reporter protein for analysis of gene expression in living cells." *Biotechniques* **25**(5): 848-850, 852-844, 856.
- de Castro-Carpeno, J., *et al.* (2008). "EGFR and colon cancer: a clinical view." *Clin Transl Oncol* **10**(1): 6-13.
- DeBerardinis, R. J., *et al.* (2008). "The biology of cancer: metabolic reprogramming fuels cell growth and proliferation." *Cell Metab* **7**(1): 11-20.
- Dechant, M., *et al.* (2008). "Complement-dependent tumor cell lysis triggered by combinations of epidermal growth factor receptor antibodies." *Cancer Res* **68**(13): 4998-5003.
- Delord, J. P., *et al.* (2005). "Selective inhibition of HER2 inhibits AKT signal transduction and prolongs disease-free survival in a micrometastasis model of ovarian carcinoma." *Ann Oncol* **16**(12): 1889-1897.
- Demaison, C., *et al.* (2002). "High-level transduction and gene expression in hematopoietic repopulating cells using a human immunodeficiency [correction of immunodeficiency] virus type 1-based lentiviral vector containing an internal spleen focus forming virus promoter." *Hum Gene Ther* **13**(7): 803-813.
- DeNardo, D. G., *et al.* (2010). "Interactions between lymphocytes and myeloid cells regulate pro- versus anti-tumor immunity." *Cancer Metastasis Rev* **29**(2): 309-316.
- Deshane, J., *et al.* (1995). "Targeted eradication of ovarian cancer mediated by intracellular expression of anti-erbB-2 single-chain antibody." *Gynecol Oncol* **59**(1): 8-14.
- Dittmann, K., *et al.* (2010). "Nuclear EGFR shuttling induced by ionizing radiation is regulated by phosphorylation at residue Thr654." *FEBS Lett* **584**(18): 3878-3884.
- Dittmann, K., *et al.* (2005). "Radiation-induced epidermal growth factor receptor nuclear import is linked to activation of DNA-dependent protein kinase." *J Biol Chem* **280**(35): 31182-31189.
- Du, C. und Y. Wang (2011). "The immunoregulatory mechanisms of carcinoma for its survival and development." *J Exp Clin Cancer Res* **30**: 12.
- Dunn, G. P., *et al.* (2002). "Cancer immunoeediting: from immunosurveillance to tumor escape." *Nat Immunol* **3**(11): 991-998.

- Eden, E. R., *et al.* (2009). "Down-regulation of epidermal growth factor receptor signalling within multivesicular bodies." *Biochem Soc Trans* **37**(Pt 1): 173-177.
- Ellgaard, L. und L. W. Ruddock (2005). "The human protein disulphide isomerase family: substrate interactions and functional properties." *EMBO Rep* **6**(1): 28-32.
- Endres, N. F., *et al.* (2013). "Conformational coupling across the plasma membrane in activation of the EGF receptor." *Cell* **152**(3): 543-556.
- Endres, N. F., *et al.* (2011). "Regulation of the catalytic activity of the EGF receptor." *Curr Opin Struct Biol* **21**(6): 777-784.
- Ennis, B. W., *et al.* (1989). "Anti-epidermal growth factor receptor antibodies inhibit the autocrine-stimulated growth of MDA-468 human breast cancer cells." *Mol Endocrinol* **3**(11): 1830-1838.
- Ermak, G., *et al.* (2003). "Cytotoxic effect of doxycycline and its implications for tet-on gene expression systems." *Anal Biochem* **318**(1): 152-154.
- Evan, G. I., *et al.* (1985). "Isolation of monoclonal antibodies specific for human c-myc proto-oncogene product." *Mol Cell Biol* **5**(12): 3610-3616.
- Fan, Z., *et al.* (1993). "Blockade of epidermal growth factor receptor function by bivalent and monovalent fragments of 225 anti-epidermal growth factor receptor monoclonal antibodies." *Cancer Res* **53**(18): 4322-4328.
- Fedi, P., Ed. (1997). *Growth factors. Cancer Medicine.* Baltimore, MD, Williams and Wilkins.
- Fenstermaker, R. A. und M. J. Ciesielski (2000). "Deletion and tandem duplication of exons 2 - 7 in the epidermal growth factor receptor gene of a human malignant glioma." *Oncogene* **19**(39): 4542-4548.
- Ferguson, K. M., *et al.* (2003). "EGF activates its receptor by removing interactions that autoinhibit ectodomain dimerization." *Mol Cell* **11**(2): 507-517.
- Fiebiger, E., *et al.* (2002). "Visualization of the ER-to-cytosol dislocation reaction of a type I membrane protein." *EMBO J* **21**(5): 1041-1053.
- Fife, R. S. und G. W. Sledge, Jr. (1995). "Effects of doxycycline on in vitro growth, migration, and gelatinase activity of breast carcinoma cells." *J Lab Clin Med* **125**(3): 407-411.
- Filmus, J., *et al.* (1985). "MDA-468, a human breast cancer cell line with a high number of epidermal growth factor (EGF) receptors, has an amplified EGF receptor gene and is growth inhibited by EGF." *Biochem Biophys Res Commun* **128**(2): 898-905.
- Frank, R. (2002). "The SPOT-synthesis technique. Synthetic peptide arrays on membrane supports--principles and applications." *J Immunol Methods* **267**(1): 13-26.
- Franklin, M. C., *et al.* (2004). "Insights into ErbB signaling from the structure of the ErbB2-pertuzumab complex." *Cancer Cell* **5**(4): 317-328.
- Frederick, L., *et al.* (2000). "Diversity and frequency of epidermal growth factor receptor mutations in human glioblastomas." *Cancer Res* **60**(5): 1383-1387.
- Freeman, D. S., J.; Bass, R.; Jung, K.; Ogbagabriel, S.; Elliot, G. Radinsky, R. (2008). Panitumumab and cetuximab epitope mapping and in vitro activity. *ASCO Gastrointestinal Cancers Symposium.*
- Freundlieb, S., *et al.* (1997). "Use of tetracycline-controlled gene expression systems to study mammalian cell cycle." *Methods Enzymol* **283**: 159-173.
- Friedman, L. M., *et al.* (2005). "Synergistic down-regulation of receptor tyrosine kinases by combinations of mAbs: implications for cancer immunotherapy." *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**(6): 1915-1920.
- Garrett, T. P., *et al.* (2002). "Crystal structure of a truncated epidermal growth factor receptor extracellular domain bound to transforming growth factor alpha." *Cell* **110**(6): 763-773.
- Gatz, C. und P. H. Quail (1988). "Tn10-encoded tet repressor can regulate an operator-containing plant promoter." *Proc Natl Acad Sci U S A* **85**(5): 1394-1397.
- Gerstmayr, B., *et al.* (1997). "Costimulation of T cell proliferation by a chimeric B7-2 antibody fusion protein specifically targeted to cells expressing the erbB2 proto-oncogene." *J Immunol* **158**(10): 4584-4590.
- Glover, D. J., *et al.* (2005). "Towards safe, non-viral therapeutic gene expression in humans." *Nat Rev Genet* **6**(4): 299-310.
- Goldstein, N. I., *et al.* (1995). "Biological efficacy of a chimeric antibody to the epidermal growth factor receptor in a human tumor xenograft model." *Clin Cancer Res* **1**(11): 1311-1318.
- Gorgoulis, V., *et al.* (1992). "Expression of EGF, TGF-alpha and EGFR in squamous cell lung carcinomas." *Anticancer Res* **12**(4): 1183-1187.
- Gossen, M., *et al.* (1993). "Control of gene activity in higher eukaryotic cells by prokaryotic regulatory elements." *Trends Biochem Sci* **18**(12): 471-475.
- Gossen, M. und H. Bujard (1992). "Tight control of gene expression in mammalian cells by tetracycline-responsive promoters." *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**(12): 5547-5551.
- Gossen, M., *et al.* (1995). "Transcriptional activation by tetracyclines in mammalian cells." *Science* **268**(5218): 1766-1769.
- Grada, Z., *et al.* (2013). "TanCAR: A Novel Bispecific Chimeric Antigen Receptor for Cancer Immunotherapy." *Mol Ther Nucleic Acids* **2**: e105.
- Grandal, M. V., *et al.* (2007). "EGFRvIII escapes down-regulation due to impaired internalization and sorting to lysosomes." *Carcinogenesis* **28**(7): 1408-1417.
- Grandis, J. R., *et al.* (1998). "Normalization of EGFR mRNA levels following restoration of wild-type p53 in a head and neck squamous cell carcinoma cell line." *Int J Oncol* **13**(2): 375-378.

- Graus-Porta, D., *et al.* (1997). "ErbB-2, the preferred heterodimerization partner of all ErbB receptors, is a mediator of lateral signaling." *EMBO J* **16**(7): 1647-1655.
- Graus-Porta, D., *et al.* (1995). "Single-chain antibody-mediated intracellular retention of ErbB-2 impairs Neu differentiation factor and epidermal growth factor signaling." *Mol Cell Biol* **15**(3): 1182-1191.
- Greaves, M. und C. C. Maley (2012). "Clonal evolution in cancer." *Nature* **481**(7381): 306-313.
- Green, L. L. (1999). "Antibody engineering via genetic engineering of the mouse: XenoMouse strains are a vehicle for the facile generation of therapeutic human monoclonal antibodies." *J Immunol Methods* **231**(1-2): 11-23.
- Grivennikov, S. I. und M. Karin (2010). "Inflammation and oncogenesis: a vicious connection." *Curr Opin Genet Dev* **20**(1): 65-71.
- Grovdal, L. M., *et al.* (2004). "Direct interaction of Cbl with pTyr 1045 of the EGF receptor (EGFR) is required to sort the EGFR to lysosomes for degradation." *Exp Cell Res* **300**(2): 388-395.
- Gschwind, A., *et al.* (2002). "Lysophosphatidic acid-induced squamous cell carcinoma cell proliferation and motility involves epidermal growth factor receptor signal transactivation." *Cancer Res* **62**(21): 6329-6336.
- Gunturu, K. S., *et al.* (2013). "Gastric cancer and trastuzumab: first biologic therapy in gastric cancer." *Ther Adv Med Oncol* **5**(2): 143-151.
- Guo, W. und F. G. Giancotti (2004). "Integrin signalling during tumour progression." *Nat Rev Mol Cell Biol* **5**(10): 816-826.
- Guy, P. M., *et al.* (1994). "Insect cell-expressed p180erbB3 possesses an impaired tyrosine kinase activity." *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**(17): 8132-8136.
- Hadari, Y. R., *et al.* (2004). "The IgG1 monoclonal antibody cetuximab induces degradation of the epidermal growth factor receptor." *J Clin Oncol* **22 abstract 234**.
- Hahn, W. C. (2002). "Immortalization and transformation of human cells." *Mol Cells* **13**(3): 351-361.
- Hampton, R. Y. (2000). "ER stress response: getting the UPR hand on misfolded proteins." *Curr Biol* **10**(14): R518-521.
- Han, W. und H. W. Lo (2012). "Landscape of EGFR-Signaling network in human cancers: biology and therapeutic response in relation to receptor subcellular locations." *Cancer Lett* **318**(2): 124-134.
- Hanahan, D. (1983). "Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids." *J Mol Biol* **166**(4): 557-580.
- Hanahan, D., *et al.* (1996). "Transgenic mouse models of tumour angiogenesis: the angiogenic switch, its molecular controls, and prospects for preclinical therapeutic models." *Eur J Cancer* **32A**(14): 2386-2393.
- Hanahan, D. und R. A. Weinberg (2000). "The hallmarks of cancer." *Cell* **100**(1): 57-70.
- Hanahan, D. und R. A. Weinberg (2011). "Hallmarks of cancer: the next generation." *Cell* **144**(5): 646-674.
- Harari, P. M. (2004). "Epidermal growth factor receptor inhibition strategies in oncology." *Endocr Relat Cancer* **11**(4): 689-708.
- Hart, S., *et al.* (2005). "GPCR-induced migration of breast carcinoma cells depends on both EGFR-Signal transactivation and EGFR-independent pathways." *Biol Chem* **386**(9): 845-855.
- Hartman, Z., *et al.* (2012). "HER2 stabilizes EGFR and itself by altering autophosphorylation patterns in a manner that overcomes regulatory mechanisms and promotes proliferative and transformation signaling." *Oncogene*.
- Hartmann, C., *et al.* (2010). "Peptide mimotopes recognized by antibodies cetuximab and matuzumab induce a functionally equivalent anti-EGFR immune response." *Oncogene* **29**(32): 4517-4527.
- Harwerth, I. M., *et al.* (1992). "Monoclonal antibodies against the extracellular domain of the erbB-2 receptor function as partial ligand agonists." *J Biol Chem* **267**(21): 15160-15167.
- Harwerth, I. M., *et al.* (1993). "Monoclonal antibodies directed to the erbB-2 receptor inhibit in vivo tumour cell growth." *Br J Cancer* **68**(6): 1140-1145.
- Hayflick, L. (1997). "Mortality and immortality at the cellular level. A review." *Biochemistry (Mosc)* **62**(11): 1180-1190.
- Hendriks, B. S., *et al.* (2003). "Coregulation of epidermal growth factor receptor/human epidermal growth factor receptor 2 (HER2) levels and locations: quantitative analysis of HER2 overexpression effects." *Cancer Res* **63**(5): 1130-1137.
- Holbro, T. und N. E. Hynes (2004). "ErbB receptors: directing key signaling networks throughout life." *Annu Rev Pharmacol Toxicol* **44**: 195-217.
- Hsieh, E. T., *et al.* (2000). "Co-expression of epidermal growth factor receptor and transforming growth factor-alpha is independent of ras mutations in lung adenocarcinoma." *Lung Cancer* **29**(2): 151-157.
- Hsu, P. P. und D. M. Sabatini (2008). "Cancer cell metabolism: Warburg and beyond." *Cell* **134**(5): 703-707.
- Huang, S., *et al.* (2004). "Dual-agent molecular targeting of the epidermal growth factor receptor (EGFR): combining anti-EGFR antibody with tyrosine kinase inhibitor." *Cancer Res* **64**(15): 5355-5362.
- Huang, S. F., *et al.* (2004). "High frequency of epidermal growth factor receptor mutations with complex patterns in non-small cell lung cancers related to gefitinib responsiveness in Taiwan." *Clin Cancer Res* **10**(24): 8195-8203.
- Huang, W. C., *et al.* (2011). "Nuclear translocation of epidermal growth factor receptor by Akt-dependent phosphorylation enhances breast cancer-resistant protein expression in gefitinib-resistant cells." *J Biol Chem* **286**(23): 20558-20568.
- Hudziak, R. M., *et al.* (1989). "p185HER2 monoclonal antibody has antiproliferative effects in vitro and sensitizes human breast tumor cells to tumor necrosis factor." *Mol Cell Biol* **9**(3): 1165-1172.
- Hueber, A. O., *et al.* (1997). "Requirement for the CD95 receptor-ligand pathway in c-Myc-induced apoptosis." *Science* **278**(5341): 1305-1309.
- Hughes, J. B., *et al.* (2009). "Pertuzumab increases epidermal growth factor receptor down-regulation by counteracting epidermal growth factor receptor-ErbB2 heterodimerization." *Mol Cancer Ther* **8**(7): 1885-1892.

- Huston, J. S., *et al.* (1988). "Protein engineering of antibody binding sites: recovery of specific activity in an anti-digoxin single-chain Fv analogue produced in *Escherichia coli*." *Proc Natl Acad Sci U S A* **85**(16): 5879-5883.
- Hyland, S. (2003). Generierung und funktionelle Charakterisierung intrazellulärer Antikörperfragmente gerichtet gegen die zytoplasmatische Domäne von Wachstumsfaktor-Rezeptoren der ErbB-Familie. Fachbereich 14. Frankfurt am Main, Johann Wolfgang Goethe Universität. **Dissertation**.
- Hyland, S., *et al.* (2003). "Generation and functional characterization of intracellular antibodies interacting with the kinase domain of human EGF receptor." *Oncogene* **22**(10): 1557-1567.
- Hynes, N. E., *et al.* (1989). "Overexpression of the c-erbB-2 protein in human breast tumor cell lines." *J Cell Biochem* **39**(2): 167-173.
- Hynes, N. E., *et al.* (2001). "The ErbB receptor tyrosine family as signal integrators." *Endocr Relat Cancer* **8**(3): 151-159.
- Hynes, N. E. und H. A. Lane (2005). "ERBB receptors and cancer: the complexity of targeted inhibitors." *Nat Rev Cancer* **5**(5): 341-354.
- Hynes, N. E. und G. MacDonald (2009). "ErbB receptors and signaling pathways in cancer." *Curr Opin Cell Biol* **21**(2): 177-184.
- Imai, K. und A. Takaoka (2006). "Comparing antibody and small-molecule therapies for cancer." *Nat Rev Cancer* **6**(9): 714-727.
- Irish, J. C. und A. Bernstein (1993). "Oncogenes in head and neck cancer." *Laryngoscope* **103**(1 Pt 1): 42-52.
- Jackson, S. P. und J. Bartek (2009). "The DNA-damage response in human biology and disease." *Nature* **461**(7267): 1071-1078.
- Jakovovits, A., *et al.* (2007). "From XenoMouse technology to panitumumab, the first fully human antibody product from transgenic mice." *Nat Biotechnol* **25**(10): 1134-1143.
- Jeschke, M., *et al.* (1995). "Targeted inhibition of tumor-cell growth by recombinant heregulin-toxin fusion proteins." *Int J Cancer* **60**(5): 730-739.
- Jiang, B. H. und L. Z. Liu (2009). "PI3K/PTEN signaling in angiogenesis and tumorigenesis." *Adv Cancer Res* **102**: 19-65.
- Johnson, G. L. und R. R. Vaillancourt (1994). "Sequential protein kinase reactions controlling cell growth and differentiation." *Curr Opin Cell Biol* **6**(2): 230-238.
- Johnson, J. P. (1991). "Cell adhesion molecules of the immunoglobulin supergene family and their role in malignant transformation and progression to metastatic disease." *Cancer Metastasis Rev* **10**(1): 11-22.
- Joliot, A. und A. Prochiantz (2004). "Transduction peptides: from technology to physiology." *Nat Cell Biol* **6**(3): 189-196.
- Jones, G. A. und C. Kent (1991). "The role of protein kinase C in the stimulation of phosphatidylcholine synthesis by phospholipase C." *Arch Biochem Biophys* **288**(2): 331-336.
- Jones, R. G. und C. B. Thompson (2009). "Tumor suppressors and cell metabolism: a recipe for cancer growth." *Genes Dev* **23**(5): 537-548.
- Jorissen, R. N., *et al.* (2003). "Epidermal growth factor receptor: mechanisms of activation and signalling." *Exp Cell Res* **284**(1): 31-53.
- Jura, N., *et al.* (2009). "Mechanism for activation of the EGF receptor catalytic domain by the juxtamembrane segment." *Cell* **137**(7): 1293-1307.
- Kamat, V., *et al.* (2008). "Enhanced EGFR inhibition and distinct epitope recognition by EGFR antagonistic mAbs C225 and 425." *Cancer Biol Ther* **7**(5): 726-733.
- Karunakaran, D., *et al.* (1996). "ErbB-2 is a common auxiliary subunit of NDF and EGF receptors: implications for breast cancer." *EMBO J* **15**(2): 254-264.
- Kawamoto, T., *et al.* (1984). "Relation of epidermal growth factor receptor concentration to growth of human epidermoid carcinoma A431 cells." *J Biol Chem* **259**(12): 7761-7766.
- Kawamoto, T., *et al.* (1983). "Growth stimulation of A431 cells by epidermal growth factor: identification of high-affinity receptors for epidermal growth factor by an anti-receptor monoclonal antibody." *Proc Natl Acad Sci U S A* **80**(5): 1337-1341.
- Kelton, C., *et al.* (2012). "Anti-EGFR biparatopic-SEED antibody has enhanced combination-activity in a single molecule." *Arch Biochem Biophys* **526**(2): 219-225.
- Kim, J., *et al.* (2007). "The phosphoinositide kinase PIKfyve mediates epidermal growth factor receptor trafficking to the nucleus." *Cancer Res* **67**(19): 9229-9237.
- Kimura, H., *et al.* (2007). "Antibody-dependent cellular cytotoxicity of cetuximab against tumor cells with wild-type or mutant epidermal growth factor receptor." *Cancer Sci* **98**(8): 1275-1280.
- Klymkowsky, M. W. und P. Savagner (2009). "Epithelial-mesenchymal transition: a cancer researcher's conceptual friend and foe." *Am J Pathol* **174**(5): 1588-1593.
- Kobayashi, S., *et al.* (2005). "EGFR mutation and resistance of non-small-cell lung cancer to gefitinib." *N Engl J Med* **352**(8): 786-792.
- Kontermann, R. E. (2004). "Intrabodies as therapeutic agents." *Methods* **34**(2): 163-170.
- Kruser, T. J. und D. L. Wheeler (2010). "Mechanisms of resistance to HER family targeting antibodies." *Exp Cell Res* **316**(7): 1083-1100.
- Kurai, J., *et al.* (2007). "Antibody-dependent cellular cytotoxicity mediated by cetuximab against lung cancer cell lines." *Clin Cancer Res* **13**(5): 1552-1561.

- Kuwada, S. K. und X. Li (2000). "Integrin alpha5/beta1 mediates fibronectin-dependent epithelial cell proliferation through epidermal growth factor receptor activation." *Mol Biol Cell* **11**(7): 2485-2496.
- Larbouret, C., *et al.* (2012). "In pancreatic carcinoma, dual EGFR/HER2 targeting with cetuximab/trastuzumab is more effective than treatment with trastuzumab/erlotinib or lapatinib alone: implication of receptors' down-regulation and dimers' disruption." *Neoplasia* **14**(2): 121-130.
- Le Gall, F., *et al.* (1999). "Di-, tri- and tetrameric single chain Fv antibody fragments against human CD19: effect of valency on cell binding." *FEBS Lett* **453**(1-2): 164-168.
- Lemmon, M. A. und J. Schlessinger (2010). "Cell signaling by receptor tyrosine kinases." *Cell* **141**(7): 1117-1134.
- Lenferink, A. E., *et al.* (1998). "Differential endocytic routing of homo- and hetero-dimeric ErbB tyrosine kinases confers signaling superiority to receptor heterodimers." *EMBO J* **17**(12): 3385-3397.
- Levkowitz, G., *et al.* (1998). "c-Cbl/Sli-1 regulates endocytic sorting and ubiquitination of the epidermal growth factor receptor." *Genes Dev* **12**(23): 3663-3674.
- Li, C., *et al.* (2009). "Nuclear EGFR contributes to acquired resistance to cetuximab." *Oncogene* **28**(43): 3801-3813.
- Li, S., *et al.* (2005). "Structural basis for inhibition of the epidermal growth factor receptor by cetuximab." *Cancer Cell* **7**(4): 301-311.
- Li, X., *et al.* (1998). "Generation of destabilized green fluorescent protein as a transcription reporter." *J Biol Chem* **273**(52): 34970-34975.
- Liccardi, G., *et al.* (2011). "EGFR nuclear translocation modulates DNA repair following cisplatin and ionizing radiation treatment." *Cancer Res* **71**(3): 1103-1114.
- Lin, S. Y., *et al.* (2001). "Nuclear localization of EGF receptor and its potential new role as a transcription factor." *Nat Cell Biol* **3**(9): 802-808.
- Ling, Y. H., *et al.* (2009). "Activation of ER stress and inhibition of EGFR N-glycosylation by tunicamycin enhances susceptibility of human non-small cell lung cancer cells to erlotinib." *Cancer Chemother Pharmacol* **64**(3): 539-548.
- Liu, G., *et al.* (2006). "Induced endoplasmic reticulum (ER) stress and binding of over-expressed ER specific chaperone GRP78/BiP with dimerized epidermal growth factor receptor in mammalian cells exposed to low concentration of N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine." *Mutat Res* **596**(1-2): 12-21.
- Lo, A. S., *et al.* (2008). "Intracellular antibodies (intrabodies) and their therapeutic potential." *Handb Exp Pharmacol*(181): 343-373.
- Loew, R., *et al.* (2010). "Improved Tet-responsive promoters with minimized background expression." *BMC Biotechnol* **10**: 81.
- Longva, K. E., *et al.* (2005). "Herceptin-induced inhibition of ErbB2 signaling involves reduced phosphorylation of Akt but not endocytic down-regulation of ErbB2." *Int J Cancer* **116**(3): 359-367.
- Lynch, T. J., *et al.* (2004). "Activating mutations in the epidermal growth factor receptor underlying responsiveness of non-small-cell lung cancer to gefitinib." *N Engl J Med* **350**(21): 2129-2139.
- Mahmud, H., *et al.* (2009). "Induction of programmed cell death in ErbB2/HER2-expressing cancer cells by targeted delivery of apoptosis-inducing factor." *Mol Cancer Ther* **8**(6): 1526-1535.
- Mani, S. A., *et al.* (2008). "The epithelial-mesenchymal transition generates cells with properties of stem cells." *Cell* **133**(4): 704-715.
- Marusyk, A., *et al.* (2009). "Irradiation alters selection for oncogenic mutations in hematopoietic progenitors." *Cancer Res* **69**(18): 7262-7269.
- Massague, J. und A. Pandiella (1993). "Membrane-anchored growth factors." *Annu Rev Biochem* **62**: 515-541.
- Masui, H., *et al.* (1984). "Growth inhibition of human tumor cells in athymic mice by anti-epidermal growth factor receptor monoclonal antibodies." *Cancer Res* **44**(3): 1002-1007.
- Matar, P., *et al.* (2004). "Combined epidermal growth factor receptor targeting with the tyrosine kinase inhibitor gefitinib (ZD1839) and the monoclonal antibody cetuximab (IMC-C225): superiority over single-agent receptor targeting." *Clin Cancer Res* **10**(19): 6487-6501.
- Mayford, M., *et al.* (1996). "Control of memory formation through regulated expression of a CaMKII transgene." *Science* **274**(5293): 1678-1683.
- Meissner, M., *et al.* (2005). "Tetracycline analogue-regulated transgene expression in Plasmodium falciparum blood stages using Toxoplasma gondii transactivators." *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**(8): 2980-2985.
- Mendelsohn, J. und J. Baselga (2000). "The EGF receptor family as targets for cancer therapy." *Oncogene* **19**(56): 6550-6565.
- Meyer-Ficca, M. L., *et al.* (2004). "Comparative analysis of inducible expression systems in transient transfection studies." *Anal Biochem* **334**(1): 9-19.
- Miller, D. G. und A. D. Miller (1994). "A family of retroviruses that utilize related phosphate transporters for cell entry." *J Virol* **68**(12): 8270-8276.
- Mitsudomi, T., *et al.* (2005). "Mutations of the epidermal growth factor receptor gene predict prolonged survival after gefitinib treatment in patients with non-small-cell lung cancer with postoperative recurrence." *J Clin Oncol* **23**(11): 2513-2520.
- Modi, S. und A. D. Seidman (2002). "An update on epidermal growth factor receptor inhibitors." *Curr Oncol Rep* **4**(1): 47-55.

- Moro, L., *et al.* (1998). "Integrins induce activation of EGF receptor: role in MAP kinase induction and adhesion-dependent cell survival." *EMBO J* **17**(22): 6622-6632.
- Moscatoello, D. K., *et al.* (1995). "Frequent expression of a mutant epidermal growth factor receptor in multiple human tumors." *Cancer Res* **55**(23): 5536-5539.
- Müller, N. (2009). Funktionelle Charakterisierung rekombinanter Antikörperfragmente mit Spezifität für die intrazelluläre Domäne des epidermalen Wachstumsfaktor-Rezeptors. Fachbereich 14. Frankfurt am Main, Johann Wolfgang Goethe Universität. **Diplomarbeit.**
- Musolino, A., *et al.* (2008). "Immunoglobulin G fragment C receptor polymorphisms and clinical efficacy of trastuzumab-based therapy in patients with HER-2/neu-positive metastatic breast cancer." *J Clin Oncol* **26**(11): 1789-1796.
- Mutschler, E. G., G.; Kroemer, H.K.; Schäfer-Kortinger, M. (2001). *Arzneimittelwirkungen-Lehrbuch der Pharmakologie und Toxikologie.* Stuttgart, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH.
- Negrini, S., *et al.* (2010). "Genomic instability--an evolving hallmark of cancer." *Nat Rev Mol Cell Biol* **11**(3): 220-228.
- Nicholson, R. I., *et al.* (2001). "EGFR and cancer prognosis." *Eur J Cancer* **37 Suppl 4**: S9-15.
- Normanno, N., *et al.* (2002). "Cooperative inhibitory effect of ZD1839 (Iressa) in combination with trastuzumab (Herceptin) on human breast cancer cell growth." *Ann Oncol* **13**(1): 65-72.
- Nowell, P. C. (1976). "The clonal evolution of tumor cell populations." *Science* **194**(4260): 23-28.
- Ogiso, H., *et al.* (2002). "Crystal structure of the complex of human epidermal growth factor and receptor extracellular domains." *Cell* **110**(6): 775-787.
- Okamoto, I., *et al.* (2003). "Expression of constitutively activated EGFRvIII in non-small cell lung cancer." *Cancer Sci* **94**(1): 50-56.
- Olapade-Olaopa, E. O., *et al.* (2000). "Evidence for the differential expression of a variant EGF receptor protein in human prostate cancer." *Br J Cancer* **82**(1): 186-194.
- Olayioye, M. A., *et al.* (2000). "The ErbB signaling network: receptor heterodimerization in development and cancer." *EMBO J* **19**(13): 3159-3167.
- Old, L. J. und E. A. Boyse (1964). "Immunology of Experimental Tumors." *Annu Rev Med* **15**: 167-186.
- Ou, S. H. (2012). "Second-generation irreversible epidermal growth factor receptor (EGFR) tyrosine kinase inhibitors (TKIs): a better mousetrap? A review of the clinical evidence." *Crit Rev Oncol Hematol* **83**(3): 407-421.
- Paez, J. G., *et al.* (2004). "EGFR mutations in lung cancer: correlation with clinical response to gefitinib therapy." *Science* **304**(5676): 1497-1500.
- Pao, W. und V. A. Miller (2005). "Epidermal growth factor receptor mutations, small-molecule kinase inhibitors, and non-small-cell lung cancer: current knowledge and future directions." *J Clin Oncol* **23**(11): 2556-2568.
- Paulus, W., *et al.* (1996). "Self-contained, tetracycline-regulated retroviral vector system for gene delivery to mammalian cells." *J Virol* **70**(1): 62-67.
- Pavelka, M. und A. Ellinger (1985). "Localization of binding sites for concanavalin A, Ricinus communis I and Helix pomatia lectin in the Golgi apparatus of rat small intestinal absorptive cells." *J Histochem Cytochem* **33**(9): 905-914.
- Pawson, T., *et al.* (1993). "Proteins with SH2 and SH3 domains couple receptor tyrosine kinases to intracellular signalling pathways." *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* **340**(1293): 279-285.
- Pedersen, M. W., *et al.* (2010). "Sym004: a novel synergistic anti-epidermal growth factor receptor antibody mixture with superior anticancer efficacy." *Cancer Res* **70**(2): 588-597.
- Pedersen, M. W., *et al.* (2005). "Analysis of the epidermal growth factor receptor specific transcriptome: effect of receptor expression level and an activating mutation." *J Cell Biochem* **96**(2): 412-427.
- Pedersen, M. W., *et al.* (2004). "Expression of a naturally occurring constitutively active variant of the epidermal growth factor receptor in mouse fibroblasts increases motility." *Int J Cancer* **108**(5): 643-653.
- Pene, F., *et al.* (2002). "Role of the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt and mTOR/P70S6-kinase pathways in the proliferation and apoptosis in multiple myeloma." *Oncogene* **21**(43): 6587-6597.
- Perrotte, P., *et al.* (1999). "Anti-epidermal growth factor receptor antibody C225 inhibits angiogenesis in human transitional cell carcinoma growing orthotopically in nude mice." *Clin Cancer Res* **5**(2): 257-265.
- Petit, A. M., *et al.* (1997). "Neutralizing antibodies against epidermal growth factor and ErbB-2/neu receptor tyrosine kinases down-regulate vascular endothelial growth factor production by tumor cells in vitro and in vivo: angiogenic implications for signal transduction therapy of solid tumors." *Am J Pathol* **151**(6): 1523-1530.
- Pietras, A. (2011). "Cancer stem cells in tumor heterogeneity." *Adv Cancer Res* **112**: 255-281.
- Plati, J., *et al.* (2008). "Dysregulation of apoptotic signaling in cancer: molecular mechanisms and therapeutic opportunities." *J Cell Biochem* **104**(4): 1124-1149.
- Qian, B. Z. und J. W. Pollard (2010). "Macrophage diversity enhances tumor progression and metastasis." *Cell* **141**(1): 39-51.
- Ramalingam, S. S., *et al.* (2011). "Randomized phase II study of erlotinib in combination with placebo or R1507, a monoclonal antibody to insulin-like growth factor-1 receptor, for advanced-stage non-small-cell lung cancer." *J Clin Oncol* **29**(34): 4574-4580.
- Reilly, R. M., *et al.* (1995). "Problems of delivery of monoclonal antibodies. Pharmaceutical and pharmacokinetic solutions." *Clin Pharmacokinet* **28**(2): 126-142.
- Reineke, U., *et al.* (2001). "Applications of peptide arrays prepared by the SPOT-technology." *Curr Opin Biotechnol* **12**(1): 59-64.

- Reiss, M., *et al.* (1991). "Activation of the autocrine transforming growth factor alpha pathway in human squamous carcinoma cells." *Cancer Res* **51**(23 Pt 1): 6254-6262.
- Richardson, J. H., *et al.* (1998). "Intrabody-mediated knockout of the high-affinity IL-2 receptor in primary human T cells using a bicistronic lentivirus vector." *Gene Ther* **5**(5): 635-644.
- Riese, D. J., 2nd und D. F. Stern (1998). "Specificity within the EGF family/ErbB receptor family signaling network." *Bioessays* **20**(1): 41-48.
- Roovers, R. C., *et al.* (2011). "A biparatopic anti-EGFR nanobody efficiently inhibits solid tumour growth." *Int J Cancer* **129**(8): 2013-2024.
- Ross, J. S. und J. A. Fletcher (1998). "The HER-2/neu Oncogene in Breast Cancer: Prognostic Factor, Predictive Factor, and Target for Therapy." *Oncologist* **3**(4): 237-252.
- Rusch, V., *et al.* (1997). "Overexpression of the epidermal growth factor receptor and its ligand transforming growth factor alpha is frequent in resectable non-small cell lung cancer but does not predict tumor progression." *Clin Cancer Res* **3**(4): 515-522.
- Sahm, C., *et al.* (2012). "Expression of IL-15 in NK cells results in rapid enrichment and selective cytotoxicity of gene-modified effectors that carry a tumor-specific antigen receptor." *Cancer Immunol Immunother* **61**(9): 1451-1461.
- Saikali, Z. und G. Singh (2003). "Doxycycline and other tetracyclines in the treatment of bone metastasis." *Anticancer Drugs* **14**(10): 773-778.
- Salomon, D. S., *et al.* (1995). "Epidermal growth factor-related peptides and their receptors in human malignancies." *Crit Rev Oncol Hematol* **19**(3): 183-232.
- Samali, A., *et al.* (2010). "Methods for monitoring endoplasmic reticulum stress and the unfolded protein response." *Int J Cell Biol* **2010**: 830307.
- Sato, J. D., *et al.* (1983). "Biological effects in vitro of monoclonal antibodies to human epidermal growth factor receptors." *Mol Biol Med* **1**(5): 511-529.
- Sato, K., *et al.* (1995). "c-Src phosphorylates epidermal growth factor receptor on tyrosine 845." *Biochem Biophys Res Commun* **215**(3): 1078-1087.
- Schechter, A. L., *et al.* (1984). "The neu oncogene: an erb-B-related gene encoding a 185,000-Mr tumour antigen." *Nature* **312**(5994): 513-516.
- Schlessinger, J. (2000). "Cell signaling by receptor tyrosine kinases." *Cell* **103**(2): 211-225.
- Schlessinger, J. (2004). "Common and distinct elements in cellular signaling via EGF and FGF receptors." *Science* **306**(5701): 1506-1507.
- Schmidt, M., *et al.* (1999). "Suppression of metastasis formation by a recombinant single chain antibody-toxin targeted to full-length and oncogenic variant EGF receptors." *Oncogene* **18**(9): 1711-1721.
- Schmidt, M., *et al.* (1997). "Construction and functional characterization of scFv(14E1)-ETA - a novel, highly potent antibody-toxin specific for the EGF receptor." *Br J Cancer* **75**(11): 1575-1584.
- Schonig, K., *et al.* (2013). "Tet-Transgenic Rodents: a comprehensive, up-to date database." *Transgenic Res* **22**(2): 251-254.
- Schreiber, R. D., *et al.* (2011). "Cancer immunoediting: integrating immunity's roles in cancer suppression and promotion." *Science* **331**(6024): 1565-1570.
- Schulze, W. X., *et al.* (2005). "Phosphotyrosine interactome of the ErbB-receptor kinase family." *Mol Syst Biol* **1**: 2005 0008.
- Semenza, G. L. (2010). "HIF-1: upstream and downstream of cancer metabolism." *Curr Opin Genet Dev* **20**(1): 51-56.
- Sequist, L. V., *et al.* (2011). "Randomized phase II study of erlotinib plus vandetanib versus erlotinib plus placebo in previously treated non-small-cell lung cancer." *J Clin Oncol* **29**(24): 3307-3315.
- Shah, N. P. und C. L. Sawyers (2003). "Mechanisms of resistance to STI571 in Philadelphia chromosome-associated leukemias." *Oncogene* **22**(47): 7389-7395.
- Shaki-Loewenstein, S., *et al.* (2005). "A universal strategy for stable intracellular antibodies." *J Immunol Methods* **303**(1-2): 19-39.
- Sherr, C. J. und F. McCormick (2002). "The RB and p53 pathways in cancer." *Cancer Cell* **2**(2): 103-112.
- Shigematsu, H., *et al.* (2005). "Somatic mutations of the HER2 kinase domain in lung adenocarcinomas." *Cancer Res* **65**(5): 1642-1646.
- Shnyder, S. D. und M. J. Hubbard (2002). "ERp29 is a ubiquitous resident of the endoplasmic reticulum with a distinct role in secretory protein production." *J Histochem Cytochem* **50**(4): 557-566.
- Soderquist, A. M. und G. Carpenter (1984). "Glycosylation of the epidermal growth factor receptor in A-431 cells. The contribution of carbohydrate to receptor function." *J Biol Chem* **259**(20): 12586-12594.
- Sok, J. C., *et al.* (2006). "Mutant epidermal growth factor receptor (EGFRvIII) contributes to head and neck cancer growth and resistance to EGFR targeting." *Clin Cancer Res* **12**(17): 5064-5073.
- Sorkin, A. und L. K. Goh (2009). "Endocytosis and intracellular trafficking of ErbBs." *Exp Cell Res* **315**(4): 683-696.
- Spangler, J. B., *et al.* (2010). "Combination antibody treatment down-regulates epidermal growth factor receptor by inhibiting endosomal recycling." *Proc Natl Acad Sci U S A* **107**(30): 13252-13257.
- Sporn, M. B. und G. J. Todaro (1980). "Autocrine secretion and malignant transformation of cells." *N Engl J Med* **303**(15): 878-880.
- Stephens, P., *et al.* (2004). "Lung cancer: intragenic ERBB2 kinase mutations in tumours." *Nature* **431**(7008): 525-526.
- Stocks, M. R. (2004). "Intrabodies: production and promise." *Drug Discov Today* **9**(22): 960-966.

- Stover, D. R., *et al.* (1995). "Src phosphorylation of the epidermal growth factor receptor at novel sites mediates receptor interaction with Src and P85 alpha." *J Biol Chem* **270**(26): 15591-15597.
- Sunada, H., *et al.* (1986). "Monoclonal antibody against epidermal growth factor receptor is internalized without stimulating receptor phosphorylation." *Proc Natl Acad Sci U S A* **83**(11): 3825-3829.
- Thien, C. B. und W. Y. Langdon (1997). "EGF receptor binding and transformation by v-cbl is ablated by the introduction of a loss-of-function mutation from the *Caenorhabditis elegans* sli-1 gene." *Oncogene* **14**(18): 2239-2249.
- Turano, C., *et al.* (2002). "Proteins of the PDI family: unpredicted non-ER locations and functions." *J Cell Physiol* **193**(2): 154-163.
- Uherek, C., *et al.* (2002). "Retargeting of natural killer-cell cytolytic activity to ErbB2-expressing cancer cells results in efficient and selective tumor cell destruction." *Blood* **100**(4): 1265-1273.
- Umekita, Y., *et al.* (2000). "Co-expression of epidermal growth factor receptor and transforming growth factor-alpha predicts worse prognosis in breast-cancer patients." *Int J Cancer* **89**(6): 484-487.
- Urlinger, S., *et al.* (2000). "Exploring the sequence space for tetracycline-dependent transcriptional activators: novel mutations yield expanded range and sensitivity." *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**(14): 7963-7968.
- van Engeland, M., *et al.* (1998). "Annexin V-affinity assay: a review on an apoptosis detection system based on phosphatidylserine exposure." *Cytometry* **31**(1): 1-9.
- Varner, J. A. und D. A. Cheresh (1996). "Integrins and cancer." *Curr Opin Cell Biol* **8**(5): 724-730.
- Vesely, M. D., *et al.* (2011). "Natural innate and adaptive immunity to cancer." *Annu Rev Immunol* **29**: 235-271.
- Vieira, A. V., *et al.* (1996). "Control of EGF receptor signaling by clathrin-mediated endocytosis." *Science* **274**(5295): 2086-2089.
- Vivanco, I., *et al.* (2012). "Differential sensitivity of glioma- versus lung cancer-specific EGFR mutations to EGFR kinase inhibitors." *Cancer Discov* **2**(5): 458-471.
- Wada, T., *et al.* (1990). "Intermolecular association of the p185neu protein and EGF receptor modulates EGF receptor function." *Cell* **61**(7): 1339-1347.
- Wainberg, Z. und J. R. Hecht (2006). "Panitumumab in colon cancer: a review and summary of ongoing trials." *Expert Opin Biol Ther* **6**(11): 1229-1235.
- Wainberg, Z. A. und J. R. Hecht (2007). "Panitumumab in colorectal cancer." *Expert Rev Anticancer Ther* **7**(7): 967-973.
- Wang, S., *et al.* (2012). "Effective suppression of breast tumor growth by an anti-EGFR/ErbB2 bispecific antibody." *Cancer Lett* **325**(2): 214-219.
- Wang, S., *et al.* (2001). "Conditional gene expression in human intracranial xenograft tumors." *Biotechniques* **31**(1): 196-202.
- Wang, S. C., *et al.* (2006). "Tyrosine phosphorylation controls PCNA function through protein stability." *Nat Cell Biol* **8**(12): 1359-1368.
- Wang, Y. V., *et al.* (2005). "Identification in vivo of different rate-limiting steps associated with transcriptional activators in the presence and absence of a GAGA element." *Mol Cell Biol* **25**(9): 3543-3552.
- Wang, Z., *et al.* (1999). "Endocytosis deficiency of epidermal growth factor (EGF) receptor-ErbB2 heterodimers in response to EGF stimulation." *Mol Biol Cell* **10**(5): 1621-1636.
- Wanner, G., *et al.* (2008). "Activation of protein kinase Cepsilon stimulates DNA-repair via epidermal growth factor receptor nuclear accumulation." *Radiother Oncol* **86**(3): 383-390.
- Warburg, O. (1956). "On the origin of cancer cells." *Science* **123**(3191): 309-314.
- Waterman, H., *et al.* (2002). "A mutant EGF-receptor defective in ubiquitylation and endocytosis unveils a role for Grb2 in negative signaling." *EMBO J* **21**(3): 303-313.
- Weber, F., *et al.* (2005). "Transforming growth factor-beta1 immobilises dendritic cells within skin tumours and facilitates tumour escape from the immune system." *Cancer Immunol Immunother* **54**(9): 898-906.
- Weinberg, R. A. (1995). "The retinoblastoma protein and cell cycle control." *Cell* **81**(3): 323-330.
- Wells, A., *et al.* (1990). "Ligand-induced transformation by a noninternalizing epidermal growth factor receptor." *Science* **247**(4945): 962-964.
- Wels, W., *et al.* (1995). "EGF receptor and p185erbB-2-specific single-chain antibody toxins differ in their cell-killing activity on tumor cells expressing both receptor proteins." *Int J Cancer* **60**(1): 137-144.
- Wels, W., *et al.* (2004). "Recombinant immunotoxins and retargeted killer cells: employing engineered antibody fragments for tumor-specific targeting of cytotoxic effectors." *Cancer Immunol Immunother* **53**(3): 217-226.
- Wels, W., *et al.* (1992). "Selective inhibition of tumor cell growth by a recombinant single-chain antibody-toxin specific for the erbB-2 receptor." *Cancer Res* **52**(22): 6310-6317.
- Wilson, K. J., *et al.* (2009). "Functional selectivity of EGF family peptide growth factors: implications for cancer." *Pharmacol Ther* **122**(1): 1-8.
- Wissner, A. und T. S. Mansour (2008). "The development of HKI-272 and related compounds for the treatment of cancer." *Arch Pharm (Weinheim)* **341**(8): 465-477.
- Wong, A. J., *et al.* (1992). "Structural alterations of the epidermal growth factor receptor gene in human gliomas." *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**(7): 2965-2969.
- Worthylake, R., *et al.* (1999). "ErbB-2 amplification inhibits down-regulation and induces constitutive activation of both ErbB-2 and epidermal growth factor receptors." *J Biol Chem* **274**(13): 8865-8874.

- Wu, X., *et al.* (1995). "Apoptosis induced by an anti-epidermal growth factor receptor monoclonal antibody in a human colorectal carcinoma cell line and its delay by insulin." *J Clin Invest* **95**(4): 1897-1905.
- Wu, X., *et al.* (1996). "Involvement of p27KIP1 in G1 arrest mediated by an anti-epidermal growth factor receptor monoclonal antibody." *Oncogene* **12**(7): 1397-1403.
- Xie, J., *et al.* (2008). "A comparative study examining the cytotoxicity of inducible gene expression system ligands in different cell types." *Toxicol In Vitro* **22**(1): 261-266.
- Xie, Y. und M. C. Hung (1994). "Nuclear localization of p185neu tyrosine kinase and its association with transcriptional transactivation." *Biochem Biophys Res Commun* **203**(3): 1589-1598.
- Yano, S., *et al.* (2003). "Distribution and function of EGFR in human tissue and the effect of EGFR tyrosine kinase inhibition." *Anticancer Res* **23**(5A): 3639-3650.
- Yao, Y., *et al.* (2010). "Mitochondrially localized EGFR is independent of its endocytosis and associates with cell viability." *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)* **42**(11): 763-770.
- Yarden, Y. (2001). "The EGFR family and its ligands in human cancer. signalling mechanisms and therapeutic opportunities." *Eur J Cancer* **37 Suppl 4**: S3-8.
- Yarden, Y. und M. X. Sliwkowski (2001). "Untangling the ErbB signalling network." *Nat Rev Mol Cell Biol* **2**(2): 127-137.
- Yuan, T. L. und L. C. Cantley (2008). "PI3K pathway alterations in cancer: variations on a theme." *Oncogene* **27**(41): 5497-5510.
- Zandi, R., *et al.* (2007). "Mechanisms for oncogenic activation of the epidermal growth factor receptor." *Cell Signal* **19**(10): 2013-2023.
- Zhang, X., *et al.* (2006). "An allosteric mechanism for activation of the kinase domain of epidermal growth factor receptor." *Cell* **125**(6): 1137-1149.
- Zufferey, R., *et al.* (1997). "Multiply attenuated lentiviral vector achieves efficient gene delivery in vivo." *Nat Biotechnol* **15**(9): 871-875.

6 Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
ADCC	Antikörper-abhängige, Zell-vermittelten Zytotoxizität
AF	AlexaFluor®
Akt	Serin/Threoninkinase (PKB, Proteinkinase B)
Amp	Ampicillin
APC	Allophycocyanin
AR	Amphiregulin
AS	Aminosäure
ATP	Adenosintriphosphat
Bad	<i>Bcl-2-associated death promoter</i>
BC	Brustkrebs
BSA	bovines Serumalbumin
BTC	Betacellulin
CDR	<i>complementarity determining region</i>
CLSM	<i>Confocal laserscanning microscopy</i> , konfokale Laserscanning Mikroskopie
cm	Zentimeter
Co-IP	Co-Immunpräzipitation
Con A	Concanavalin A
DAG	Diacylglycerin
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxynukleinsäure
Dox	Doxycyclin
DPBS	<i>Dulbecco's Phosphate Buffered Saline</i>
ECD	<i>extracellular domain</i> , extrazelluläre Domäne
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGF	<i>epidermal growth factor</i> , epidermaler Wachstumsfaktor
EGFP	<i>enhanced green fluorescent protein</i>
EGFR	<i>epidermal growth factor receptor</i> , Epidermaler Wachstumsfaktor-Rezeptor
EMT	<i>epithelial-to-mesenchymal transition</i>
EPR	Epiregulin
ER	endoplasmatisches Retikulum
ERK	<i>extracellular-signal regulated kinases</i>
FBS	fötales bovines Serum
FDA	<i>U.S. Food and Drug administration</i>
GALV	<i>gibbon ape leukemia virus</i>
GBM	Glioblastom
GDP	Guanosindiphosphat
GPCR	G Protein-gekoppelter Rezeptor
Grb2	<i>Growth factor receptor binding protein 2</i>
GTP	Guanosintriphosphat
h	Stunde
HB-EGF	Heparin-bindenden EGF-ähnlichen Wachstumsfaktor
HNC	Kopf- und Halskrebs
ICD	<i>intracellular domain</i> , intrazelluläre Domäne
Ig	Immunglobulin
IP ₃	Inositol-1,4,5-trisphosphat
IPTG	Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid

IRES	interne ribosomale Eintrittsstelle
JM	juxtamembran
JNK	Januskinase
kDa	Kilodalton
KV	Kristallviolett
mA	Milliampère
mAk	monoklonaler Antikörper
MAPK	<i>mitogen-activated protein kinase</i>
MEK	<i>mitogen-activated protein kinase kinase</i>
MFI	<i>mean fluorescence intensity</i> , Mittlere Fluoreszenzintensität
mg	Milligramm
min	Minute
ml	Milliliter
mM	Millimolar
µl	Mikroliter
µM	Mikromolar
MNNG	Methylnitrosoguanidine
mRNA	<i>messenger</i> Ribonukleinsäure
mTOR	<i>mammalian target of Rapamycin</i>
mTORC	<i>mammalian target of Rapamycin Complex 1</i>
MTT	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid
MVB	<i>multivesicular bodies</i>
ng	Nanogramm
NRG	Neuregulin
NSCLC	<i>non-small-cell lung cancer</i> , nicht-kleinzelliges Bronchialkarzinom
OP	Eierstockkrebs
PC	Prostatakrebs
PCR	Polymerase-Ketten-Reaktion
PDI	Proteindisulfidisomerase
PDK1	<i>Phosphoinositide-dependent kinase 1</i>
PEI	Polyethylenimin
PGK	Phosphoglyceratkinase
PI3K	Phosphoinositid-3-Kinase
PIP2	Phosphatidylinositol-4,5-Bisphosphat
PIP3	Phosphatidylinositol-3,4,5-Triphosphat
PKC	Proteinkinase C
PLC γ	Phospholipase C γ
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
pRb	Retinoblastoma-assoziiertes Protein
PTB	Phosphotyrosinbindungsdomäne
PTEN	<i>Phosphatase und Tensin homolog</i>
PTP	Phosphotyrosinphosphatase
pTyr	Phosphotyrosin
Puro	Puromycin
Raf	<i>rapidly growing fibrosarcoma</i>
Ras	<i>Rat sarcoma</i>
RNA	Ribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur
RTK	Rezeptortyrosinkinase
rtTA	reverser Tetracyclin-kontrollierter Transaktivator (M2)
SA-AP	Streptavidin-alkalische Phosphatase Konjugat

scFv	<i>single chain fragment variable</i>
SFFV	<i>spleen focus forming Virus</i>
SH2	Src Homologie 2
Shc	<i>Src homologous and collagen</i>
SHP-1	<i>SH2 domain-containing phosphatase-1</i>
sog.	sogenannt
SOS	<i>son-of-sevenless</i>
SP	Signalpeptid
Src	<i>cellular and sarcoma</i> , Sarcoma Kinase
STAT	<i>signal transducers and activators of transcription</i>
STII	Strep-tag II
ST-HRP	StreptTactin®-Horseradish peroxidase, StrepTactin®-Merrettichperoxidase
Tab.	Tabelle
Tet	Tetracyclin
TGF α	transformierende Wachstumsfaktor α
TKD	Tyrosinkinasedomäne
TKI	Tyrosinkinase-Inhibitor
TMD	Transmembrandomäne
tTA	Tetracyclin-kontrollierter Transaktivator
Tyr	Tyrosin
U	Unit
u.a.	unter anderem
v.a.	vor allem
vgl.	vergleiche
VSV	Vesikuläres Stomatitis Virus
wt	Wildtyp
z.B.	zum Beispiel
z.T.	zum Teil

Danksagung

Ich danke Herrn Prof. Dr. Winfried Wels für die Bereitstellung des interessanten Themas, für die stetige Unterstützung meiner Arbeit und für die Ratschläge zur Vollendung dieser Dissertation.

Als Betreuer meiner Doktorarbeit seitens des Fachbereichs 14 der Universität bedanke ich mich bei Herrn Prof. Dr. Volker Dötsch.

Für die fachliche sowie materielle Unterstützung und Kooperation bei dieser Arbeit bedanke ich mich bei PD Dr. Joachim Koch, Dr. Manuel Grez und Dr. Jörn Lausen.

Dr. Andrea Kinner danke ich herzlich für ein immer offenes Ohr bei Fragen zu dem Tet-on System und für die Einführung in die konfokale Laserscanning Mikroskopie.

Für die Hilfe bei der FACS-basierten Zellseparation danke ich Dr. Stefan Stein, Tefik Merovci und Thorsten Geyer.

Mein herzlicher Dank geht außerdem an alle aktuellen und ehemaligen Mitglieder der Arbeitsgruppe, die mich ständig unterstützt haben: Dr. Ute Burkhardt, Sophia Cichutek, Anibal Delgado Masso, Miriam Friede, Lisa Marie Gottron, Dr. Cord Hartmann, Jennifer Hüllelein, Dr. Robert Jabulowsky, Dr. Vera Jakobi, Dr. Björn-Philipp Kloke, Dr. Pranav Oberoi, Barbara Uherek, Dr. Congcong Zhang. Besonderer Dank geht aber an Sabrina Genßler, Thorsten Geyer, Sarah Oelsner, Annemarie Schimpf, sowie Dr. Christiane Schönfeld und Dr. Kurt Schönfeld. Danke für euer immer offenes Ohr, wenn mal wieder etwas nicht so lief wie es sollte. Wer weiß, ob ich ohne euch überhaupt eine Danksagung schreiben müsste. In euch habe ich nicht nur Kollegen, sondern Freunde gefunden. Dir Christiane danke ich außerdem für dein Engagement bei der Korrektur dieser Arbeit.

Bei den aktuellen und ehemaligen Mitarbeitern des GSH bedanke ich mich für die immer angenehme, ja oft freundschaftliche Zusammenarbeit.

Abschließend, aber für mich am aller wichtigsten, danke ich meinen Eltern, meiner Familie und Klaus, die mich in allen Belangen stets und kompromisslos unterstützt haben und mir den Halt gegeben haben, der nötig war, um diese Arbeit zu vollenden. Bei meinen Freunden, die in letzter Zeit sehr zurückstecken mussten, bedanke ich mich für ihre Geduld und Unterstützung.

Publikationen

Veröffentlichungen

Müller, N., Hartmann, C., Genßler, S., Koch, J., Kinner, A., Grez, M. and Wels, WS.

A bispecific transmembrane antibody simultaneously targeting intra- and extracellular epitopes of the epidermal growth factor receptor inhibits receptor activation and tumor cell growth (eingereicht)

Hartmann, C., Müller, N., Blaukat, A., Koch, J., Benhar, I. and Wels, WS. (2010). Peptide mimotopes recognized by antibodies cetuximab and matuzumab induce a functionally equivalent anti-EGFR immune response. *Oncogene* **29**: 4517-4527

Ausgewählte Posterpräsentationen

Nina Müller, Sabrina Genßler, Joachim Koch, Andrea Kinner, Manuel Grez, Cord Hartmann, Winfried Wels (2013)

“Simultaneous targeting of intracellular and extracellular EGFR epitopes with a novel dual-specificity transmembrane antibody“

5th UCT Science Day, Frankfurt am Main

Nina Müller, Sabrina Genßler, Joachim Koch, Andrea Kinner, Manuel Grez, Cord Hartmann, Winfried S. Wels (2012)

“In-N-Out binder: Simultaneous targeting of intracellular and extracellular EGFR epitopes with a novel dual-specificity transmembrane antibody”

GSH Retreat, Löwenstein

Nina Müller, Cord Hartmann, Joachim Koch, Yonathan L. Deribe, Ivan Dikic, Winfried S. Wels (2012)

“Antibody-fusion proteins targeting the intracellular domain of epidermal growth factor receptor”

8th Fabisch Symposium, Berlin

Nina Müller, Cord Hartmann, Yonathan Lissanu Deribe, Joachim Koch, Ivan Dikic, Winfried S. Wels (2011)

“Antibody-fusion proteins targeting the intracellular domain of epidermal growth factor receptor”

16th AEK Cancer Congress, Düsseldorf