

Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf

Klinik und Poliklinik für Allgemein-, Viszeral- und Thoraxchirurgie

Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. Prof. h. c. Dr. h. c. J. R. Izbicki

Evaluierung der Bindungsaktivität und der Stabilität des scFv 6H8 an die magenkarzinomspezifische Mutante E-Cadherin $\Delta 9$

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Zahnmedizin
an der Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg

vorgelegt von:

Malwina Diana Filipek M.Sc.

Bremen 2020

Angenommen von der

Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg am: 21.10.2020

Veröffentlicht mit Genehmigung der
Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg.

Prüfungsausschuss, der/die Vorsitzende:

PD Dr. Michael Tachezy

Prüfungsausschuss, zweite/r Gutachter/in:

Prof. Dr. Klaus Pantel

Für meine Eltern

Mirella † und Georg Filipek

INHALTSVERZEICHNIS

	<u>Seite</u>
ABBILDUNGSVERZEICHNIS _____	VI
TABELLENVERZEICHNIS _____	IX
1 EINLEITUNG _____	1
1.1 Das Magenkarzinom	1
1.1.1 Risikofaktoren	2
1.1.2 Symptome und Diagnostik	3
1.1.3 Klassifikation	4
1.1.4 Metastasierungsmuster	9
1.1.5 Therapie	10
1.2 Adhäsionsmoleküle als Zielstrukturen bei der Behandlung maligner Erkrankungen	12
1.2.1 Zelladhäsion und Zelladhäsionsmoleküle	12
1.2.2 Funktion und Klassifikation der Cadherine	12
1.2.3 Das E-Cadherin	13
1.2.4 Mutation des E-Cadherin	14
1.2.5 Die magenkarzinomspezifische Mutante E-Cadherin $\Delta 9$	14
1.2.6 EpCAM als Tumorantigen	14
1.3 Das Immunsystem als therapeutischer Schlüsselmechanismus bei malignen Erkrankungen	15
1.3.1 Antikörper: Funktion, Struktur und spezifische Antikörper	16
1.3.2 Bispezifische Antikörper als Immuntherapeutika	20
1.3.3 Triplebody	21
1.3.4 Bereits zugelassene monoklonale sowie bispezifische Antikörpertherapeutika	22
2 ZIELSETZUNG DIESER ARBEIT _____	24
3 METHODEN UND MATERIAL _____	25
3.1 Material	25
3.1.1 In dieser Arbeit verwendete Verbrauchsmaterialien	25
3.1.2 In dieser Arbeit verwendete Geräte	26
3.1.3 Software	27
3.1.4 Allgemeine Chemikalien	27
3.1.4.1 Standardlösungen, Standards und Kits	27
3.1.4.2 Puffersorten	28
3.1.5 Zellkulturen/Zelllinien	29
3.1.6 Zellkulturmedien	29
3.1.7 Antikörper und Färbereagenzien	30
3.2 Methoden	30
3.2.1 Molekularbiologische Methoden	30
3.2.1.1 Kultivierung und Konservierung von E.-coli-Stämmen	30
3.2.1.2 Transformation von E. coli mit Plasmid-DNA	30
3.2.1.3 DNA-Isolierung aus E.-Coli-Stämmen	31
3.2.1.4 DNA-Mutagenese	31

3.2.2	Zellbiologische Methoden	32
3.2.2.1	Kultivierung eukaryotischer Zellen	32
3.2.2.2	Transfektion eukaryotischer Zellen HEK 293T	33
3.2.3	Histologische Methoden	33
3.2.3.1	Vorbereitung der Objektträger	33
3.2.3.2	Immunhistochemie	33
3.2.4	Allgemeine proteinbiochemische Methoden	34
3.2.4.1	SDS-PAGE (SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese)	34
3.2.4.2	Produktion und Reinigung von Proteinen	35
3.2.4.3	Aufzucht, Induktion und Ernte von Kulturen im Schüttelkolben	35
3.2.4.4	Western Blot	36
3.2.4.5	Affinitätschromatografie	37
4	ERGEBNISSE	38
4.1	Produktion, Aufreinigung und funktionelle Charakterisierung des rekombinanten Single-Chain-Fragmentes 6H8	38
4.2	Konstruktion des Expressionsvektors für die bakterielle Produktion des E-Cadherin- Δ 9-spezifischen Fragmentes scFv 6H8	38
4.2.1	Aufreinigung und Detektion in der SDS-PAGE	39
4.3	Herstellung der Mutante E-Cadherin Δ 9 für funktionelle Assays	40
4.3.1	Herstellung pDESTeCadherin Δ 9 aus pENTReCadherin	41
4.4	Bindungsnachweis des scFv 6H8 an E-Cadherin Δ 9	43
4.4.1	Western Blot	44
4.5	Konstruktion des Expressionsvektors für die bakterielle Produktion eines EpCAM-spezifischen scFv-Fragmentes	44
4.5.1	Aufreinigung und Detektion mittels SDS-PAGE	45
5	DISKUSSION	49
5.1	Bewertung der Relevanz bispezifischer Antikörperfragmente	49
5.2	EpCAM sowie E-Cadherin Δ 9 als tumorassoziierte Antigene	51
5.3	Bewertung des Triplebody und seiner therapielevanten Einsatzmöglichkeiten	53
6	ZUSAMMENFASSUNG	55
7	SUMMARY	56
	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	57
	LITERATURVERZEICHNIS	60
	DANKSAGUNG	65
	LEBENS LAUF	66
	EIDESSTÄTLICHE VERSICHERUNG	67

ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Seite

Abbildung 1: Prozentuale Darstellung der häufigsten Todesursachen in Deutschland (Becker 2012)	1
Abbildung 2: Einteilung des Magens sowie die mögliche Tumorlokalisierung. Ösophagus-Cardia-Übergang (A), oberes Magendrittel (B: Fundus), mittleres Drittel (C: Corpus), distales Drittel (D: Antrum) mit Pylorus (E)	5
Abbildung 3: Bildliche Darstellung einer möglichen Tumorausdehnung, des möglichen Lymphknotenbefalls sowie das Vorhandensein von Metastasen; T1= Tumor dringt in Lamina propria, Muscularis mucosae oder Submucosa ein; T2= Tumor infiltriert Muscularis propria; T3= Tumor infiltriert Subserosa ohne Invasion des viszeralen Peritoneums; T4= Tumor dringt in Serosa (viszerales Peritoneum) oder angrenzende Strukturen ein; N1= regionär befallene Lymphknoten; N2= nichtregionär befallene Lymphknoten; (Dr.Dr.Haller 2009).....	7
Abbildung 4: Schematische Darstellung der regionären und nicht regionären Lymphknotenregionen des Magens (Spiessl).....	10
Abbildung 5: Struktur eines klassischen Cadherins.....	13
Abbildung 6: Die unterschiedlichen Hauptklassen der Immunglobuline (Abbildung nach (studymed GmbH, 2012-2019).....	16
Abbildung 7: Einteilung des Antikörpers mit seinen konstanten und variablen Regionen (A) und die Unterteilung der jeweiligen F(ab) ₂ - sowie Fc-Fragmente (B) sowie ein Einzelkettenfragment, das scFv . (Abbildung nach (Messerschmidt, Hempel et al. 2012)).....	17
Abbildung 8: Unterschiedliche Formate rekombinanter Antikörper als grafische Darstellung. Abkürzungen: V _H : variable Domäne der schweren Kette, V _L : variable Domäne der leichten Kette; CH ¹ , CH ² , C _L : konstante Domäne; S-S: Disulfidbrücke; Fv: variabler Teil des Antikörpers; scFv: durch eine Peptidverbindung stabilisiertes Fv-Fragment; dsFv: durch eine Disulfidbrücke stabilisiertes Fv-Fragment (Abbildung nach (Stefan Dübel 2004))	20
Abbildung 9: Grafische Darstellung eines Triplebody in Interaktion mit einer Tumorzelle sowie einer Effektorzelle	22
Abbildung 10: Diskontinuierliche Tris-Glycin-Gelelektrophorese. A: Das Proteingemisch befindet sich noch oberhalb des Sammelgels; B: Das Proteingemisch hat das Sammelgel durchlaufen; C: Das Proteingemisch hat das Trenngel durchlaufen, die Proteine wurden anhand ihrer Größe voneinander getrennt und können anhand des Bromphenolblau-Markers definiert werden (Abbildung nach (Lottspeich & Engels, 2006)).....	35

- Abbildung 11:** Schematische Darstellung des Expressionsplasmids pAK400scFv6H8: pAK400 kodiert für das 6H8scFv-Fragment, bestehend aus den variablen Domänen des Ratten-Antikörpers 6H8. Die Strukturgene V_L und V_H liegen zur Sekretion in den periplasmatischen Raum von *E. coli* an ihren 5'-Enden fusioniert mit den bakteriellen Signalsequenzen der Pektat-Lyase vor. Am 3'-Ende des Gens der schweren Kette befindet sich die kodierende Sequenz für ein Hexahistidin-Affinitätsanhängsel (6xHis). Die Transkription des resultierenden Fusionsgens steht unter der Kontrolle des lac-Promotor/Operators. Die Abkürzungen ori und f1 bezeichnen den Replikationsursprung der pUC-Plasmidfamilie sowie die intergenische Region des filamentösen Phagen f1..... 39
- Abbildung 12:** Aminosäuresequenz der variablen Domänen des scFv 6H8: Die Aminosäuren der CDRs sind fett markiert 39
- Abbildung 13:** SDS-PAGE der Einschrittreinigung des scFv-Fragments mittels Metallchelate-Affinitätschromatografie: *E. coli* JM83/pAK400scFv6H8 wurde im 2-L-Maßstab bei 22 °C kultiviert, die periplasmatische Proteinfraction gewonnen und daraus das scFv-Fragment durch IMAC an Ni-NTA-Sepharose mit einem Imidazolgradienten von 0 bis 300 mM isoliert. Auf ein 12%iges SDS-Polyacrylamidgel wurde im reduzierten Zustand je eine Probe des Gesamtzellextrakts (Spur 1), des periplasmatischen Proteinextraktes (PA), des Durchlaufs der Säule (DF) sowie die Eluatfraktion des kompetitiv eluierten rekombinanten scFv-Fragments aufgetragen (E1-E3)..... 40
- Abbildung 14:** A: E-Cadherin-Sequenz aus pENTReCadherin. Das Exon 9 (rot) wurde durch PCR-Amplifikation deletiert. B: Schematische Darstellung der Herstellung der E-Cadherin-Mutante E-Cadherin Δ 9: nach PCR-Amplifikation eines PCR-Fragments ohne Exon 9 wurde der Vektor pEntreCadherin Δ 9 durch Ligierung hergestellt und die Vektoren pDESTeCadherin Δ 9 und pDESTeCadherin durch LR Clonase Cloning hergestellt 42
- Abbildung 15:** Schematische Darstellung des Expressionsvektors. Das Strukturgen (in diesem Fall E-Cadherin) liegt zur Sekretion ins Zytoplasma von Säugerzellen fusioniert mit GFP (Green fluorescent Protein) vor. Die Transkription des resultierenden Fusionsgens steht unter der Kontrolle des CMV-Promotors/Operators. Die Kürzel ori und f1 bezeichnen den Replikationsursprung der pUC-Plasmidfamilie sowie die intergenische Region des filamentösen Phagen f1 (Invitrogen™) (siehe Kapitel 3.2.1.4) 43
- Abbildung 16:** Nachweis von E-Cadherin Δ 9 durch den Antikörper 6H8 und dessen rekombinantes scFv-Fragment mittels Western Blotting. Auf einem 12%igen SDS-Gel wurden die Mutante Δ 9 erste Probe (Spur 1), E-Cadherin erste Probe (Spur 2), Kontroll-EGF (Spur 3), Δ 9 zweite Probe (Spur 4) und E-Cadherin zweite Probe (Spur 5) aufgetragen und nach Auftrennung auf eine Nitrozellulosemembran transferiert. Die Membran wurde zunächst mit dem monoklonalen Antikörper 6H8 über Nacht, dann mit Anti-His-Antikörper für eine Stunde inkubiert und mittels ECL-Reagenz entwickelt. Für die Chemilumineszenz wurde ein Hyperfilm MP 10 s auf die Membran gelegt und entwickelt 44

- Abbildung 17:** Schematische Darstellung des Expressionsplasmids pAK400scFvEpCAM: pAK400 kodiert für das EpCAM Fv-Fragment, bestehend aus den variablen Domänen des Ratten-Antikörpers EpCAM. Die Strukturgene V_L und V_H liegen zur Sekretion in den periplasmatischen Raum von *E. coli* an ihren 5'-Enden fusioniert mit den bakteriellen Signalsequenzen der Pektat-Lyase vor. Am 3'-Ende des Gens der schweren Kette befindet sich die kodierende Sequenz für ein Hexahistidin-Affinitätsanhängsel (6xHis). Die Transkription des resultierenden Fusionsgens steht unter der Kontrolle des lac-Promotors/Operators. Die Kürzel ori und f1 bezeichnen den Replikationsursprung der pUC-Plasmidfamilie sowie die intergenische Region des filamentösen Phagen f1..... 45
- Abbildung 18:** Aminosäuresequenz der variablen Domänen des scFv EpCAM 45
- Abbildung 19:** SDS-PAGE der Einschrittreinigung des scFv-Fragments mittels Metallchelat-Affinitätschromatografie: *E. coli* JM83/pAK400scFvEpCAM 3.1 wurde im 2-L-Maßstab bei 22 °C kultiviert, die periplasmatische Proteinfraction gewonnen und daraus das scFv-Fragment durch IMAC an Ni-NTA-Sepharose mit einem Imidazolgradienten von 0 bis 300 mM isoliert. Auf ein 12%iges SDS-Polyacrylamidgel wurde das periplasmatische Proteinextrakte (PA), der Durchlauf der Säule (DF), die Waschfraktion (WF) sowie die Eluatfraktion des kompetitiv eluierten rekombinanten scFv-Fragments aufgetragen (E1-E3) 46
- Abbildung 20:** Nachweis des EpCAM-scFvs durch Penta-His-HRP mittels Western Blotting und Prüfung der Stabilität. Auf einem 12%igem SDS-Gel wurden die HER2 scFvs (Positivkontrolle) und jeweils das Eluat der drei verschiedenen scFv-EpCAM-Klone 1.1, 2.4 und 3.1 aufgetragen. Die Eluate waren jeweils bei 4 °C oder bei 20 °C über Nacht gelagert worden..... 47
- Abbildung 21:** Immunhistochemie des scFvEpCAM auf Ösophaguskarzinom-Zelllinie (OE19), 10-fache Vergrößerung. Die Zellen wurden mit scFv Epcam inkubiert und die Bindung mittels HRP-konjugierten anti-His-Antikörper 3D5 und AEC Substrat nachgewiesen..... 48

TABELLENVERZEICHNIS

	<u>Seite</u>
Tabelle 1: Prädispositionierende Erkrankungen, welche mit einer Entstehung eines Magenkarzinoms vergesellschaftet sind (Kaikawus Arstéh 2018).....	3
Tabelle 2: Übersicht der erforderlichen Untersuchungen für die Erstellung einer Behandlungsplanung (Smyth, Verheij et al. 2016).....	4
Tabelle 3: Makroskopische Einteilung der Wachstumstypen des fortgeschrittenen Magenkarzinoms nach Borrmann	6
Tabelle 4: Erklärung der einzelnen Parameter der 8. Auflage des AJCC Magenkrebs-Staging-Systems	7
Tabelle 5: Stadieneinteilung nach der WHO (UICC/TNM) (Kim, Seo et al. 2017).....	8
Tabelle 6: Aufteilung der Cadherine	13
Tabelle 7: Die Tabelle zeigt einen Ausschnitt der bereits zugelassenen monoklonalen sowie bispezifischen (Blincyto) Antikörperpräparate, (Paul-Ehrlich-Institut 2018)	23
Tabelle 8: Geräte, welche in dieser Forschungsarbeit angewandt wurden	27
Tabelle 9: Alle in dieser Arbeit verwendeten Zelllinien	29
Tabelle 10: Tabellarische Darstellung der Zelllinien mit dem jeweils benötigten Medium	32

1 EINLEITUNG

1.1 Das Magenkarzinom

In Deutschland folgen bösartige Tumoren als zweithäufigste Todesursache den Erkrankungen des Herz-Kreislauf-Systems (siehe Abbildung 1). Zurzeit stirbt ungefähr jeder Dritte an einer Krankheit des Kreislaufsystems und jeder Vierte an einer Tumorerkrankung. Magenkarzinome sind dabei weltweit die dritthäufigste Todesursache unter den malignen Erkrankungen (Zylberberg, Sultan et al. 2018).

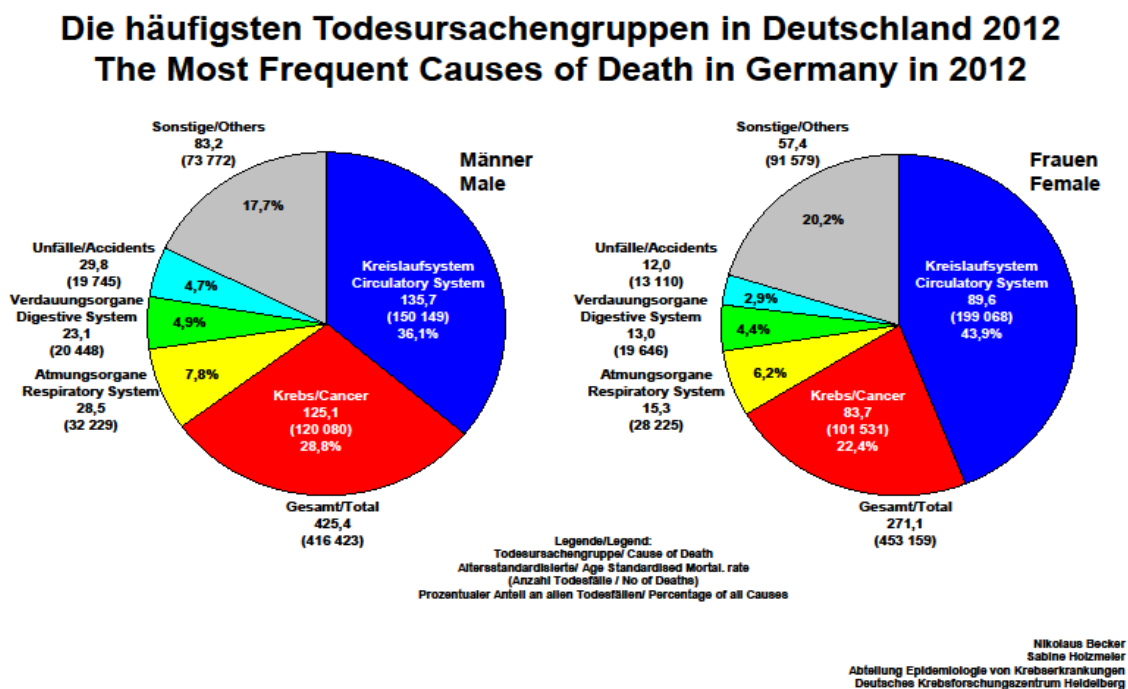


Abbildung 1: Prozentuale Darstellung der häufigsten Todesursachen in Deutschland (Becker 2012)

In der Bundesrepublik belegt diese Erkrankung bei Männern die fünfte, bei Frauen die sechste Stelle der krebsbedingten Todesursachen (Becker 2012).

In den letzten Jahren wurde eine stetige Abnahme der Inzidenz- sowie Mortalitätsrate des Magenkarzinoms verzeichnet, wobei die genaue Ursache für diese Rückläufigkeit nicht eindeutig geklärt ist.

International bestehen jedoch starke Unterschiede. Die Inzidenz und Mortalität sind in Ostasien – gefolgt von Lateinamerika – noch immer hoch und in entwickelten Ländern am geringsten. Exogene Einflüsse wie Essgewohnheiten und neu implementierte primäre und sekundäre Präventionsstrategien werden hierbei als Ursache gewertet (Balakrishnan, George et al. 2017).

Das Erkrankungsalter für Magenkrebs liegt zwischen dem 65. und 70. Lebensjahr, wobei Frauen durchschnittlich mit dem 70. und Männer mit dem 66. Lebensjahr erkranken (München 2018).

Die Prognose der Patienten mit Magenkarzinom ist mit einer 5-Jahres-Überlebensrate von etwas über 20 % (Sun, Sun et al. 2018) und einem mittleren Gesamtüberleben von ≤ 12 Monaten beim Magenkrebs im fortgeschrittenen Stadium ungünstig (Zhang and Zhang 2017).

Intensive Studien sowie neuartige Therapieansätze sind durch die weiterhin niedrigen Überlebensraten erforderlich, um die Behandlungspläne zu optimieren und den Patienten eine bessere Prognose zu ermöglichen.

1.1.1 Risikofaktoren

Die Entstehung eines Magenkarzinoms kann von verschiedenen Faktoren beeinflusst werden. Zu den Risikofaktoren gehören eine bakterielle Besiedelung des Magens mit dem Bakterium *Helicobacter pylori* (Gallo and Cha 2006, Chacaltana, Rodriguez et al. 2009), ein genetischer Gendefekt des CDH1 (Zylberberg, Sultan et al. 2018), eine positive Familienanamnese, Übergewicht (Behrens, Gredner et al. 2018), die Blutgruppe A sowie abweichende Ernährungsgewohnheiten, welche die geografisch unterschiedliche Prävalenz erklären. Eine bakterielle Besiedelung des Magens mit *Helicobacter pylori* erhöht das Erkrankungsrisiko um das Sechsfache (Gallo and Cha 2006, Chacaltana, Rodriguez et al. 2009).

Bei der Entstehung von Tumoren des Gastrointestinaltraktes spielt auch die Ernährung eine Rolle. Eine gesunde und ausgewogene Ernährung zeigt sich als präventiv, wogegen der Konsum stark gesalzener, geräucherter und besonders nitrithaltiger Lebensmittel als Risikofaktor gewertet werden muss (Behrens, Gredner et al. 2018).

In einer aktuellen Studie des Deutschen Krebsforschungszentrums (DKFZ) aus dem Jahr 2018 wurden Adipositas sowie geringe körperliche Aktivität mit einer Erhöhung des Krebsrisikos im Allgemeinen, aber auch des Magenkrebsrisikos im Speziellen in Verbindung gebracht. Adipositas erhöht das Risiko an Magenkrebs zu erkranken um 5,2 %, eine körperlich geringe Aktivität (< 150 min/Woche moderate bis intensive körperliche Aktivität) um 5,5 %. Ein niedriger sozioökonomischer Status gilt als weiterer Risikofaktor (S3-Leitlinie).

Es gibt auch Komorbiditäten, welche mit einem gehäuften Auftreten eines Magenkarzinoms vergesellschaftet sind. Diese sind in Tabelle 1 aufgeführt.

<u>Risiko</u>	<u>Krankheitsbild</u>
10 %	Morbus Ménétrier
0,5–15 %	Perniziosa (chronische Typ-A-Gastritis)
0–14 %	Chronisch-atrophische Gastritis (Typ-B-Gastritis) mit intestinaler Metaplasie vom Kolontyp
1–16 %	operierter Magen (ab 15. postoperativem Jahr)
2–4 %	Z. n. Ektomie eines Adenoms
?	Allg. erhöhtes Tumorrisiko bei Acanthosis nigricans, Dermatomyositis und Sklerodermie

Tabelle 1: Prädisponierende Erkrankungen, welche mit einer Entstehung eines Magenkarzinoms vergesellschaftet sind (Kaikawus Arstéh 2018)

1.1.2 Symptome und Diagnostik

Die Symptome eines Magenkarzinoms sind lokalisationsabhängig, wobei Patienten im frühen Stadium kaum Beschwerden aufweisen. Dies begründet das häufig späte Vorstellen beim Arzt und somit die Diagnose des Magenkarzinoms im fortgeschrittenen Stadium. Die Symptome werden häufig erst durch die Tumorgröße und/oder die Infiltration in benachbartes Gewebe hervorgerufen.

Zu den unspezifischen Symptomen eines Magenkarzinoms gehören üblicherweise eine Gewichtsabnahme, Dysphagie, Dyspepsie, Erbrechen, frühes Sättigungsgefühl und/oder Eisenmangelanämie (Smyth, Verheij et al. 2016).

Die Erstuntersuchung zur Risikobewertung sollte eine körperliche Untersuchung, ein Blutbild sowie die Sicherstellung der Funktionsfähigkeit der Leber und der Niere beinhalten (Smyth, Verheij et al. 2016).

Das Standardverfahren zur Feststellung eines Magenkarzinoms ist die endoskopische Untersuchung des Patienten einschließlich der Endosonographie, um die Tiefenausdehnung abschätzen zu können. Diese Untersuchung besitzt die höchste Sensitivität und Spezifität für den Nachweis von Neoplasien des oberen Gastrointestinaltraktes und erlaubt die gleichzeitige Entnahme von Biopsien (S3-Leitlinie) (Smyth, Verheij et al. 2016).

Die bildgebende diagnostische Untersuchung der Wahl ist eine abdominale Computertomografie mit intravenöser Kontrastmittelgabe, um einen Überblick der Tumorlokalisierung, -ausbreitung sowie der -umgebung zu erhalten. Hierdurch können

Infiltrationen oder Metastasierungen in Nachbarorgane wie Leber, Milz, Pankreas, Colon transversum oder das Peritoneum beurteilt werden (Smyth, Verheij et al. 2016).

In Tabelle 2 werden die möglichen Verfahren zur diagnostischen Untersuchung aufgelistet und erläutert.

Großes Blutbild	Um Anämien/eine Eisenmangelanämie auszuschließen
Nieren- und Leberfunktion	Beurteilung der Nieren- und Leberfunktion, um geeignete therapeutische Optionen zu bestimmen
Endoskopie und Biopsie	Um Gewebe für eine eindeutige Diagnose, histologische Klassifikation und molekulare Biomarker (HER2-Status) zu erhalten
Endoskopischer Ultraschall	Genaue Einschätzung der T- und N-Stufe bei potenziell operablen Tumoren. Bestimmung der proximalen und distalen Tumorausdehnung
Laparoskopie	Lässt eine Metastasierung ins Peritoneum/Diaphragma ausschließen
PET	Positronen-Emissions-Tomographie; Diagnosemethode, die mithilfe winziger radioaktiver Teilchen sowie spezieller Kamera eine Erkennung von Stoffwechselprozessen im Körper ermöglicht

Tabelle 2: Übersicht der erforderlichen Untersuchungen für die Erstellung einer Behandlungsplanung (Smyth, Verheij et al. 2016)

1.1.3 Klassifikation

Nach anatomischen Gesichtspunkten können maligne Tumoren im gesamten Magenbereich auftreten. Die Lokalisation wird nach der Einteilung des Magens beschrieben und kann in der Cardia, dem Magenmund, im Fundus, oberes Magendrittel, im Korpus, mittleres Magendrittel, im Antrum, unteres Magendrittel oder im Pylorus auftreten (siehe Abbildung 2). Auch ein multifokales Auftreten ist möglich. Von den vier anatomisch eingeteilten Regionen des Magens sind Antrum und Korpus die am häufigsten befallenen Bereiche. Die Lokalisation der Läsionen war nach einer Studie von Wanebo et al. (2000) zu 31 % im oberen Drittel, zu 14 % im mittleren Drittel und zu 26 % im distalen Drittel zu finden und bei 10 % der Patienten im ganzen Magen verteilt. Neoplasien sind häufiger in der kleinen Magenkurvatur lokalisiert (Wanebo 2000).

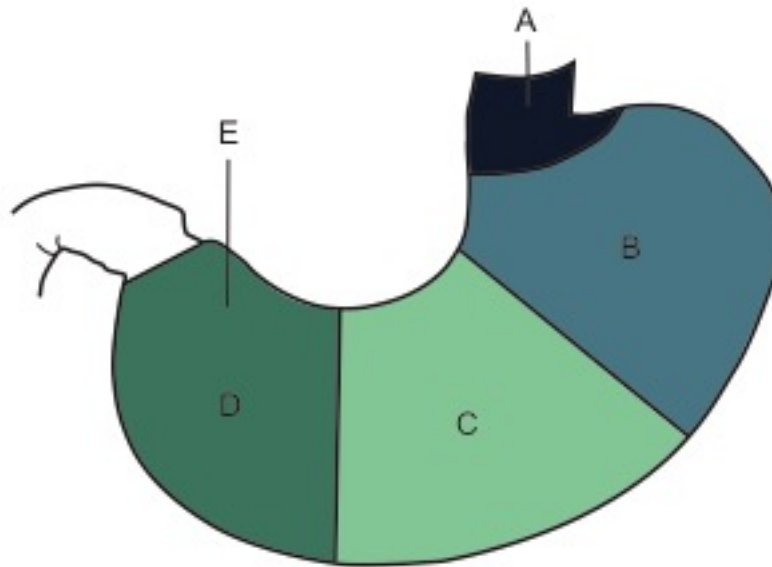


Abbildung 2: Einteilung des Magens sowie die mögliche Tumorlokalisation. Ösophagus-Cardia-Übergang (A), oberes Magendrittel (B: Fundus), mittleres Drittel (C: Corpus), distales Drittel (D: Antrum) mit Pylorus (E)

Neunzig Prozent der Magenkreberkrankungen sind Adenokarzinome (ACs), die gemäß Laurén-Klassifikation nach histologischen Erscheinungen in diffuse (undifferenzierte) und intestinale (gut differenzierte) Typen unterteilt werden (Smyth, Verheij et al. 2016).

Das intestinale Adenokarzinom bildet überwiegend Drüsen, die Tumorzellen ähneln. Dies sind meist atypische intestinale Zylinderepithelzellen; es kommt zu einer ausgeprägten zellulären Stromareaktion und zu einem expansiven Wachstum. Eine makroskopische Tumorabgrenzung ist beim intestinalen Typ eindeutiger, dies ermöglicht eine präzise Resektion mit geringerem Resektionsabstand. Ist eine histologische Zuordnung nicht eindeutig möglich, wird eine Klassifikation des diffusen Typs empfohlen (Lauren 1965).

Im Gegensatz zum intestinalen Typ imponiert das diffuse entdifferenzierte Siegelringkarzinom mit dissoziiert liegenden Zellen, einer weitläufig ausgeprägten Infiltration in die Magenwand, einer nicht eindeutigen Tumorbegrenzung sowie einer meist nur geringen lymphozytären Stromareaktion. Der diffuse Typ fordert einen größeren Resektionsrand, da dieser oft nicht der makroskopischen Tumorgrenze entspricht. Tumorzellen sind hierbei mikroskopisch noch bis 10 cm vom Resektionsrand entfernt nachweisbar.

Makroskopisch wird das fortgeschrittene Magenkarzinom in der Klassifikation nach Borrmann in 4 Wachstumstypen eingeteilt:

Typ 1	polypös-exophytisch (35 %)
Typ 2	polypös-exulzerierend (35–40 %)
Typ 3	exulzerierend (20 %)
Typ 4	diffus infiltrierend (20 %)

Tabelle 3: Makroskopische Einteilung der Wachstumstypen des fortgeschrittenen Magenkarzinoms nach Borrmann

Die Invasionstiefe spielt auch bei der prognostischen Überlebensquote eine erhebliche Rolle. So wird beim Frühkarzinom mit geringer Invasionstiefe (bis in die Mukosa, M-Typ, oder Submukosa, SM-Typ) eine 85–95%ige 5-Jahres-Überlebensrate prognostiziert, was bei einem fortgeschrittenen Karzinom mit Infiltration in die Muscularis propria oder darüber hinaus wesentlich geringer ist (Albert Roessner 2014). Eine vereinheitlichende Klassifikation maligner Tumoren soll den behandelnden Ärzten eine schnelle und unmissverständliche Einschätzung des Krankheitsbildes eines Patienten vermitteln. Die von Pierre Denoix entwickelte und von der Union Internationale Centre le Cancer (UICC) weiterentwickelte TNM-Klassifikation maligner Tumoren findet international Anwendung. Dabei werden Tumorgöße sowie -ausdehnung, der Befall von Lymphknoten und die Frage nach dem Vorhandensein von Metastasen berücksichtigt (siehe Tabelle 4 , Abbildung 3).

Klassifikation	Primärtumor T
TX	Primärtumor kann nicht beurteilt werden
T0	Kein Nachweis eines Primärtumors
Tis	Carcinoma in situ: intraepithelialer Tumor ohne Invasion der Lamina propria
T1	Tumor dringt in Lamina propria, Muscularis mucosae oder Submucosa ein
T1a	Tumor infiltriert Lamina propria oder Muscularis mucosa
T1b	Tumor infiltriert Submucosa
T2	Tumor infiltriert Muscularis propria
T3	Tumor infiltriert Subserosa ohne Invasion des viszeralen Peritoneums
T4	Tumor dringt in Serosa (viszerales Peritoneum) oder angrenzende Strukturen ein
T4a	Tumor perforiert Subserosa (viszerales Peritoneum)
T4b	Tumor infiltriert benachbarte Strukturen

Klassifikation	Regionale Lymphknoten N
NX	Regionale Lymphknoten können nicht beurteilt werden
N0	Keine regionalen Lymphknotenmetastasen
N1	Metastasen in 1–2 Lymphknoten
N2	Metastasen in 3–6 Lymphknoten
N3a	Metastasen in 7–15 Lymphknoten
N3b	≥ 16 Lymphknotenmetastasen

Klassifikation	Fernmetastasen M
M0	Keine Fernmetastasen
M1	Fernmetastasen oder positiv peritoneale Zytologie

Tabelle 4: Erklärung der einzelnen Parameter der 8. Auflage des AJCC Magenkrebs-Staging-Systems

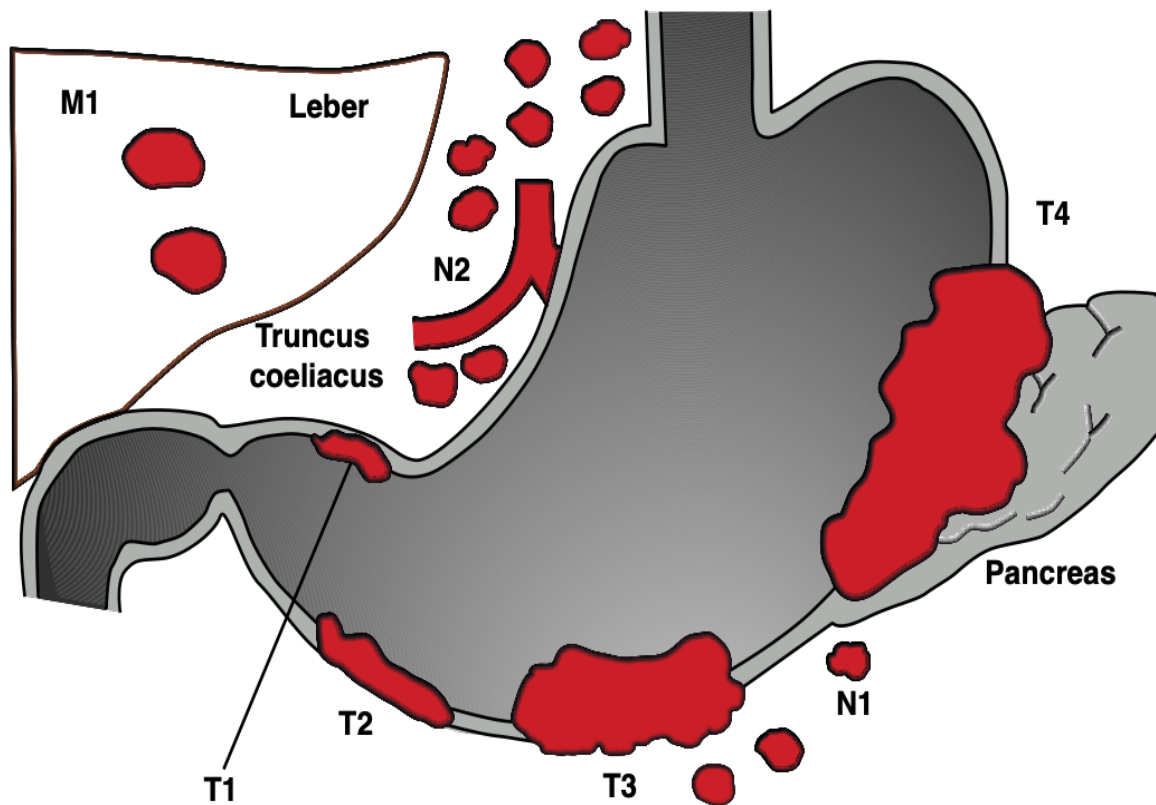


Abbildung 3: Bildliche Darstellung einer möglichen Tumorausdehnung, des möglichen Lymphknotenbefalls sowie das Vorhandensein von Metastasen; T1= Tumor dringt in Lamina propria, Muscularis mucosae oder Submucosa ein; T2= Tumor infiltriert Muscularis propria; T3= Tumor infiltriert Subserosa ohne Invasion des viszeralen Peritoneums; T4= Tumor dringt in Serosa (viszerales Peritoneum) oder angrenzende Strukturen ein; N1= regionär befallene Lymphknoten; N2= nichtregionär befallene Lymphknoten; (Dr.Dr.Haller 2009)

Die Tumoren werden nach diesen drei Kriterien in die verschiedenen Stadien eingeteilt. Diese sind insbesondere in Bezug auf die Therapieoptionen und Prognose von besonderer Bedeutung (siehe Tabelle 5).

<u>Staging</u>	<u>I</u>	<u>N</u>	<u>M</u>
0	Tis	N0	M0
IA	T1	N0	M0
IB	T1	N1	M0
	T2	N0	M0
IIA	T1	N2	M0
	T2	N1	M0
	T3	N0	M0
IIB	T1	N3a	M0
	T2	N2	M0
	T3	N1	M0
	T4a	N0	M0
IIIA	T2	N3a	M0
	T3	N2	M0
	T4a	N1	M0
	T4a	N2	M0
	T4b	N0	M0
IIIB	T1	N3b	M0
	T2	N3b	M0
	T3	N3a	M0
	T4a	N3a	M0
	T4b	N1	M0
	T4b	N2	M0
IIIC	T3	N3b	M0
	T4a	N3b	M0
	T4b	N3a	M0
	T4b	N3b	M0
IV	Jedes T	Jedes N	M1

Tabelle 5: Stadieneinteilung nach der WHO (UICC/TNM) (Kim, Seo et al. 2017)

Drei weitere Kriterien, die von den behandelnden Ärzten zwar Verwendung, in der Klassifikation jedoch keine Berücksichtigung finden, sind:

V0/1/2: Invasion in Venen (0 = keine, 1 = mikroskopisch, 2 = makroskopisch).

Pn0/1: Perineurale Invasion (0 = keine, 1 = vorhanden).

R0/1/2: Verbleib eines Tumorrestes trotz therapeutischer Maßnahmen (lokal, regionär oder Fernmetastasen).

(R0 = es ist kein Tumor nachweisbar, R1 = Tumorzellen im Resektionsrand nachweisbar (mikroskopisch), R2 = Tumor oder Metastasen wurde belassen (makroskopisch))

1.1.4 Metastasierungsmuster

Eine Metastasierung des Magenkarzinoms ist durch die strukturnahe Positionierung des Magens über eine lymphogene Ausbreitung, eine intraperitoneale Infiltration mit Abtropfmetastasen (Peritonealkarzinose, Krukenberg-Tumor der Ovarien) sowie hämatogen, u. a. in die Leber und Lunge, möglich.

Die lymphogene Metastasierung kann, da die Lymphwege des Magens direkt unterhalb der Basalmembran liegen, über regionäre und nicht regionäre Lymphknoten erfolgen und somit auch Nachbarorgane wie Leber, Bauchspeicheldrüse, Milz, Colon transversum u. a. befallen (siehe Abbildung 4).

Es wurde nachgewiesen, dass die Anzahl der befallenen Lymphknoten die Prognose des Patienten bestimmt, weshalb sich eine Resektion von Lymphknoten, eine sogenannte D1- sowie eine D2-Lymphadenektomie, als chirurgische Maßnahme etabliert haben.

Bei einer durchgeführten D1-Lymphadenektomie werden die regionären Lymphknoten direkt am Magen (Kompartiment I) mit den LK-Stationen 1–6 entfernt (siehe Abbildung 5). Eine D2-Lymphadenektomie umfasst zusätzlich zu den Lymphknoten von Kompartiment I (D1-Lymphadenektomie) die nicht regionären Lymphknoten (Kompartiment II) mit den Stationen 7–11, welche die Lymphknoten am Truncus coeliacus sowie dessen Ableitungen in Leber, Milz sowie Pankreas betreffen (siehe Abbildung 4).

Die Richtzahl für eine korrekt ausgeführte D2-Lymphadenektomie sieht die Entfernung und histopathologische Untersuchung von 25 Lymphknoten vor (S3-Leitlinie August 2019).

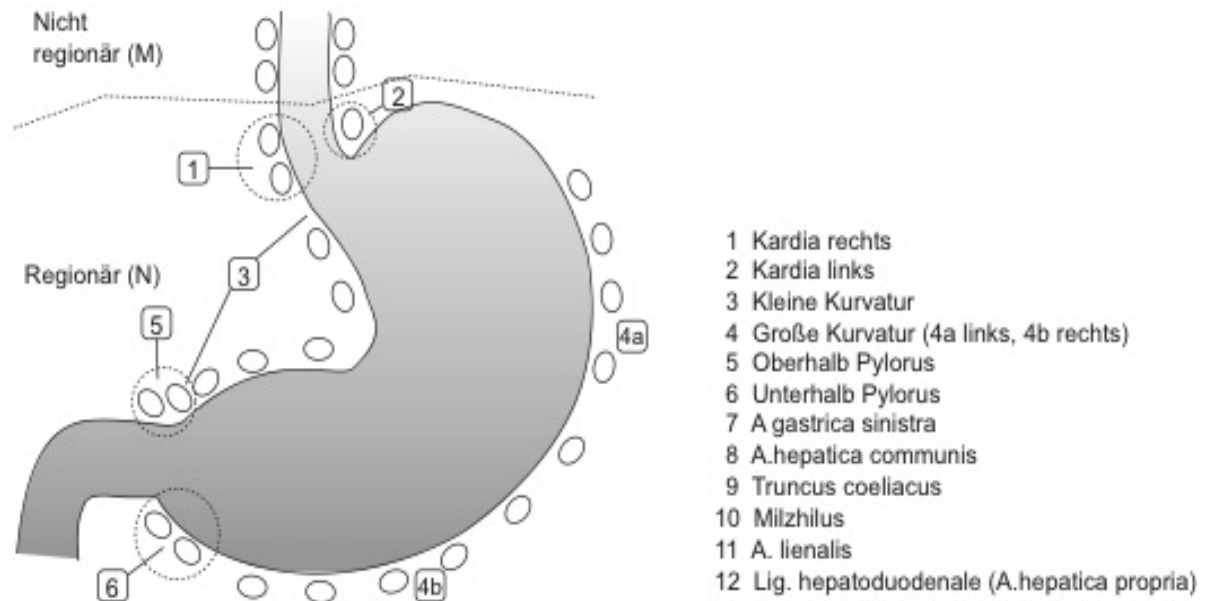


Abbildung 4: Schematische Darstellung der regionären und nicht regionären Lymphknotenregionen des Magens (Abbildung nach (Spiess!))

1.1.5 Therapie

Eine interdisziplinäre Behandlungsplanung ist vor jedem Therapiebeginn zwingend erforderlich. Die drei wichtigsten Säulen bei der Behandlung von Magenkarzinomen stellen die Chirurgie, die Bestrahlungs- und die Chemotherapie dar.

Eine kurative Behandlung ist lediglich durch eine chirurgische Teil- oder Totalresektion des Magens im Gesunden samt lymphatischer Abflusswege realisierbar.

Somit ist dies als Standardtherapie für Patienten mit einem resektablen Magenkarzinom anzusehen, auch für Tumoren, welche die Mukosa zwar infiltrieren (T1a N0 M0), jedoch komplett reseziert werden können (S3-Leitlinie). Ausnahmen stellen Magenfrühkarzinome mit kleinem Durchmesser (< 2 cm) dar, wenn diese kein infiltratives Wachstum bezüglich der Mukosa aufweisen und Magenkarzinome vom intestinalen Typ mit gutem bzw. mäßigem Differenzierungsgrad (G1, G2). Beide sind einer endoskopischen En-bloc-Resektion zugänglich (Gotoda, Yanagisawa et al. 2000).

Ein *Down-Staging* kann durch die Gabe einer präoperativen Chemotherapie bei anfangs nicht R0-resezierbaren Karzinomen erreicht werden.

Bei der chirurgischen Resektion unterscheidet man eine subtotale Magenresektion (4/5-Resektion), eine totale Gastrektomie und eine erweiterte Gastrektomie. Eine Teilresektion des Magens wird nur bei Magenfrühkarzinomen oder Karzinomen vom intestinalen Typ im Antrum empfohlen. Eine totale Gastrektomie sollte bei allen Karzinomen vom diffusen Typ sowie bei Karzinomen im Korpus und Fundus vom intestinalen Typen durchgeführt werden. Die beim Magenfrühkarzinom durchgeführte subtotale oder totale Gastrektomie ist mit laparoskopischer Vorgehensweise der offenen Resektion gleichwertig (Lee, Han et al. 2005). Bei chirurgischen Eingriffen mit kurativer Absicht sollten nach Laurén Sicherheitsabstände von 5 cm beim intestinalen Typ und 8 cm beim diffusen Typ eingehalten und in jedem Fall eine D2-Lymphadenektomie durchgeführt werden. Ein Karzinom der Kardia bedarf einer Gastrektomie sowie einer Mitresektion des distalen Ösophagus (S3-Leitlinie).

Das späte Auftreten von Symptomen sowie die damit einhergehende späte Diagnose der an einem Magenkarzinom erkrankten Patienten, lässt oftmals keine kurative Therapiemöglichkeit mehr zu. Somit sollten chirurgisch-radiochemotherapeutische Maßnahmen bei Patienten mit einem Magenkarzinom im höheren Stadium angewandt werden (Ho, Jansen et al. 2017, Biondi, D'Ugo et al. 2019). Eine R1-Situation sollte intraoperativ eine Erweiterung des chirurgischen Eingriffes im Sinne einer Nachresektion des Resektionsrandes beinhalten (Lordick and Siewert 2008). Durch die Gabe einer postoperativen Radiochemotherapie bei Patienten mit Stadium R1 konnte ein lokales Rezidiv vermieden werden. Eine nach chirurgischem Eingriff verbleibende R1-Situation ist meist mit einem schlecht differenzierbaren Karzinom und schlechteren T- bzw. N-Stadien assoziiert (Gertler, Richter et al. 2016).

Bei einem Ausschluss einer Heilungschance werden rein palliative Maßnahmen zur Verlängerung der Lebenszeit angewandt und von chirurgischen Eingriffen wird bei symptomlosen oder -armen Patienten sowie bei nicht rezidivierenden oder akut blutenden Tumoren abgeraten (S3-Leitlinie). Eine palliative Resektion durch Anlage einer

Gastroenterostomie oder endoskopische Therapien können die Passage wiederherstellen und zur Aufrechterhaltung oder Ermöglichung einer besseren Lebensqualität eingesetzt werden.

1.2 Adhäsionsmoleküle als Zielstrukturen bei der Behandlung maligner Erkrankungen

1.2.1 Zelladhäsion und Zelladhäsionsmoleküle

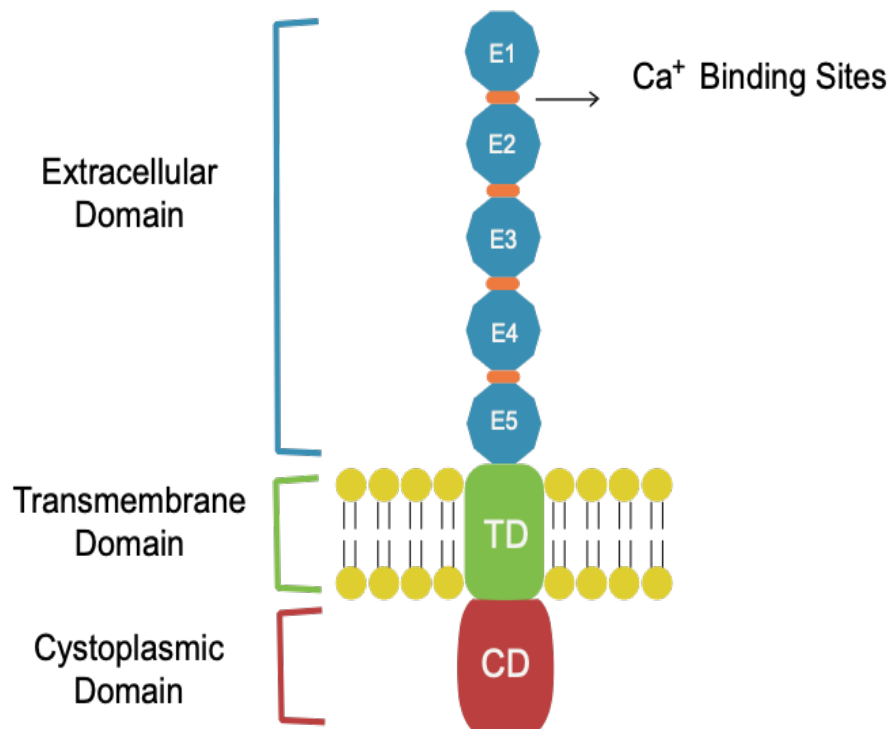
Die Zelladhäsion ist an dem grundlegenden Binde- und Kommunikationsmechanismus einer Zelle beteiligt und definiert maßgeblich die Gewebsmorphogenese. Durch Adhäsion wird der Kontakt zur extrazellulären Matrix oder zu einer benachbarten Zelle hergestellt. Die Expression unterschiedlicher Zelladhäsionsmoleküle ermöglicht die Bildung eines Zellverbundes, einer Zelltrennung und damit einhergehend die Separation in unterschiedliche Organe und Gewebe. Diese Kopplung zwischen physikalischer Adhäsion und Entwicklungssignal bietet einen Mechanismus, um physikalische Aspekte der Gewebsmorphogenese eng mit dem Zellwachstum und der Zelldifferenzierung zu verknüpfen.

Bei der Vermittlung der Adhäsion spielen vier verschiedene Adhäsionsstrukturen eine Rolle: die Selektine, die Integrine, die Immunglobuline und die Cadherin-Superfamilie (Cummings and Smith 1992, Al-Amoudi, Diez et al. 2007, Aricescu and Jones 2007, Arnaout, Goodman et al. 2007). In dieser Arbeit wird ein besonderes Augenmerk auf die Familie der Cadherine gelegt und dabei besonders auf die magenkarzinomspezifische Mutation des E-Cadherins, das E-Cadherin Δ 9.

1.2.2 Funktion und Klassifikation der Cadherine

Cadherine sind calciumabhängige glykosylierte Transmembranproteine, welche erstmals durch die Arbeitsgruppe von Takeichi entdeckt und beschrieben wurden (Yoshida-Noro, Suzuki et al. 1984). Diese haben ihre Bezeichnung aus der Abkürzung von „calciumabhängiges Adherin“ (Katafiasz, Nieman et al. 2003).

Die mehr als 100 Glykoproteine umfassende Familie der Cadherine besitzt drei Domänen, eine extrazelluläre, eine transmembranöse und eine zytoplasmatische. Die extrazelluläre Domäne vermittelt calciumabhängige Zelladhäsion, die zytoplasmatische Domäne stellt in der Regel den Kontakt zum Zytoskelett her. Die Aufgabe der transmembranösen Domäne ist bislang noch nicht eindeutig erforscht (Huber, Kemler et al. 1999).



The Classical Cadherin Structure

Abbildung 5: Struktur eines klassischen Cadherins

Die Unterteilung der Cadherine wird wie folgt vorgenommen:

Klassische Cadherine	Cadherine von Desmosomen	Protocadherine
E-Cadherin, N-Cadherin, VE-Cadherin	Desmogleine, Desmocolline	Kommen im Nervensystem vor

Tabelle 6: Aufteilung der Cadherine

1.2.3 Das E-Cadherin

Das E-Cadherin besitzt, wie die klassischen Cadherine, fünf extrazelluläre Domänen (siehe Abbildung 5). Die Stelle zwischen den extrazellulären Domänen ist die Bindestelle für Calciumionen, welche elementar für die Funktion der Cadherine als Adhäsionsmolekül ist. Die homophile Interaktion von Cadherin-Monomeren in Cadherin-trans wird durch den auf dem N-terminalen Ende befindlichen Tryptophanrest vermittelt. E-Cadherin resultiert aus dem CDH1-Gen (Brooks-Wilson, Kaurah et al. 2004). Im Epithel des Dünndarms ist E-Cadherin in adhärenen Kontaktstellen konzentriert, in anderen Epithelien findet es sich

entlang der lateralen Zelloberfläche. Versuche mit Knock-out-Mäusen zeigten, dass das Leben ohne E-Cadherin nicht vereinbar ist. Die Verbindungsstellen im Darm der Mäuse waren anomal und die Barrierefunktion durch die E-Cadherin-Mutante beeinträchtigt (Bondow, Faber et al. 2012).

1.2.4 Mutation des E-Cadherin

In der Entwicklung maligner Tumoren spielt das E-Cadherin eine außerordentliche Rolle, da eine Herunterregulierung der Cadherin-Expression mit der Invasivität von Tumorzellen zusammenhängt (Takeichi 1991).

Besonders bei Mamma- und Magenkarzinomen wird das E-Cadherin durch Sequenzmutation des CDH1-Gens inaktiviert (Brooks-Wilson, Kaurah et al. 2004). Diese inaktivierte Form wird häufig in sich diffus ausbreitenden Tumorzellen nachgewiesen (Senekowitsch-Schmidtke, Schuhmacher et al. 2001, Conacci-Sorrell, Zhurinsky et al. 2002). Inaktivierende Mutationen im CDH1-Gen finden sich nur in Karzinomen vom diffusen, nicht jedoch vom intestinalen Typ (Becker, Atkinson et al. 1994).

In Studien wurde bereits nahegelegt, dass Mutationen des E-Cadherins an Exon 8 und 9 des CDH1-Gens für die invasive und funktionelle Entstehung des diffusen Typs des Magenkarzinoms verantwortlich sind (Senekowitsch-Schmidtke, Schuhmacher et al. 2001, Brooks-Wilson, Kaurah et al. 2004).

1.2.5 Die magenkarzinomspezifische Mutante E-Cadherin $\Delta 9$

Im diffusen Typen des Magenkarzinoms kann bei 13 % der Patienten eine spezifische Mutation im E-Cadherin, das E-Cadherin $\Delta 9$, genauer in der mRNA an Exon 8 oder 9 nachgewiesen werden (Senekowitsch-Schmidtke, Schuhmacher et al. 2001). Diese Mutation ändert nachweislich die Funktion des Adhäsionsmoleküls und ist am irregulären Wachstum des diffusen Magenkarzinomtypen beteiligt. Neue Antikörpertherapien (Immuntherapien) bei Tumorerkrankungen greifen auf diese spezifischen Bindestellen zurück, um die irregulär wachsenden Zellen zu binden und der natürlichen Immunabwehr auszuliefern. Das E-Cadherin $\Delta 9$ wurde bereits 2001 von der Münchner Arbeitsgruppe Senekowitsch-Schmidtke et al. erfolgreich als mögliche Bindestelle für eine Radioimmuntherapie mit einem ^{213}Bi -markierten monoklonalen Antikörper getestet und nachgewiesen (Senekowitsch-Schmidtke, Schuhmacher et al. 2001).

1.2.6 EpCAM als Tumorantigen

Das Epithelzelladhäsionsmolekül EpCAM (*epithelial cell adhesion molecule*) ist in der Lage, Ca^{2+} -unabhängige Zell-Zell-Adhäsion zu vermitteln (Balzar, Prins et al. 1999).

Ursprünglich als Oberflächenantigen beim menschlichen Kolonkarzinom beschrieben, handelt es sich um ein 39 kDa großes Transmembranglykoprotein, welches interzelluläre Zelladhäsion vermittelt. Es wurde aufgrund seines hohen Expressionsniveaus in schnell wachsenden Epitheltumoren als tumorassoziertes Antigen identifiziert (Huang, Yang et al. 2018). Jüngste Daten legen nahe, dass EpCAM auch an der Signalübertragung, Migration, Proliferation und Differenzierung von Zellen beteiligt ist (Patriarca, Macchi et al. 2012).

Der erste in der Krebstherapie zugelassene monoklonale Antikörper war ein gegen EpCAM gerichteter IgG2a-Antikörper. EpCAM wird auf epithelialen Tumoren, zirkulierenden Tumorzellen sowie auf Krebsstammzellen exprimiert und besitzt eine hohe Spezifität, die den Erfolg solch neu entwickelter Antikörper ausmacht (Eyvazi, Farajnia et al. 2018). Die Wirksamkeit und Verträglichkeit der gegen EpCAM gerichteten monoklonalen Antikörper konnte in einer Phase-II-Studie von Kowalski et al. belegt werden (Kowalski, Guindon et al. 2012). Hierbei handelt es sich um ein gegen EpCAM gerichtetes Single-Chain-Fragment (scFv) mit konjugiertem Exotoxin A aus *Pseudomonas aeruginosa*, das Opportuzumab monatox (Eyvazi, Farajnia et al. 2018).

1.3 Das Immunsystem als therapeutischer Schlüsselmechanismus bei malignen Erkrankungen

Paul Ehrlich stellte in seiner „Seitenkettentheorie“ die These auf, dass das Immunsystem in der Lage sei, Tumorzellen zu erkennen und eliminieren zu können. Hierfür erhielt er bereits 1908 den Nobelpreis für Medizin.

Das menschliche Immunsystem kann als eigenständiges Organ angesehen werden und ist im weitesten Sinne die Identifizierung und anschließende Neutralisierung sowie Beseitigung von körperfremden oder auch körpereigenen (Autoimmunitäten) Noxen.

Die Unterteilung erfolgt in angeborene (natürliche) oder erworbene (adaptive) Immunität, die beide sowohl auf humoraler sowie zellulärer Ebene Schutz vor Pathogenen liefern.

Nach dem Erstkontakt mit einem Antigen bleiben sogenannte *Memoryzellen* mit passendem Antigenrezeptor im Körper und lösen nach Zweitkontakt die sekundäre Immunantwort aus, welche aus der Bindung des zum wiederholten Mal im Körper befindlichen Antigens und Produktion von spezifischen Antikörpern durch Plasmazellen (humorale Ebene) besteht. T-Lymphozyten, die den spezifischen Antikörper als Antigenrezeptor auf ihrer Oberfläche tragen (zelluläre Ebene), werden aktiviert.

Aus diesem Zusammenspiel aus angeborener und erworbener Immunität, jeweils auf humoraler und zellulärer Ebene, ergibt sich ein vielfältiger Schutz vor allerlei Pathogenen.

1.3.1 Antikörper: Funktion, Struktur und spezifische Antikörper

Antikörper sind hochspezifische Bindemoleküle, welche vom Körper nach einem Antigenkontakt generiert werden. Antikörper werden von B-Lymphozyten gebildet, befinden sich als membranständige Immunglobuline (Ig) sogenannte transmembrane Antigenrezeptoren, auf der B-Zell-Oberfläche, um dann in hochkonzentrierter Form als globuläre Proteine in das Blut sezerniert zu werden. In diesem Stadium bezeichnet man die B-Lymphozyten als Plasmazellen (Messerschmidt, Hempel et al. 2012).

Immunglobuline werden zu der Proteingruppe der „globulär-funktionellen“, d. h. zu den kugelförmigen Molekülen gezählt. Die folgenden 5 Hauptklassen definieren die Immunglobuline: IgG, IgA, IgM, IgD sowie IgE, welche durch die Variationsmöglichkeiten der schweren Ketten zustande kommen (z. B. ϵ bei Immunglobulin E = IgE).

Antikörper-Klassen

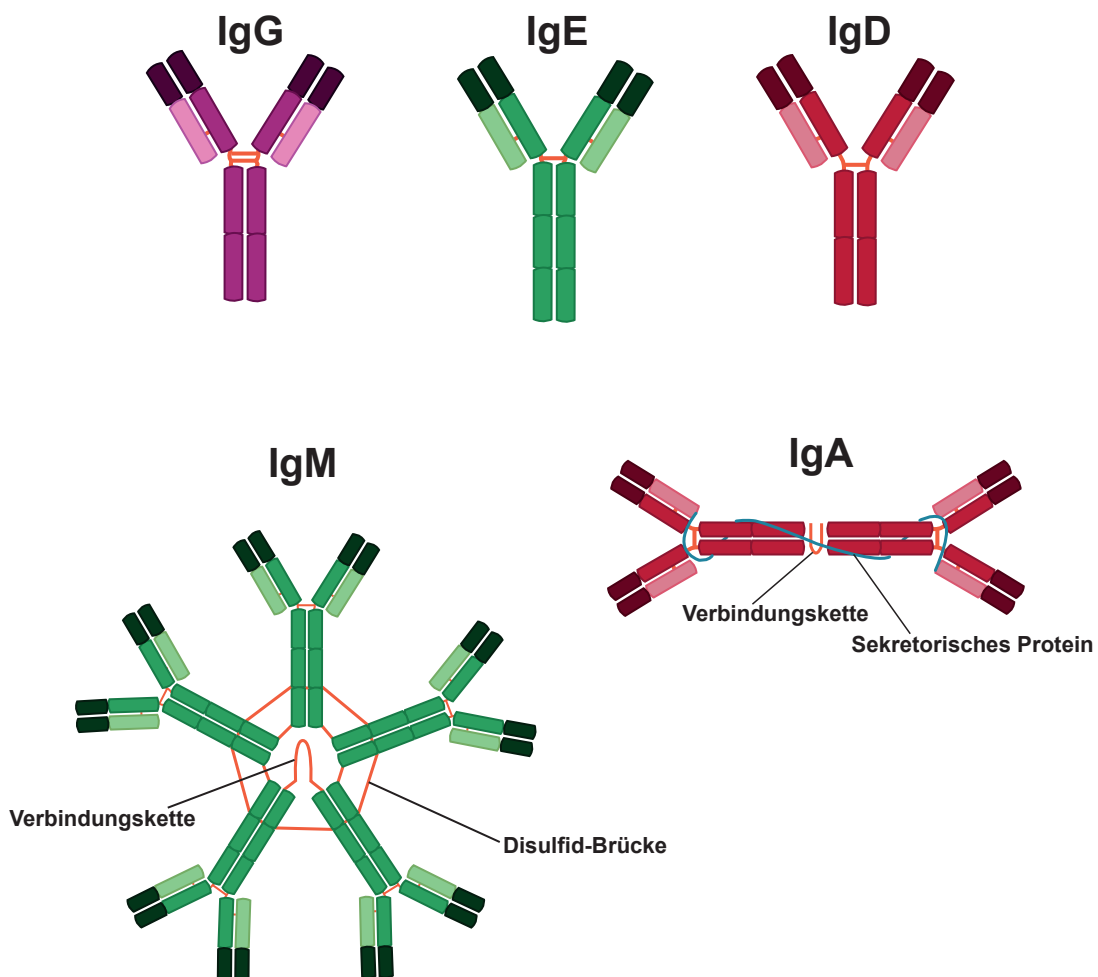


Abbildung 6: Die unterschiedlichen Hauptklassen der Immunglobuline (Abbildung nach (studymed GmbH, 2012-2019))

Eine weitere Charakterisierung eines Antikörpers in verschiedene Fragmente ermöglicht das Verständnis der Variabilität der Bindung. Ein Antikörper besteht aus zwei schweren Ketten, „*heavy chains*“ oder H-Ketten, und zwei leichten Ketten, den „*light chains*“ oder L-Ketten. Eine enzymatische Aufspaltung mit z. B. Papain ergab eine Aufteilung in zwei $F(ab)_2$ -Fragmente und ein Fc-Fragment (siehe Abbildung 7).

Diesen wurden auch unterschiedliche „Aufgaben“ zugeordnet, wobei die Fab-Fragmente (siehe Abbildung 7) eine spezifische Antigenbindung vermitteln und die Fc-Fragmente eine Immunantwort auslösen, also die Effektorzelle binden (Messerschmidt, Hempel et al. 2012).

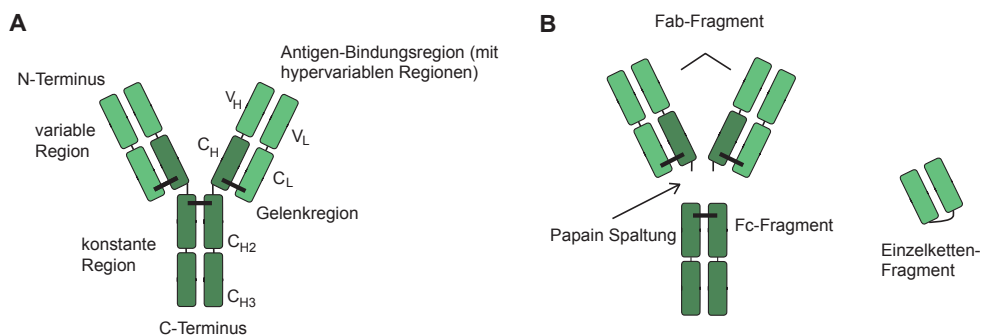


Abbildung 7: Einteilung des Antikörpers mit seinen konstanten und variablen Regionen (A) und die Unterteilung der jeweiligen $F(ab)_2$ - sowie Fc-Fragmente (B) sowie ein Einzelkettenfragment, das scFv. (Abbildung nach (Messerschmidt, Hempel et al. 2012))

Polyklonale Antikörper bestehen aus einem Gemisch verschiedener Immunglobuline unterschiedlicher Spezifität. Da solche Gemische zu unerwünschten Nebenreaktionen führen, ist eine Verwendung monoklonaler Antikörper (*Monoclonal Antibody, mAb*) ratsam.

„Schon im Jahre 1975 mit Entwicklung der Hybridomtechnologie durch Köhler und Milstein ist es möglich geworden, monoklonale Antikörper gegen nahezu jede Substanz zu generieren und für die Forschung, Diagnostik und Therapie einzusetzen“ (Messerschmidt, Hempel et al. 2012). Hierfür wurden Versuchstiere, meist Mäuse, mit dem gewünschten Antigen immunisiert, deren Milz bzw. die darin enthaltenen B-Lymphozyten – also die Vorstufe der antikörperproduzierenden Zelle – isoliert, anschließend mit Myelomzellen fusioniert (Hybridomzellen) und so die Antikörper gewonnen (Messerschmidt, Hempel et al. 2012).

Diese wissenschaftliche Errungenschaft ergab neue Möglichkeiten in der Therapie unterschiedlicher maligner Entartungen, löste jedoch bei den Patienten eine humane Anti-Maus-Antikörper-Immunantwort (HAMAM-Antwort) aus, welche im Blutserum nachgewiesen werden konnten (Sefan Dübel 2004).

Diese Erkenntnis führte zur Entwicklung von Antikörper-Chimären, welche variable Regionen aus Mausantikörpern und konstante Regionen aus humanen Antikörpern besaßen. Hierbei kam es zu einer deutlich geringeren Immunogenität (Sefan Dübel 2004).

Infliximab ist ein solch hergestelltes Medikament und wird bereits zur Behandlung chronischer Erkrankungen eingesetzt (Tajiri, Arai et al. 2019). Da in solchen Konstrukten die V_L und V_H -Regionen (siehe Abbildung 7) weiterhin Mausursprungs waren, kam es trotzdem zu einer Abwehrreaktion, die jedoch entscheidend geringer ausfiel.

Dies führte zur Entwicklung humanisierter Antikörper, wobei menschliche V_L und V_H -Regionen verwendet wurden.

Um die Technik zur Herstellung humanisierter Antikörper noch weiter zu verfeinern, wurden die Aminosäuren der CDR-Regionen (*Complementarily Determining Region*) auf der Antikörperoberfläche analysiert und die Unterschiede zwischen Maus und Mensch gezielt mutiert (Sefan Dübel 2004). Aufgrund des enormen Aufwandes einer solchen Herstellung wird bereits nach Alternativen geforscht. Ein Ansatz beschäftigt sich mit virusähnlichen Partikeln, eine weitere Arbeit verfolgt den Gedanken einer *In-vitro*-Immunisierung, um den enormen Aufwand der Hybridomtechnik zu umgehen, speziesunabhängig zu arbeiten und mit humanen Zellen auch humane Antikörper generieren zu können (C.Milstein 07.08.1975).

Es entwickelte sich die Anwendung spezifischer Antikörper, welche jedoch durch die Größe eines Antikörpers limitiert ist.

Die Antikörper-Fragment-Herstellung löste dieses Problem, bei welcher enzymatisch ein Antikörper gespalten oder als rekombinante Form durch Genverknüpfung ein Einzelketten-Fragment hergestellt werden kann (Messerschmidt, Hempel et al. 2012).

Bei der enzymatischen Spaltung wurden einerseits die $F(ab)_2$ -Fragmente voneinander und gleichzeitig das Fc -Fragment getrennt (siehe Abbildung 7).

Die Antigenbindung besteht in den Fab-Fragmenten (Fab = Fragment antigen binding), der Fc -Teil tendiert zum „Auskristallisieren“ (Fc = Fragment crystallizable).

Da beide Teile weiterhin eine HAMAM-Antwort auslösten, wurde vom Fab-Teil noch einmal die Hälfte herausgespalten. Das verbleibende Stück besitzt noch immer eine antigenbindende Eigenschaft und wird als Fv bezeichnet (Fv = Fragment variable).

Bispezifische Antikörper besitzen eine doppelte Bindungsstelle, beide Fab-Teile werden auf ein anderes Antigen kodiert und können auf chemisch, genetische Fusion oder durch Fusion von zwei Hybridomkulturen generiert werden.

Dadurch werden geringere Nebenwirkungen beschrieben, was durch die Nähe der Ziel- sowie Effektorzelle erklärt wird und eine Heranführung der Effektorzelle durch den bispezifischen Antikörper an die Zielzelle und somit eine stärkere zytotoxische Wirkung erzielt.

So gibt es neben bispezifischen Antikörpern auch bispezifische Fragmente (Diabodies), welche mit den scFvs vergleichbar sind, aber auch trivalente scFvs (Triabodies).

Zur Darstellung bispezifischer Immunglobuline fusionierten Milstein und Cuello bereits 1983 zwei unterschiedliche Hybridomzellen miteinander, welche zwar den gewünschten bispezifischen Antikörper produzierten, jedoch ebenfalls weitere Immunglobuline, die von dem gewünschten bispezifischen Molekül aufwendig getrennt werden mussten. Stellt man diese rekombinant dar, tritt dieses Problem nicht auf.

Um solche rekombinanten Antikörper komplett humanisiert herstellen zu können, wird eine gentechnologische In-vitro-Herstellung, die sogenannte „Phagen-Display-Technologie“ durchgeführt. Diese Methode ermöglicht es, ganze kombinatorische Bibliotheken zufällig kombinierter V_L und V_H -Gene (normalerweise als scFvs) auf der Oberfläche von Bakterien exprimiert vorzufinden und diese dann zur Klonierung mittels immunisierter oder nicht immunisierter Mäuse, Kaninchen oder Menschen zu gewinnen.

Blinatumomab (Handelsname Blincyto®; Hersteller Amgen) ist beispielsweise solch ein bispezifischer Antikörper, der bereits erfolgreich zur Behandlung einer akuten lymphatischen Leukämie (ALL) bereits eingesetzt wird.

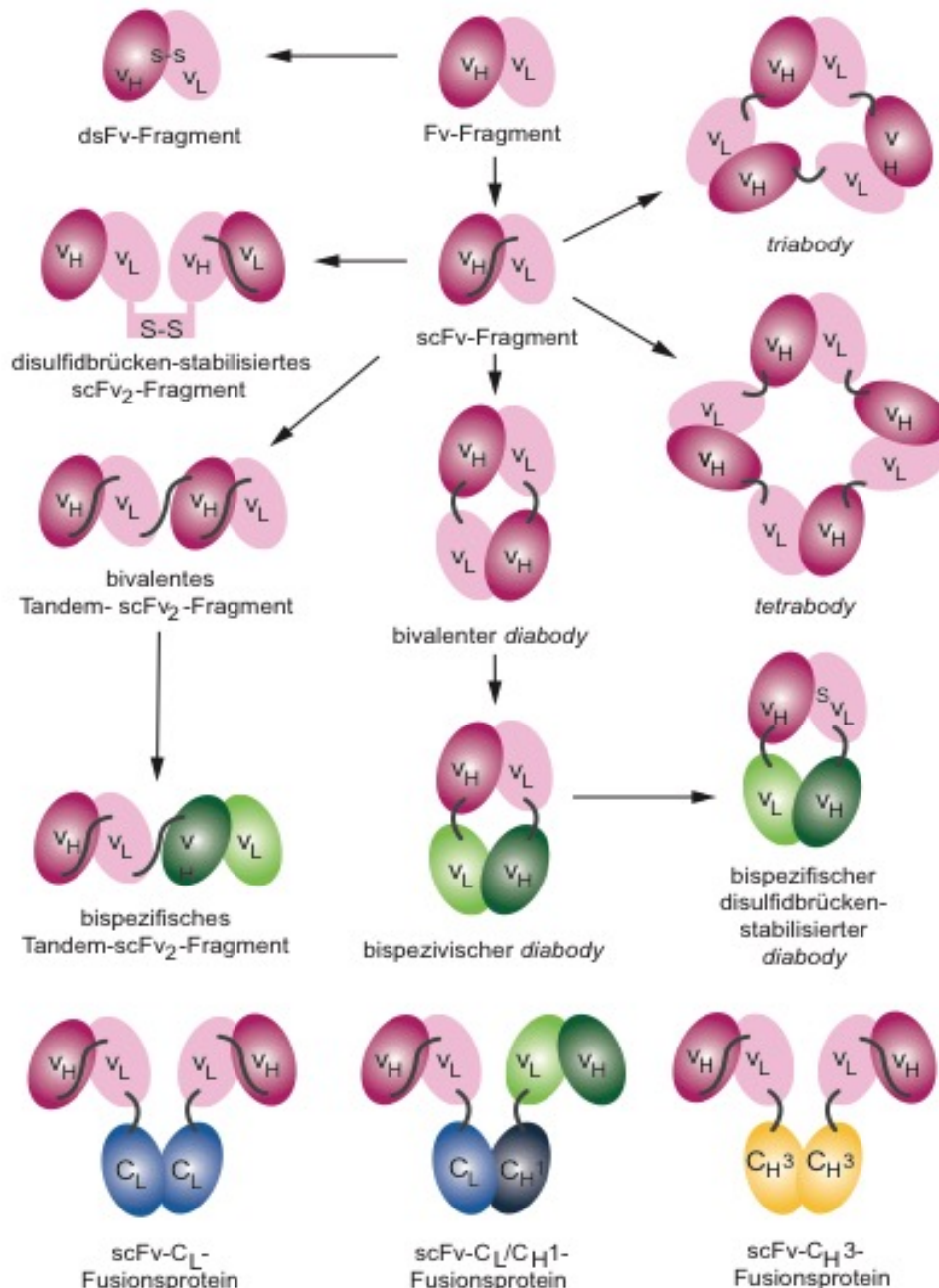


Abbildung 8: Unterschiedliche Formate rekombinanter Antikörper als grafische Darstellung. Abkürzungen: v_H : variable Domäne der schweren Kette, v_L : variable Domäne der leichten Kette; CH^1 , CH^2 , C_L : konstante Domäne; S-S: Disulfidbrücke; Fv: variabler Teil des Antikörpers; scFv: durch eine Peptidverbindung stabilisiertes Fv-Fragment; dsFv: durch eine Disulfidbrücke stabilisiertes Fv-Fragment (Abbildung nach (Stefan Dübel 2004))

1.3.2 Bispezifische Antikörper als Immuntherapeutika

Bispezifische Antikörper kombinieren die antigenbindenden Domänen zweier Antikörper in einem einzigen Molekül (Muller and Kontermann 2007).

Sie eröffneten in der Immuntherapie neue Möglichkeiten und wurden mit einer Vielzahl an unterschiedlichen Effektorfunktionen ausgestattet. So wurden bispezifische Antikörper zur Rekrutierung von Effektorzellen des Immunsystems, aber auch zur Direktion von Effektormolekülen (u. a. Radionuklide, Toxine, Enzyme), Transport-Systemen

(Nanopartikel, Liposomen) oder Viren (Adenovirus, Coronavirus) eingesetzt (*Pretargeting*). Damit finden sie Anwendung in Bereichen der Immuntherapie, Chemotherapie, Radiotherapie und Gentherapie (Muller and Kontermann 2007).

1.3.3 Triplebody

Triplebodys (*trivalent antibody fragments*) von SpectraMab, eine Entwicklung der Uni Erlangen, wurden erstmals für die Behandlung von Leukämie entwickelt und eingesetzt (Singer, Kellner et al. 2010).

Zwei Bindestellen sind auf die von den Krebsstammzellen exprimierten Antigene (siehe Abb. 9: Ag1, Ag2) ausgerichtet, die dritte Bindungsstelle ist auf die eigenen Immunabwehrzellen codiert. Der Triplebody kann so zwei Antigene der Krebszelle unterschiedlicher Population gleichzeitig binden und mit der dritten Bindestelle eine Effektorzelle rekrutieren (siehe Abbildung 9). Dies wird bereits in der Behandlung von Leukämie angewandt, indem dieses AK-Derivat die Antigene CD123 und CD33 bindet sowie CD16, ein „Trigger-Molekül“ auf natürlichen NK-Zellen, welches diese zur Beseitigung der entarteten Zellen bei akuter myeloischer Leukämie rekrutiert (Schiller, Braciak et al. 2016).

Die Triplebodys bieten so, im Gegensatz zu den bisher erforschten bispezifischen scFv-Antikörper-Fragmenten (bsscFvs), die nur ein scFv für ein Zielantigen auf der Krebszelle und ein Triggermolekül auf der Effektorzelle tragen, mögliche Vorteile im therapeutischen Ansatz und Wirkungsmechanismus. Die Dosisgabe von Triplebodys kann gegenüber anderen Antikörper (Rituximab: 10mg/kg) um das 1000-fache gesenkt werden, da die doppelte Bindung an die Krebszelle u. a. einen höheren Aviditätseffekt erzielt. Durch das „duale Targeting“ der Triplebodys kann eine bevorzugte Bindung an die doppelt positiven, im Vergleich zu den einfach positiven Zellen erreicht werden.

Die Bindungen der Triplebodys an normale Gewebsstammzellen können so im Vergleich zu den bsscFvs minimiert werden. Die Halbwertszeit der Triplebodys ist ungefähr doppelt so lang wie die der bsscFvs. Die Summe der positiven Eigenschaften dieser Triplebody-Formate fördert die Weiterentwicklung solcher Therapiepräparate.

In dieser Arbeit sollte der Nachweis der Stabilität der Bindung des Antikörpers 6H8 an die magenkarzinomspezifische Mutante E-Cadherin $\Delta 9$ erbracht werden. Zusätzlich wurde das ubiquitär auf Tumorgewebe exprimierte EpCAM als zweites Zielmolekül des trispezifischen Antikörperkonstruktes ausgewählt und das zugehörige scFv exprimiert, um im weiteren Verlauf 6H8 scFv und EpCAM scFv in ein Triplebodyformat einzubauen und im menschlichen Serum testen zu können.

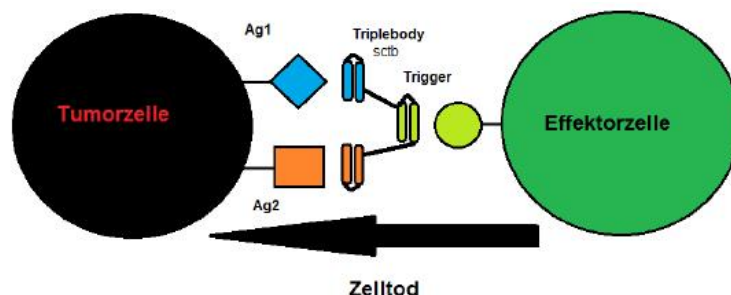


Abbildung 9: Grafische Darstellung eines Triplebody in Interaktion mit einer Tumorzelle sowie einer Effektorzelle

1.3.4 Bereits zugelassene monoklonale sowie bispezifische Antikörpertherapeutika

Bereits vor der Jahrhundertwende wurden erste Immuntherapeutika zugelassen und finden immer mehr Anwendung in der Behandlung von unterschiedlichsten Krebserkrankungen. Seit dem Jahr 2012 konnten neben den damals 25 zugelassenen Antikörpern 50 neue Zulassungen erfolgen und somit insgesamt 75 unterschiedliche Medikamente Anwendung finden (siehe Tabelle 7). Dieser Zuwachs unterstreicht den Erfolg und die Notwendigkeit neuer Ansatzpunkte in der Krebstherapie.

Die Tabelle 7 gibt einen Ausschnitt zugelassener und bereits in Anwendung stehender Antikörper.

Das Herceptin® (Hersteller Roche) wurde im Jahr 2000 in der EU zugelassen. Dies wird in der Behandlung des metastasierten Mammakarzinoms mit einer Überexpression an HER2/neu angewandt. 2010 wurde die Zulassung zur Anwendung bei Patienten mit Magenkarzinomen erweitert. Dieses Medikament bindet bei den Patienten den überexprimierten epidermalen Wachstumsfaktorrezeptor HER2/neu (humaner epidermaler Wachstumsfaktor-Rezeptor), vermindert so die Proliferation der Krebszellen und fördert die Elimination durch den zelleigenen Apoptosemechanismus.

Bezeichnung	Stoff- oder Indikationsgruppe	Zulassungsinhaber	Zulassungsnummer	Zulassungsdatum
Zevalin	Anti-CD20 Ibritumomab *-Tiuxetan	Schering AG	EU/1/03/264/001	16.01.2004
Yervoy	Anti-CTLA-4 Ipilimumab	Bristol-Myers Squibb Pharma EEIG, UK	EU/1/11/698/001 -002	13.07.2011
Xgeva	Anti-RANKL Denosumab	Amgen Europe B.V., NL	EU/1/11/703/001 -002	13.07.2011

Bezeichnung	Stoff- oder Indikationsgruppe	Zulassungsinhaber	Zulassungsnummer	Zulassungsdatum
Vectibix	Anti-EGFR (Monoklonaler IgG2-Antikörper) Panitumumab	Amgen Europe B.V.	EU/1/07/423/001-003	05.12.2007
Tecentriq	Atezolizumab	Roche Registration Ltd., UK	EU/1/17/1220	21.09.2017
Perjeta	Pertuzumab	Roche Registration Ltd., UK	EU/1/13/813	04.03.2013
Opdivo	Nivolumab	Bristol-Myers Squibb Pharma EEIG	EU/1/15/1014	19.06.2015
MabThera	Anti-CD20 Rituximab	Roche Registration Ltd.	EU/1/98/067/001-002	02.06.1998
Keytruda	Pembroli- zumab	Merck Sharp & Dohme Limited, UK	EU/1/15/1024	17.07.2015
Kadcyla	Trastuzumab Emtansin	Roche Registration Ltd.	EU/1/13/885	15.11.2013
Herceptin	Anti-HER2 Trastuzumab	Roche Registration Ltd.	EU/1/00/145/001	28.08.2000
Blinicyto	Blinatumomab	Amgen Europe B.V.	EU/1/15/1047	23.11.2015
Besponsa	Inotuzumab Ozogamicin (monoklonaler Antikörper, Antikörper- konjugat)	Pfizer Limited, UK	EU/1/17/1200	29.06.2017
Bavencio	Avelumab PD-L1	Merck Serono Europe Limited, UK	EU/1/17/1214	18.09.2017
Avastin	Bevacizumab Anti-VEGF	Roche Registration Ltd.	EU/1/04/300/001-002	12.01.2005

Tabelle 7: Die Tabelle zeigt einen Ausschnitt der bereits zugelassenen monoklonalen sowie bispezifischen (Blinicyto) Antikörperpräparate, (Paul-Ehrlich-Institut 2018)

2 ZIELSETZUNG DIESER ARBEIT

Ziel der vorliegenden Arbeit war die Entwicklung eines Antikörperkonstruktes, welches spezifisch gegen Magenkarzinomzellen gerichtet ist und diese durch die Rekrutierung von Immunzellen (hier NK-Zellen) eliminiert. Durch die Nähe der Tumor- zur Effektorzelle sowie den erhöhten Aviditätseffekt kann eine gezielte und sehr spezifische Zytotoxizität erreicht werden. In dieser Arbeit sollten zunächst geeignete scFv-Fragmente für den Einbau in ein Triplebodykonstrukt der Firma Spectramab herausgesucht und getestet werden. Zunächst musste das Fv-Fragment 6H8, welches hochspezifisch an die Mutante E-Cadherin Δ 9 binden sollte, kloniert, exprimiert und gereinigt werden. Anschließend sollten Stabilität und Bindungseigenschaften nachgewiesen werden. Dazu musste zunächst die Mutante E-Cadherin Δ 9 hergestellt und in das Plasmid pDESTeCadherin Δ 9 zur Expression in eukaryontischen Zellen kloniert werden. Als zweites *Target* auf den Tumorzellen wurde EpCAM als Tumormarker ausgewählt. Ein EpCAM-spezifisches scFv sollte kloniert, exprimiert und gereinigt werden. Die Stabilität und Bindungseigenschaften dieses scFv sollten ebenfalls überprüft werden.

Stabile tumorspezifische scFvs mit guten Bindungseigenschaften könnten die Grundlage für einen magenkarzinomspezifischen Triplebody sein, der das Potenzial hat, zukünftig ein wirksamer Baustein in der Behandlung des Magenkarzinoms zu werden.

3 METHODEN UND MATERIAL

3.1 Material

3.1.1 In dieser Arbeit verwendete Verbrauchsmaterialien

Einwegspritzen:	Braun
1, 5, 10, 20 ml	
Membranfilter:	Schleicher & Schuell
Nitrozellulose-Membranfilter	
Reaktionsgefäße:	Eppendorf-Netheler
0,5, 1,5, 2 ml	
Röntgenfilm X-Omat DS	Eastmann Kodak Company
SDS-PAGE:	Biotech, Biometra
Kulturgefäße (Zellkultur)	Nalge Nunc International
Petrischalen	
Pipettenspitzen:	
200–1000 µl	Sarstedt
5–200 µl	Sarstedt
	GE Healthcare
Whatmann 1 mm Filterpapier	
Zentrifugenbecher	Sarstedt

3.1.2 In dieser Arbeit verwendete Geräte

Benutzung/ Funktion	Gerät	Hersteller	Bemerkung
Absauggeräte		Vacubrand	BVC 21
Brutschränke	Heraeus		
Entwickler	Curix 60	AGFA	
	BD FACSCanto™		
Kühlgeräte			
Mikroskop	Axiovert 40 CFL	Zeiss	HBO50/AC
Pipettierhilfe		Eppendorf Research plus Hirschmann Laborgeräte	2–1000 µl
Schüttelin- kubator		Thermomixer Eppendorf	2 ml Comfort
Schüttelgeräte		STUART SCIENTIFIC	
Sicherheits- Werkbank	Heraeus Instruments	HERAsafe®	
Spannungsgerät		Bio-Rad	PowerPac Universal TM (500 V, 2,5 A, 500 W)
Spectrophoto- meter (Nanodrop)		PEQLAB	ND-1000
Thermocycler		Biometra	T3
Thermorührer	IKAMAG RH	Gerhardt Jahnke & Kunkel IKA- Laborgeräte	MAG-H
Vortexer			
Waage		Sartorius Sartorius	TE 153S (max. 150 g) LE 225D (max. 220 g)

Benutzung/ Funktion	Gerät	Hersteller	Bemerkung
Zentrifuge	Zentrifuge (Thermo)	Eppendorf centrifuge 5417R Thermo Scientific	Seriennummer 30507391
	Zentrifuge (mini) Rotina 35 R	Sarstedt Hettich Zentrifugen	

Tabelle 8: Geräte, welche in dieser Forschungsarbeit angewandt wurden

3.1.3 Software

Bionmetra	BioDocAnalyze	2.0
NanoDrop	1000	3.8.1
SD	FACSDiva	Software
MikroWin 2000		

3.1.4 Allgemeine Chemikalien

3.1.4.1 Standardlösungen, Standards und Kits

Blocklösung	5 % Milchpulver, dest. H ₂ O
Coomassie-Lsg. (SDS-PAGE)	Bio-Rad
Entfärber	Bio-Rad
Hanks' Salt Solution	Biochrome
Mayers Hämatoxylin-Lsg.	Sigma
Mounting Medium	Biochrome

Standards und Kits

Plasmid Spain Kits:

QIAprep Spain Plasmid Miniprep Kit
QIAprep Plasmid Midiprep Kit
QIAquick PCR Purification KIT

Hersteller:

Qiagen
Qiagen
Qiagen

Kits zur DNA-Sequenzierung:

DNA-Sequencing KIT, Big Dye	Perkin Elmar,	Applied	Biosystem,
	Weiterstadt		

Terminator Cycle Sequencing

Kits zur DNA- Isolierung:

JETSORB Gel Extraction Kit

JetQuick Plasmid Miniprep

Genomed GmbH, Bad Oeynhausen

QIAquick Gel Extraction Kit

Qiagen GmbH, Hilden

Protein-Größenstandards

SDS-PAGE Standard, Low Range

Prestained SDS-PAGE Standard

Bio-Rad Laboratories GmbH, München

Broad Range

New England Biolabs GmbH, Schwalbach

DNA-Größenstandards

1/BstEII

Verdau

100 bp DNA-Leiter

1 kb DNA-Leiter

New England Biolabs GmbH, Schwalbach

3.1.4.2 Puffersorten

1) PBS-Puffer

NaCl	(80	g)
KCL	(2	g)
Na ₂ HPO ₄	(14,4	g)
KH ₂ PO ₄	(2,4 g)	

2) Tris-Puffer (Running Buffer)

3) TBS-T-Puffer

4) TB-Medium auf pH 7,6 mit Phosphat-Puffer eingestellt

Pepton	(12	g)
Hefeextrakt	(24	g)
Glycerin	(5	g)
ad. dH ₂ O	(900 ml)	

5) Periplasma-Aufschlusspuffer

6) Laemi Probenpuffer

7) Trenngelpuffer (Resolving Buffer 12 %)

Acrylamid	(4	ml)
1,5 M Tris pH 8,8	(2,5	ml)
10 % SDS	(100	µl)
10 % APS	(100	µl)
TEMED	(5	µl)
ddH ₂ O	(3,35 ml)	

8) Sammelgelpuffer (Stacking Buffer 4 %)

Acrylamid	(1,34	ml)
0,5 M Tris pH 6,8	(2,5	ml)
10 % SDS	(100	µl)
10 % APS	(50	µl)

	TEMED	(4	μl)
	ddH ₂ O	(6 ml)	
9) Transferpuffer (Western Blot)			
	Glycine	(288	g)
	Tris Base	(60,4	g)
	Methanol	(200 ml)	
10) Laufpuffer (Running Buffer)			
	Tris-Base	(30,3	g)
	Glycine	(144	g)
	SDS	(10 g)	
11) Ni-NTA-Waschpuffer			
12) Ni-NTA-Elutionspuffer			
13) Restore™ Western Blot Stripping Buffer	Pierce, Rockford, IL, USA		
14) ECL-Reagenz	Amersham Pharmacia Biotech GmbH, Europe, Freiburg		
15) Restriktionsenzyme	NEB Biolabs		

3.1.5 Zellkulturen/Zelllinien

Jurkat	Humane akute lymphozytische Leukämie-Zelllinie
LOX	Melanome
Panc-1	Humane Pankreaskarzinomzelllinie
5830 i	Humane Magenkarzinomzelllinie
E. coli JM83	
HEK 293T	Humane embryonale Nierenzellen
OE19	Ösophaguszelllinie

Tabelle 9: Alle in dieser Arbeit verwendeten Zelllinien

3.1.6 Zellkulturmedien

<u>DMEM</u>	Lonza, Gibco by life
• Penicillin/Streptomycin	(Dulbecco's Modified Eagle Medium with L-glutamine)
• FBS	
<u>RPMI 1640 komplett</u>	(with L-glutamine 1), Lonza
<u>TUM</u>	
• Penicillin/Streptomycin	

Trypsin

- EDTA 0,25 % Gibco

3.1.7 Antikörper und Färbereagenzien

Anti-mouse IgG-HRP sc-2055, human absorbed	Santa Cruz Biotechnology, Inc.
Pierce® Anti-6x-His Epitope Tag, mouse	Thermo Fisher Scientific®
Stabilized Peroxidase-conjugated Goat anti-Mouse	Thermo Fisher Scientific®
Sekundärer biotinylierter Antikörper, anti-Mouse	Thermo Fisher Scientific®

Färbereagenzien:

Cell & Tissue Staining Kit; HRP-AEC-System	R&D Systems®
--	--------------

3.2 Methoden

3.2.1 Molekularbiologische Methoden

3.2.1.1 Kultivierung und Konservierung von E.-coli-Stämmen

E. coli wurden als Flüssigkulturen oder auf festen Agar-Platten mit *Lysogeny Broth* (LB) angezogen. Selektiert wurden diese mittels der spezifischen Antibiotika Ampicillin (Amp) oder Kanamycin. Um ein optimales Wachstumsumfeld zu schaffen, wurden diese in Bakterien-Inkubatoren bei 37 °C gehalten. Aufbewahrt wurden die Agarplatten anschließend bei 4 °C für mehrere Wochen.

3.2.1.2 Transformation von E. coli mit Plasmid-DNA

Es wurde die klassische CaCl₂-Methode angewandt, um die E.-coli-Zellen in eine kompetente Zellform zu überführen. Je nach E.-coli-Stamm konnten ca. 10⁵ bis 10⁶ Transformanten pro µg Plasmid-DNA erhalten werden. In einem Verhältnis von 1:100 wurden exakt 50 ml LB-Medium ohne Antibiotikum mit einer stationären Übernachtungskultur des zu transformierenden E.-coli-Stammes angeimpft und bei 37 °C und 200 rpm inkubiert. Als die optische Dichte von OD₅₅₀ = 0,5 erreicht wurde, wurde die Kultur in einem 50-ml-Kunststoffröhrchen zentrifugiert (4100 g, 4 °C, 10 min) und damit sedimentiert. Anschließend wurde das Sediment in 40 ml eiskalter 0,1 M MgCl₂-Lösung aufgenommen und wieder zentrifugiert. Das entstandene Sediment wurde in 20 ml eiskalter 50 mM CaCl₂-Lösung resuspendiert und anschließend auf Eis für 30 Minuten inkubiert. Ein weiterer Zentrifugationsschritt folgte, anschließend wurde das Pellet wieder in 2 ml 50 mM CaCl₂ und 15 % v/v Glycerin in Lösung gebracht, welche in Aliquoten mit jeweils 250 µl für die Transformation zur Verfügung gestellt wurden. Gelagert wurden die Überschüsse bei –

80 °C. Die verwendeten Lösungen wurden sterilisiert und auf 4 °C abgekühlt. Für die Transformation von *E. coli* wurden 250 µl von der Zellsuspension mit 1 ng Plasmid-DNA angesetzt und anschließend für 45 Minuten auf Eis inkubiert. Der Ansatz wurde in einem 15-ml-Kulturröhrchen im 42 °C warmen Wasserbad für 1 Minute erwärmt. Nachdem 2 ml LB-Medium hinzugefügt wurden, folgte eine 45-minütige Rüttelung bei 37 °C. 100 µl der Suspension wurden auf eine LB-Agarplatte pipettiert, welche das entsprechende Antibiotikum enthielt. Inkubiert wurde über Nacht bei 37 °C.

3.2.1.3 DNA-Isolierung aus E.-Coli-Stämmen

Mittels alkalischer Lyse von Bakterien nach der Methode von Birnboim (1979) wurde die Plasmid-DNA aus *E. coli* nach analytischem Maßstab isoliert (Birnboim and Doly 1979). Dafür wurde der Plasmidisolierungskit „Plasmid-Maxi-Kit“ der Firma Qiagen verwendet.

4 ml der Übernachtskultur der Transformanden wurde entnommen und isoliert. Danach wurden 75 µl 10 mM Tris/HCl der Plasmid-DNA entnommen und bei -20 °C gelagert. Im Anschluss mussten 50 ml der Übernachtskultur zentrifugiert und nach Herstellerangaben aufgearbeitet werden. Die DNA wurde in 100 µl 10 mM Tris/HCl, pH 8 aufgenommen. Darin waren ca. 10¹ µg Plasmid-DNA enthalten.

3.2.1.4 DNA-Mutagenese

Invitrogen™ hat eine universelle Klonierungstechnik, die Gateway Cloning Technique, entwickelt, welche in dieser Arbeit für die DNA-Mutagenese verwendet wurde. Sie ermöglicht den Transfer von DNA-Fragmenten zwischen verschiedenen Klonierungsvektoren unter Beibehaltung des Leserahmens. Die Gateway-Technologie basiert auf dem Bakteriophagen-Lambda-Rekombinationssystem, das die Integration von Lambda in das *E.-coli*-Chromosom und den Wechsel zwischen den lytischen Proteinen erleichtert.

Das System nutzt somit die sequenzspezifische Rekombinationsfähigkeit des Bakteriophagen *Lambda* (*homologe Rekombination*). Mithilfe seiner Enzyme werden DNA-Fragmente, die von Lambda-Rekombinations-Sequenzen flankiert sind, *attL* (Attachment Site left), aus einem sogenannten „Entry“-Vektor in den erwünschten „Destination“-Vektor (Zielvektor) transferiert, der die korrespondierenden Rekombinations-Sequenzen *attR* (Attachment Site right) enthält. Zwei Rekombinationsreaktionen bilden die Grundlage für das Gateway-Klonen, die BP-Reaktion sowie die LR-Reaktion (Scientific 2017).

BP-Reaktion (PCR-Fragment + Donor - Vektor = Eintrittsklon)

Dem Herstellerprotokoll entsprechend wurden Primer mit den Rekombinationssequenzen konstruiert und damit die gewünschten Sequenzen durch PCR amplifiziert. Die Aufreinigung

der PCR-Produkte erfolgte mit dem Extraktions-Kit von Qiagen. Die Gateway-Klonierung wurde nach Anweisung des Herstellers durchgeführt. pcDNADEST47 wurde als Entry-Vektor benutzt. Anschließend erfolgte die LR-Reaktion.

LR-Reaktion (Eintrittsklon + Zielvektor = Expressionsklon)

Die LR-Reaktion erleichtert die Rekombination eines attL-Substrats (Eintrittsklon) mit einem attR-Substrat (Zielvektor), um einen attB-enhaltenden (attB: Bacterial Attachment Site) Expressionsklon zu erzeugen. Die Reaktion wird durch den LR Clonase™ II Enzym-Mix katalysiert. Eingabevektor pENTReCadherin und Zielvektor pCDNA-DEST47 wurde zu einem Gesamtvolumen von 8 µl mit TE-Puffer gemischt.

Die vorsichtige Zugabe des LR Clonase™ II-Enzyms (Invitrogen™) ermöglichte die Reaktion, welche durch Inkubation für 1 h bei 25 °C ablief. Die Reaktion wurde anschließend durch Zugabe von 1 µl Proteinase-K-Lösung gestoppt. Es folgte eine weitere Inkubation bei 37 °C für 10 min.

Für eine Transfektion in E. coli wurde 1 µl der LR-Rekombinationsreaktion verwendet.

Die Rekombinationsreaktion wurde bis zu einer Woche vor der Transformation bei –20 °C gelagert.

3.2.2 Zellbiologische Methoden

3.2.2.1 Kultivierung eukaryotischer Zellen

Alle Kulturen wurden im Inkubator bei 37 °C, 5 % CO₂ und gesättigtem Wasserdampf gehalten. Die in dieser Arbeit verwendeten Zelllinien wurden bereits in Tabelle 9 dargestellt.

Linie	Typ	Medium
Jurkat	Suspension	RPMI komplett (RPMI 1640, 10 % FCS; 2 mM L-Glutamin; 1 mM Na-Pyruvat), 1 x Pen-Strep
HEK 293T	Adhärent	RPMI komplett (RPMI 1640, 10 % FCS; 2 mM L-Glutamin; 1 mM Na-Pyruvat), 1 x Pen-Strep
Magen-Ca 5830 i	Adhärent	RPMI komplett (RPMI 1640, 10 % FCS; 2 mM L-Glutamin; 1 mM Na-Pyruvat), 1 x Pen-Strep
Ösophagus-CA OE19	Adhärent	RPMI (RPMI 1640 + 2mM Glutamine + 10% Foetal Bovine Serum (FBS))

Tabelle 10: Tabellarische Darstellung der Zelllinien mit dem jeweils benötigten Medium

Bei den Magenkarzinomzellen musste alle 3–4 Tage der Mediumüberstand ab pipettiert werden und diese anschließend durch Zugabe von 0,25 % Trypsin/EDTA (10 min

anwärmen bei 37 °C) vom Zellkulturflaschenboden gelöst und mit neuem Medium versorgt werden. Suspensionszellen wurden je nach Zelldichte alle 4 Tage im Verhältnis 1:15 verdünnt und weiterkultiviert.

3.2.2.2 Transfektion eukaryotischer Zellen HEK 293T

Eine Transfektion erfolgte mittels Lipofectamine 2000 (Thermo Fisher Scientific®) nach Herstellerangaben bei einer Konfluenz der Zelllinien von 50–80 %.

6 µg Plasmid DNA wurden dabei vorsichtig in 300 µg DMEM (ohne FCS, ohne PBS) gemischt, anschließend nach 20 µl „PLUS- Zugabe“ erneut vermischt sowie 15 min bei Raumtemperatur inkubiert. 830 µl der Lipofectamine-DMEM-Mischung wurden zu dem Plasmid-DMEM-Gemisch pipettiert und erneut 15 min bei Raumtemperatur inkubiert. Das Medium der Zielzellen wurde abgenommen und mit 5 ml DMEM aufgefüllt. Der Lipofectamine-Plasmidansatz (1.540 µl) wurde sorgfältig auf die Zellen aufgebracht und bei 37 °C und 5 % CO₂ für 5 h inkubiert. Anknüpfend wurde das Medium mit DMEM (mit FCS/mit P/S) auf 9 ml aufgefüllt und über Nacht bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert. Die transgene Aktivität wurde 24–72h nach erfolgter Transfektion geprüft.

3.2.3 Histologische Methoden

Der immunhistologische Nachweis des Oberflächenproteins EpCAM durch den scFv-EpCAM erfolgte mittels Immunhistochemie. Dazu wurden OE19 Zellen auf Objektträgern fixiert.

3.2.3.1 Vorbereitung der Objektträger

Ca. 30.000 Zellen der zu untersuchenden Zelllinie wurden in 1 ml Nährmedium mit Zusätzen, in jeweils eine 2 cm² große Vertiefung einer Zellkulturplatte gegeben. Diese Platte hatte insgesamt 24 Vertiefungen, in welche zuvor ein steriles, rundes Glasplättchen gelegt worden war, auf dem die Zellen wachsen sollten. Die Zellkulturplatte wurde einen Tag lang im Brutschrank inkubiert, anschließend wurde das Medium abgenommen und jede Vertiefung dreimal mit 1 ml vorgewärmter PBS-Lösung gewaschen. Dann wurde 1 ml Medium ohne Zusätze in jede verwendete Vertiefung gegeben und anschließend sofort fixiert (Aceton) und gefärbt.

3.2.3.2 Immunhistochemie

Der Bindenachweis erfolgte mittels HRP-AEC Systems (Cell & Tissue Staining KIT, R&D Systems). Zunächst wurden die fixierten Zellen mit 50 µl des gereinigten scFvs 1 h bei Raumtemperatur inkubiert. Es folgte eine Waschung mit TBS-T, der Pufferüberschuss

wurde abgeschüttet. Für den Nachweis der Bindungsaktivität wurden 20 µl single-chain-Fragment-EpCAM-Pufferlösung mit 180 µl Diluent Solution auf ein Volumen von 200 µl gebracht. Es wurde 100 µl der scFv-Lösung auf einen Schnitt pipetiert und über Nacht im Kühlschrank inkubiert. 100 µl eine HRP-konjugierten anti-HIS-Antikörpers (3D5) 1/1000 verdünnt in TBS auf die Zellen gegeben. Anschließend wurde 1 h bei Raumtemperatur inkubiert.

Es erfolgte eine Waschung in einem, mit Calcium und Magnesium angereichertem TBS-T-Puffer. Mit einem Tropfen AEC-Chromagen, wurden 2 ml ACE-Chromagen-Puffer angereichert um es anschließend mit fünf Tropfen pro Slite auftragen zu können. Der Farbumschlag ist bereits nach wenigen Augenblicken sichtbar geworden und wurde mit dem Eintauchen der Schnitte in Aquadest gestoppt. Für die Gegenfärbung wurden die Zellen für kurze Zeit in Mayers-Hämalaun-Lösung gehalten, die Farbüberschüsse mit Leitungswasser entfernt und abschließend mit Aquatex gedeckelt.

3.2.4 Allgemeine proteinbiochemische Methoden

3.2.4.1 SDS-PAGE (SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese)

In einer diskontinuierlichen SDS-PAGE (Sodium-Dodecylsulfate-Polyacrylamid-Gelelektrophorese) kann das Molekulargewicht zwischen 5 und 250 kDa von bestimmten Proteinen in einem Proteingemisch definiert werden.

Zunächst werden die Proteine durch das SDS (Natriumdodecylsulfat) mit einer negativen Ladung behaftet, um die Eigenladung der Proteine zu überdecken. So kommt es zu einer Wanderung der Proteine durch das Sammel- und anschließend durch das Trenngel in Richtung Anode.

Das mit 10 ml angesetzte Trenngel bestand aus 4 ml Acrylamid, 2,5 ml 1,5 M Tris (pH 8,8) und 100 µl 10%igem SDS. Hier wurden zur Polymerisation 5 TEMED und 100 µl 10%iges APS hinzugefügt. Anschließend wurde das Trenngelgemisch zwischen zwei abgedichtete Glasplatten pipetiert und mit 3,35 ml Wasser aufgeossen, um es vor Luftzutritt abzudichten. Im nächsten Schritt wurde das 4%ige Sammelgel hergestellt, welches aus 1,34 ml Acrylamid-Stammlösung, 0,5 M Tris (pH 6,8) sowie 100 µl 10%igem SDS zubereitet wurde. Mit Zugabe von 4 µl TEMED und 50 µl 10%igem APS wurde die Polymerisation gestartet. Das Sammelgel wurde auf das bereits polymerisierte Trenngel aufgetragen, indem es zwischen zwei Glasplatten oberhalb des bereits eingegossenen Trenngels gegossen wurde. Oben wurde ein Taschenformer mit zehn Zähnen aufgesetzt. In diese Taschen wurden die Proteingemische mit jeweils 20 µl der Lösungen pipetiert, wobei diese vorher eine Denaturierung durchlaufen mussten. Hierfür wurden 40 µl Proteingemisch und 10 µl Auftragspuffer angesetzt und für 5 Minuten auf 95 °C erhitzt, um eine klare Abbildung

der Banden zu erzielen. Um die Größe der Proteine bestimmen zu können, wurde ein Größenmarker in Form eines Bromphenolblau-Markers ebenfalls aufgetragen. Nun wurde das polymerisierte Sammel-Trenngelgemisch in eine vertikale Elektrophoresekammer eingespannt und mit SDS-Laufpuffer aufgefüllt. Die Gelelektrophorese wurde mit 120 V und 30 mA gestartet und dauerte 1,5 Stunden. Nach Abschluss wurde das Gel aus der Kammer entnommen, das Sammelgel abgetrennt und das Trenngel für 20 Minuten in einer Coomassie-Brillant-Blau-Färbelösung geschwenkt, um über Nacht in einer Entfärbelösung zu liegen. Dadurch werden die Proteinbanden sichtbar gemacht und können anhand des aufgetragenen Bromphenolblau-Markers definiert werden (siehe Abbildung 10).

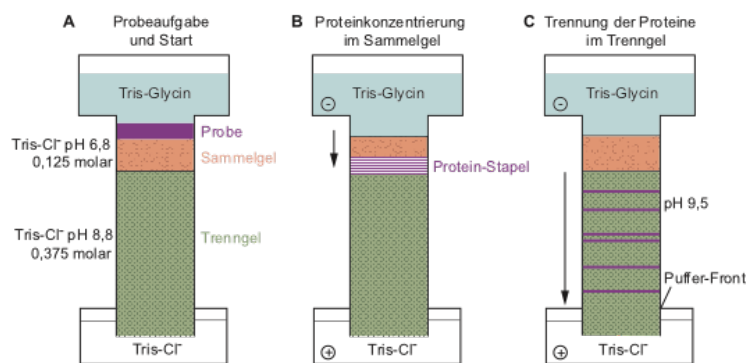


Abbildung 10: Diskontinuierliche Tris-Glycin-Gelelektrophorese. A: Das Proteingemisch befindet sich noch oberhalb des Sammelgels; B: Das Proteingemisch hat das Sammelgel durchlaufen; C: Das Proteingemisch hat das Trenngel durchlaufen, die Proteine wurden anhand ihrer Größe voneinander getrennt und können anhand des Bromphenolblau-Markers definiert werden (Abbildung nach (Lottspeich & Engels, 2006))

3.2.4.2 Produktion und Reinigung von Proteinen

Zur Anfertigung der benötigten Proteine wurden Expressionsvektoren verwendet.

Diese sind für die Produktion einer Polypeptidkette im periplasmatischen Raum von

E. coli zuständig und liefern das hierzu benötigte Strukturgen des Proteins als Fusion mit dem Gen für eine bakterielle Signalsequenz (*peIB*: *Pektat-Lyase B aus Erwinia carotovora*). Eine selektive Permeabilisierung der äußeren Membran von *E. coli* ermöglichte eine Isolierung der Periplasmafraktion samt rekombinanten Proteinen.

3.2.4.3 Aufzucht, Induktion und Ernte von Kulturen im Schüttelkolben

In einem 2-Liter-Erlenmeyerkolben wurde 1 Liter LB/Amp-Medium im Verhältnis 1:50 mit der stationären Übernachtskultur angeimpft. Diese Kultur wurde bei 26 °C und 300 rpm geschüttelt und stündlich einer optischen Dichtemessung zur Wachstumskontrolle zugeführt. Bei einer optischen Dichte von 0,5 wurde mit 1 ml IPTG (Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid) induziert. Die Induktion dauerte 2 bis 3 Stunden. In 8 Zentrifugenbecher verteilt, wurde die Ernte der Zellen bei 4 °C und 4.200 g für 15 min

zentrifugiert. Nach einer Entfernung des Medienüberstandes wurde das Pellet 30 min inkubiert, nachdem es in einem 50 ml Kunststoffröhrchen durch Zugabe von 20 ml eiskaltem Saccharose-Aufschlusspuffer (100 mM Tris/HCl pH 8, 500 mM Saccharose, 1 mM EDTA) auf Eis resuspendiert werden konnte. Um das rekombinante scFv-Fragment zu präparieren, wurde der Suspension 5 mg Lysozym zugegeben. Zwei aufeinanderfolgende Zentrifugationsschritte trennten die Sphäroplasten (Sigma, 4K10, 5.000 rpm, 4 °C, 15 min sowie SS-34, 15.000 rpm, 4 °C, 15 min), sodass das periplasmatische Extrakt über Nacht zur Reinigung des rekombinanten Proteins dialysiert werden konnte. Dies geschah mittels Affinitätschromatografie gegen das 100-fache Volumen an entsprechendem Chromatografie-Puffer.

3.2.4.4 Western Blot

Western Blotting ist eine Methode zur Quanti- und Identifizierung von Proteinen, wobei die Proteine nach dem gelelektrophoretischen Auftrennen auf eine Nitrozellulosemembran übertragen und im Anschluss mittels spezifischer Antikörper nachgewiesen werden.

Die SDS-PAGE wurde wie in 1.4.3.1 beschrieben durchgeführt. Anschließend wurde das Trenngel 20 min in Transferpuffer (20 % v/v Methanol, 1 x SDS-Laufpuffer) geschwenkt. Eine Nitrozellulose-Membran diente zum Elektronentransfer.

Für den Elektronentransfer wurde ein Transfersandwich, bestehend aus einem Schwamm, drei Stück Whatman-Filterpapieren (je 8,5 cm x 5,5 cm), dem Trenngel, der mit Transferpuffer benetzten Nitrozellulose-Membran sowie drei weiteren Whatman-Filterpapieren und zuletzt erneut einem Schwamm aufgebaut. Alles wurde unter Vermeidung von Lufteinschlüssen und nach Herstellerangaben in die Elektroblob-Apparatur eingebaut und 90 min bei einer Spannung von 100 V im Kühlraum durchgeführt. Die Nitrozellulose-Membran wurde anschließend drei Mal für 15 min in ca. 10 ml TBS-T geschwenkt und zur Absättigung unspezifischer Bindungen bei Raumtemperatur mit Milchpulver-Blockadereagenz (5 % Magermilchpulver in PBS-T) inkubiert.

Für den Nachweis der spezifischen Bindung wurde über Nacht die 6H8-Antikörper-Pufferlösung unverdünnt (10 µl Antikörper zu 10 ml PBS) auf die Membran gebracht und inkubiert. Am nächsten Tag erfolgte dreimal eine Waschung für je 15 Minuten mit TBS-T, sodass im Anschluss die Membran mit einer 1: 1.000 verdünnten Sekundärantikörper-Lösung (10 µl Anti-His-Antikörper und 10 ml TBS-T) für 60 Minuten inkubiert werden konnte. Anschließend wurde erneut mit TBS-T dreimal gewaschen.

Die Nachweisreaktion erfolgte durch die Meerrettichperoxidase HRP (*Horseradish Peroxidase*) welche katalytisch ECL (*Enhanced Chemiluminescence*) als Substrat unter Lichtemission umsetzt und kovalent an den Zweitantikörper gebunden ist. Die im Verhältnis

1:1 gemischte Chemilumineszenzlösung (Pierce® ECL Western Blotting Substrate bzw. SuperSignal® West Dura Extended Duration Substrate, Thermo Fisher Scientific®) wurde auf die Membran gegeben und für eine Minute inkubiert.

Die Entwicklung erfolgte in einer Dunkelkammer, wobei die Membran in einer Klarsichthülle in einer Filmkassette fixiert, auf ein Röntgenbild (Kodak® BioMax Light Film, Sigma-Aldrich) gelegt, exponiert und entwickelt wurde.

3.2.4.5 Affinitätschromatografie

Die in der vorliegenden Arbeit verwendeten Proteine sind mit einer Polyhistidin-Markierung versehen, welches Imidazol als aromatische Verbindung enthält *und Histidin bindet*.

20 ml der Triplebody-Pufferlösung (DMEM) wurde mit 2 ml des 50%igen Ni-NTA (Nickel-Nitrilotriacetic Acid) vermischt, bei 4 °C und 200 rpm für 60 min rotiert und anschließend eine Minute bei 1.000 g zentrifugiert. Das entstandene Pellet wurde mit 2 ml Waschpufferlösung aufgefüllt und wieder bei gleichen Bedingungen 30 min bei 4 °C und 200 rpm durchmischt. Nun folgte eine dreifache Waschung mit 1 ml Elutionspufferlösung, sodass drei Elutionsproben mit je 50 µl auf das Gel aufgetragen werden konnten. Über Dialyse-Kassetten (Slide-A-Lyzer® 3,5K Dialysis Cassettes, Thermo Fisher Scientific®) erfolgte eine Umpufferung der gereinigten Proteine. Gerührt wurde bei 4 °C über Nacht im Zielpuffer (PBS angereichert mit je 5 ml Calcium und Magnesium), wobei die Taschen der Kassetten mit 500 µl der Probe gefüllt wurden. In dieser Arbeit wurden Proteine aufgereinigt, welche eine Polyhistidin-Markierung trugen. Die Aminosäure Histidin enthält Imidazol als aromatische Verbindung, welche im Überschuss zur Elution zugegeben wird, damit so die zurückgehaltenen Proteine von der Säule verdrängt werden können. Die Beseitigung des Imidazols erfolgte bei der Umpufferung des gereinigten Proteins.

4 ERGEBNISSE

4.1 Produktion, Aufreinigung und funktionelle Charakterisierung des rekombinanten Single-Chain-Fragmentes 6H8

Das Single-Chain-Fragment 6H8 wurde aus variablen Domänen des Ratten-Antikörpers d9mAb (Clone 6H8) konstruiert (Becker, Kremmer et al. 1999). Der Antikörper 6H8 bindet nachweislich die magenkarzinomspezifische Variante des E-Cadherin $\Delta 9$ (Senekowitsch-Schmidtke, Schuhmacher et al. 2001).

Die Sequenzen der variablen Domänen dieses Antikörpers für die Konstruktion des Triplebody wurden von der Münchner Arbeitsgruppe Senekowitsch-Schmidtke et al. 2001 u. a. zur Verfügung gestellt (Senekowitsch-Schmidtke, Schuhmacher et al. 2001). Die variablen Domänen des Antikörpers wurden von der Firma Geneart® in Regensburg konstruiert und im Vektor pMA zur Verfügung gestellt. Zunächst musste ein Expressionsvektor für das scFv konstruiert werden, bei welchem das Strukturgen für die variablen Domänen unter der Kontrolle des tet-Promotors/Operators steht, um die Stabilität und Bindungsaffinität des scFv zu überprüfen. Für die Sekretion in das bakterielle Periplasma liegt das Strukturgen für das scFv an ihrem 5'-Ende mit der Signalsequenz der Pektat-Lyase B (pelB) fusioniert vor. Die Signalpeptide werden abgespalten, nachdem die Polypeptidketten über die innere Membran der Bakterienzelle ins Periplasma sezerniert wurden. Die intra- und interchenaren Disulfidbrücken müssen sich ausbilden und die Polypeptidketten falten können. Dies wird im vorherrschenden oxidierenden Milieu des Periplasmas ermöglicht.

Das scFv-Fragment, welches im oxidierenden Milieu korrekt gefaltet wurde und Disulfidbrücken bilden konnte, konnte anschließend mithilfe eines an den Carboxy-Terminus der schweren Immunglobulinkette fusionierten Affinitätsanhängsels aus der periplasmatischen Proteinfraction isoliert werden.

4.2 Konstruktion des Expressionsvektors für die bakterielle Produktion des E-Cadherin- $\Delta 9$ -spezifischen Fragmentes scFv 6H8

Für die Synthese des E-Cadherin- $\Delta 9$ -spezifischen scFv-Fragments (scFv 6H8) als Fusionsprotein (siehe Abbildung 12) mit dem Hexahistidinanhängsel (His-Tag) wurde der Expressionsvektor PAK400scFv6H8 konstruiert (Skerra 1994). Hierfür wurde die DNA mit Restriktionsenzymen aus dem Vektor pMA ausgeschnitten und in den Vektor pAK400 inseriert. Die korrekte Zusammensetzung des Plasmids PAK400scFv6H8 wurde mittels Sequenzanalyse bestätigt (siehe Abbildung 11).

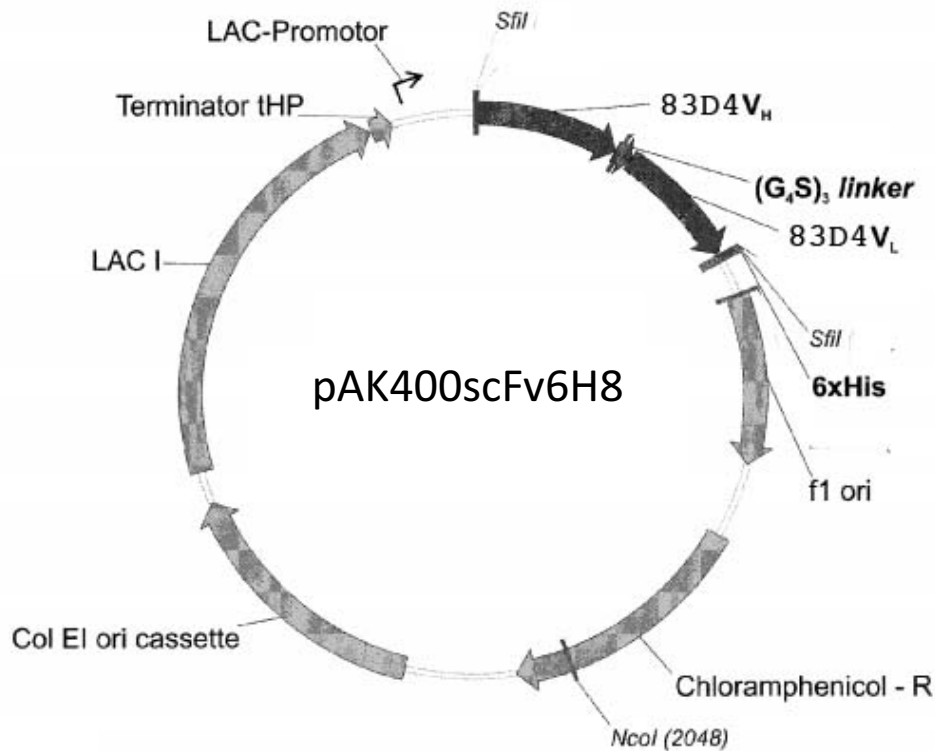


Abbildung 11: Schematische Darstellung des Expressionsplasmids pAK400scFv6H8: pAK400 kodiert für das 6H8scFv-Fragment, bestehend aus den variablen Domänen des Ratten-Antikörpers 6H8. Die Strukturgene V_L und V_H liegen zur Sekretion in den periplasmatischen Raum von *E. coli* an ihren 5'-Enden fusioniert mit den bakteriellen Signalsequenzen der Pektat-Lyase vor. Am 3'-Ende des Gens der schweren Kette befindet sich die kodierende Sequenz für ein Hexahistidin-Affinitätsanhängsel (6xHis). Die Transkription des resultierenden Fusionsgens steht unter der Kontrolle des lac-Promotor/Operators. Die Abkürzungen ori und f1 bezeichnen den Replikationsursprung der pUC-Plasmidfamilie sowie die intergenische Region des filamentösen Phagen f1

```

MADIVLSQAPLSVSVTPGESASISCRSSSKSLLSTKGITSLYWYLQRPQKSPQLLIYQLSN
LASGVPDRFSSSGSEADFTLKISKVETADVGVYYCGHRLENPPTFGGGTKLELKRADG
GGGSGGGGSGGGGSGGGGSQVQLQQSGEELAKPGSSVRISCKASGYTFPQVQLQQ
SGENYVAHSSWIKQTTGQTLEWIGYIAPGSGTALYNEKFKGKATLTVDRSSNTAYMQL
NSLTPVDTAVYYCARFDGYFDYWGQGTTVTVSS

```

Abbildung 12: Aminosäuresequenz der variablen Domänen des scFv 6H8: Die Aminosäuren der CDRs sind fett markiert

4.2.1 Aufreinigung und Detektion in der SDS-PAGE

Für die gentechnische Herstellung und Überexpression des scFv 6H8 wurde der *E. coli*-Stamm JM83 verwendet.

Der Expressionsvektor pAK400scFv6H8 wurden mittels Transfektion in den *E. coli*-Stamm JM83 eingebracht und Produktionskulturen im 2-L-Maßstab angesetzt.

Die Isolierung des scFv-Fragments erfolgte mittels Affinitätschromatografie.

Die Reinheit wurde anschließend im SDS-Polyacrylamidgel analysiert. Das scFv-Fragment konnte mittels Ni-NTA-Affinitätschromatografie gereinigt werden. Dies zeigte die Analyse der Eluatfraktionen durch SDS-PAGE. Die eine Kette war als Bande bei ca. 25 kDa sichtbar und Aggregate höherer Molekularmasse waren ebenfalls erkennbar (Siehe Abbildung 13). Das Fab-Fragment wies einen Reinheitsgrad von über 90 % auf. Die relative Ausbeute an funktionellem Fab-Fragment gekoppelt mit His-Tag betrug ca. 25 µg/l Kulturvolumen.

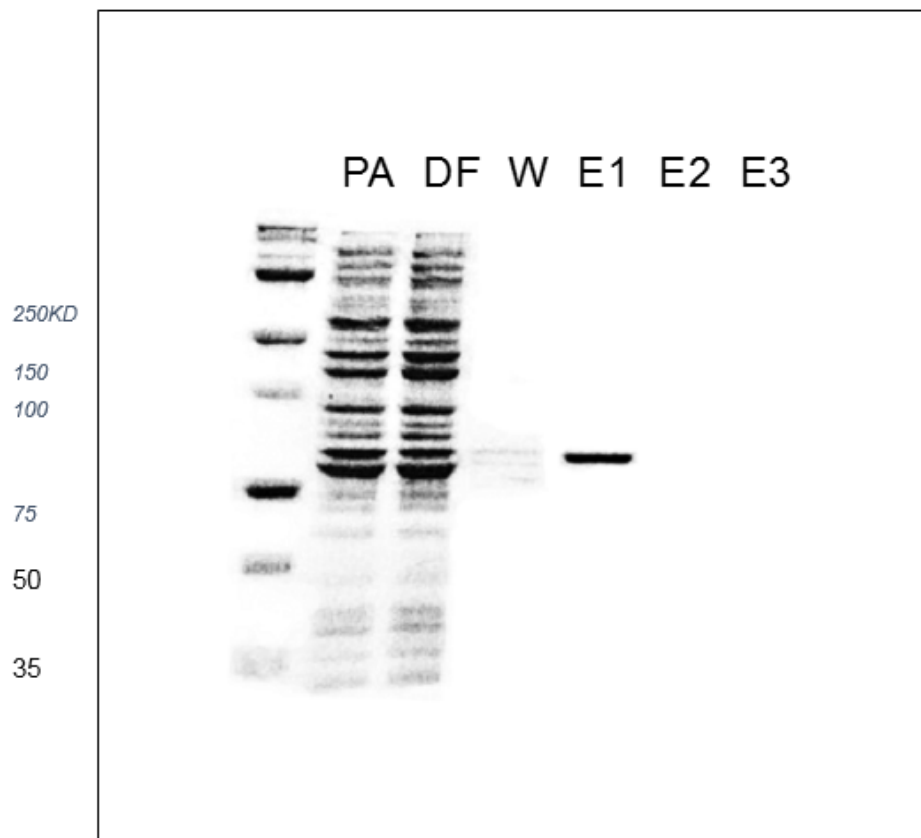


Abbildung 13: SDS-PAGE der Einschrittreinigung des scFv-Fragments mittels Metallchelataffinitätschromatografie: *E. coli* JM83/pAK400scFv6H8 wurde im 2-L-Maßstab bei 22 °C kultiviert, die periplasmatische Proteinfraction gewonnen und daraus das scFv-Fragment durch IMAC an Ni-NTA-Sepharose mit einem Imidazolgradienten von 0 bis 300 mM isoliert. Auf ein 12%iges SDS-Polyacrylamidgel wurde im reduzierten Zustand je eine Probe des Gesamtzellextrakts (Spur 1), des periplasmatischen Proteinextraktes (PA), des Durchlaufs der Säule (DF) sowie die Eluatfraktion des kompetitiv eluierten rekombinanten scFv-Fragments aufgetragen (E1-E3)

Der spezifische Nachweis der rekombinanten Proteine erfolgte durch Western-Transfer-Experimente, wobei ein Maus-anti-Pentahistidin-gekoppelter sowie ein sekundärer HRP-gekoppelter Antikörper verwendet wurden. Die elektrophoretische Mobilität des 6H8 scFv-Fragments stimmte hierbei mit dem Molekulargewicht überein.

4.3 Herstellung der Mutante E-Cadherin $\Delta 9$ für funktionelle Assays

Das scFv 6H8 kann stabil und reproduzierbar hergestellt werden und eignet sich primär für die Konstruktion eines spezifischen Triplebody. Die Bindungsaffinität konnte zunächst nicht

determiniert werden, da die krebsspezifische Variante E-Cadherin $\Delta 9$ weder als lösliches Protein vorlag, noch Magenkarzinomzelllinien bekannt sind, die speziell die Variante $\Delta 9$ exprimierten.

4.3.1 Herstellung pDESTeCadherin $\Delta 9$ aus pENTReCadherin

Im Rahmen dieser Doktorarbeit musste ein Testsystem etabliert werden und die Mutante E-Cadherin $\Delta 9$ für funktionelle Assays rekombinant hergestellt werden. Nachdem einfache PCR-Mutagenese-Versuche aus Colon-CA rDNA fehlgeschlagen waren, wurde für die Mutagenese die Gateway Cloning Technology (GIBCO) gewählt. Dazu wurde das fragliche Gen E-Cadherin $\Delta 9$ per PCR amplifiziert und schließlich in den Vektor pcDNADEST47 kloniert. Das vollständige E-Cadherin lag im Vektor pENTReCadherin vor. Von diesem Vektor ausgehend wurde das Exon 9 nun per PCR deletiert (siehe Abbildung 14 A,14B).

A:

EXON8

ÁGTTTCCCTACGTATACCCTGGTGGTTCAAGCTGCTGACCTTCAAGGTGAGGGGTTA
AGCACAA

PRIMERFOR

CAGCAACAGCTGTGATCACAGTCACTGACACCAACGATAATCCTCCGATCTTCAATC
CCACCACCTACAAGGGTCAGGTGCCTGAGAACGAGGCTAACGTCGTAATCACCACA
CTGAAAGTGACTGATGCTGATGCCCCAATACCCAGCGTGGGAGGCTGTATACAC
CATATTGAATGATGATGGTGGACAATTTGTCGTCACCACAAATCCAGTGAACAACGAT
GGCATTTTGA AACAGCAAAGGGCTTGGATTTTGAGGCCAAGCAGCAGTACATTCTA
CACGTAGCAGTGACGAATGTGGTACCTTTTGAGGTC

PRIMERREV

TCTCTACCACCTCCACAGCCACCGTCACCGTGGATG

EXON10

ROT: EXON9

B:

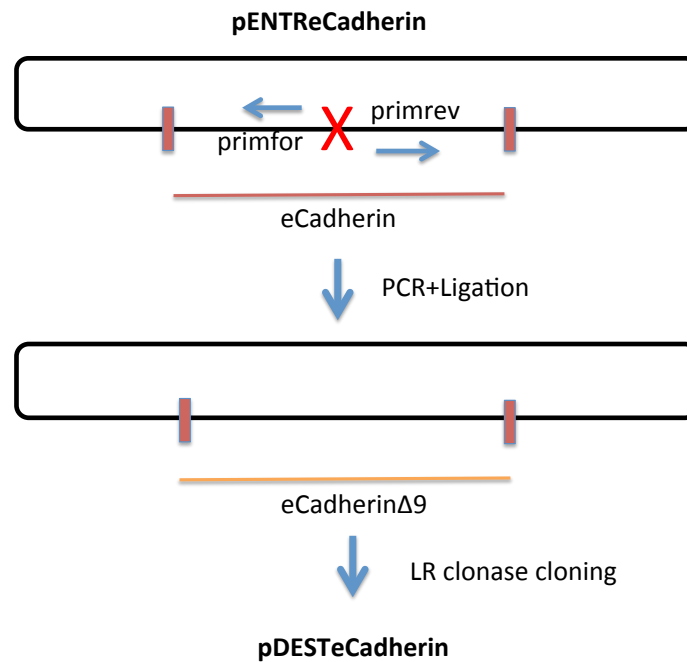


Abbildung 14: A: E-Cadherin-Sequenz aus pENTReCadherin. Das Exon 9 (rot) wurde durch PCR-Amplifikation deletiert. B: Schematische Darstellung der Herstellung der E-Cadherin-Mutante E-Cadherin Δ 9: nach PCR-Amplifikation eines PCR-Fragments ohne Exon 9 wurde der Vektor pEntreCadherin Δ 9 durch Ligierung hergestellt und die Vektoren pDESTeCadherin Δ 9 und pDESTeCadherin durch LR Clonase Cloning hergestellt

Anschließend erfolgte die Rekombination in pDEST47. Die finalen Plasmide waren pDEST47eCadherin Δ 9 und pDEST47eCAD. P(cDNA)Dest47 kann in eukaryotischen Zellen transformiert und somit E-Cadherin Δ 9 überexprimiert werden (siehe Abbildung 15).

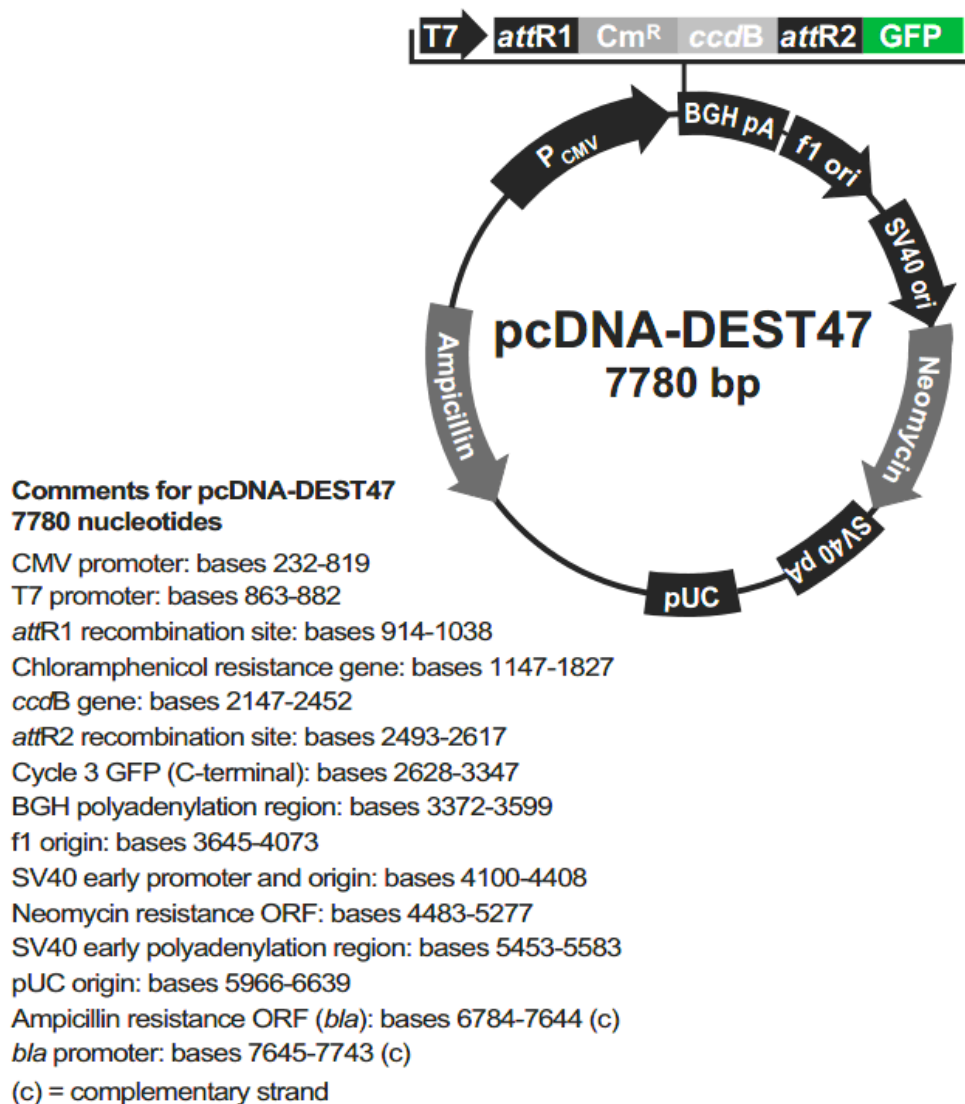


Abbildung 15: Schematische Darstellung des Expressionsvektors. Das Strukturgen (in diesem Fall E-Cadherin) liegt zur Sekretion ins Zytoplasma von Säugerzellen fusioniert mit GFP (Green fluorescent Protein) vor. Die Transkription des resultierenden Fusionsgens steht unter der Kontrolle des CMV-Promotors/Operators. Die Kürzel ori und f1 bezeichnen den Replikationsursprung der pUC-Plasmidfamilie sowie die intergenische Region des filamentösen Phagen f1 (Invitrogen™) (siehe Kapitel 3.2.1.4)

4.4 Bindungsnachweis des scFv 6H8 an E-Cadherin Δ 9

Die spezifische Bindungsstabilität des monoklonalen Ratten-Antikörper d9mAb an die Mutante E-Cadherin Δ 9 wurde in der Studie von Senekowitsch-Schmidtke et al. 2001 mittels Western Blotting sowie Immunhistochemie nachgewiesen und erfolgreich zur Radioimmuntherapie verwendet. In dieser Arbeit sollte nachgewiesen werden, dass auch das rekombinante scFv 6H8 seine Bindungsaffinität zu der magenkarzinomspezifischen Mutante des E-Cadherin behält. Das konnte unter denaturierten Bedingungen im Western Blot im Folgenden gezeigt werden (siehe Abbildung 16).

4.4.1 Western Blot

Die spezifische Bindung des in der vorliegenden Arbeit verwendeten Antikörper-Fragmentes scFv 6H8 an die magenkarzinomspezifische Mutante E-Cadherin Δ 9 konnte mittels Western Blotting nachgewiesen werden.

Entsprechend der in 4.3 beschriebenen Vorgehensweise wurde ein Komplex aus drei Antikörperbindungen hergestellt. Dabei konnte durch die ECL- Methode (*enhanced chemiluminescence*) unter Umsetzung von HRP (Meerrettichperoxidase, engl. *horseradish*), welches an den Anti-His-Antikörper gebunden war, der Komplex anhand der Größe von ca. 25 kD identifiziert werden.

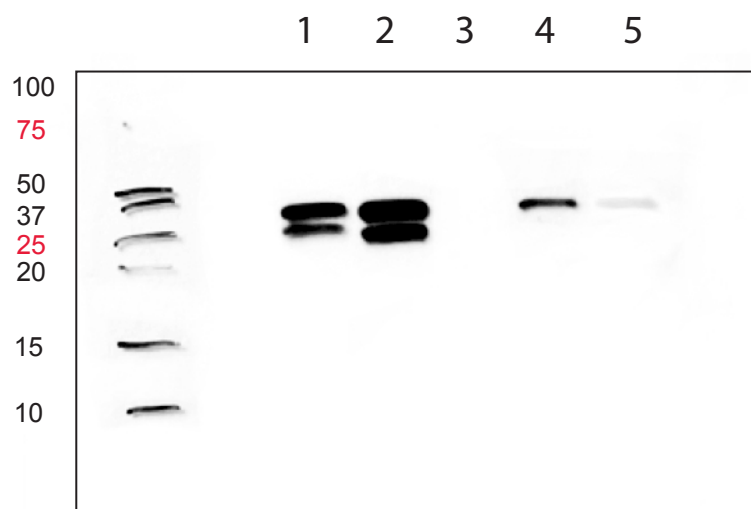


Abbildung 16: Nachweis von E-Cadherin Δ 9 durch den Antikörper 6H8 und dessen rekombinantes scFv-Fragment mittels Western Blotting. Auf einem 12%igen SDS-Gel wurden die Mutante Δ 9 erste Probe (Spur 1), E-Cadherin erste Probe (Spur 2), Kontroll-EGF (Spur 3), Δ 9 zweite Probe (Spur 4) und E-Cadherin zweite Probe (Spur 5) aufgetragen und nach Auftrennung auf eine Nitrozellulosemembran transferiert. Die Membran wurde zunächst mit dem monoklonalen Antikörper 6H8 über Nacht, dann mit Anti-His-Antikörper für eine Stunde inkubiert und mittels ECL-Reagenz entwickelt. Für die Chemilumineszenz wurde ein Hyperfilm MP 10 s auf die Membran gelegt und entwickelt

4.5 Konstruktion des Expressionsvektors für die bakterielle Produktion eines EpCAM-spezifischen scFv-Fragmentes

Für die Synthese eines EpCAM-spezifischen scFv-Fragments (scFv EpCAM) als Fusionsprotein mit dem Hexahistidinhängsel (His-Tag) wurde der Expressionsvektor PAK400scEpCAM konstruiert. Hierfür wurde die DNA aus dem Vektor pMA mit Restriktionsenzymen (SfiI) ausgeschnitten und in den Vektor pAK400 inseriert (Skerra 1994). Für die Sequenz des EpCAM-spezifischen scFv-Fragments (siehe Abbildung 18), wurden die variablen Domänen eines publizierten Anti-EpCAM-Antikörpers verwendet, die frei verfügbar waren (Patent-Nr. WO2010142990A1). Die korrekte Zusammensetzung des Plasmids pAK40scFvEpCAM wurde mittels Sequenzanalyse bestätigt (siehe Abbildung 17).

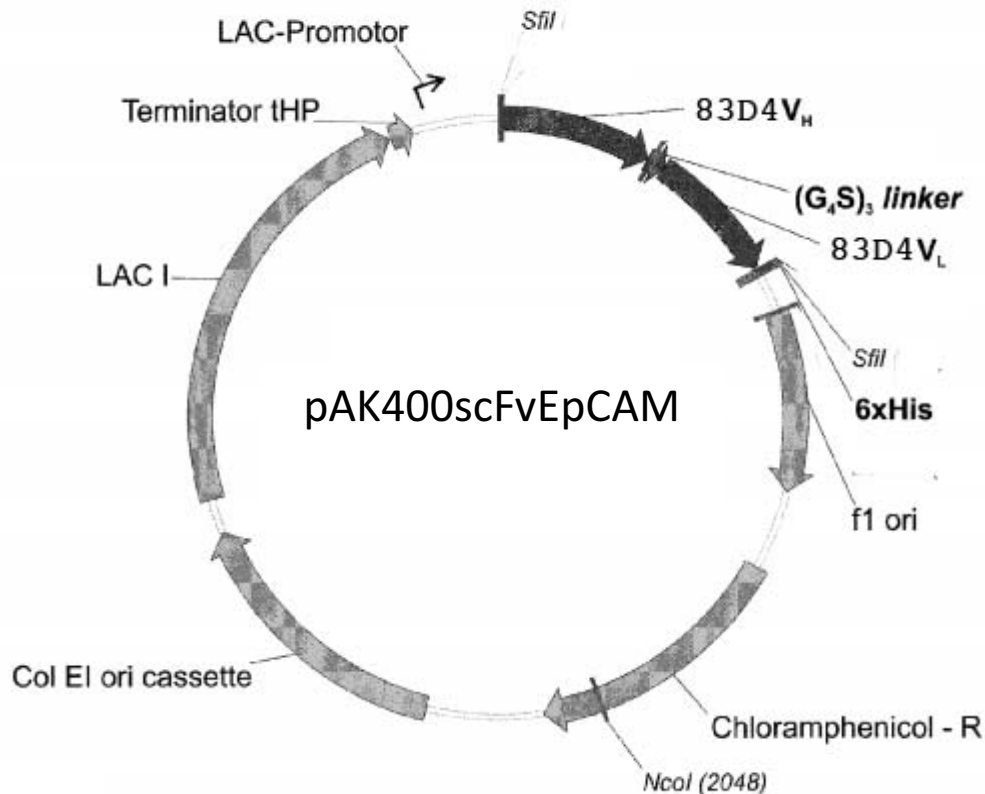


Abbildung 17: Schematische Darstellung des Expressionsplasmids pAK400scFvEpCAM: pAK400 kodiert für das EpCAM Fv-Fragment, bestehend aus den variablen Domänen des Ratten-Antikörpers EpCAM. Die Strukturgene V_L und V_H liegen zur Sekretion in den periplasmatischen Raum von *E. coli* an ihren 5'-Enden fusioniert mit den bakteriellen Signalsequenzen der Pektat-Lyase vor. Am 3'-Ende des Gens der schweren Kette befindet sich die kodierende Sequenz für ein Hexahistidin-Affinitätsanhängsel (6xHis). Die Transkription des resultierenden Fusionsgens steht unter der Kontrolle des lac-Promotors/Operators. Die Kürzel ori und f1 bezeichnen den Replikationsursprung der pUC-Plasmidfamilie sowie die intergenische Region des filamentösen Phagen f1

```
MADIQLTQSPKFMSTSVGDRVSVTCKASQNVGTNVAWYQQKPGQSPKALYASSYRYS
GVPDRFTGSGSGTDFTLTISNVQSEDLAEYFCQQYNSYPTLFGAGTKLEIKGGGGSGG
GGSGGGGSGGGGSDIKLQESGPGLVQPSQSL SITCVSGFSLTSYGVHWVRQSPGKGL
EWILGVIWGGSTDYNAAFISRLSISKDNSKSQVFFKMNSLQANDTAIYYCARMENWSF
AYWGQGTTVTVSS
```

Abbildung 18: Aminosäuresequenz der variablen Domänen des scFv EpCAM

4.5.1 Aufreinigung und Detektion mittels SDS-PAGE

Der Expressionsvektor pAK400scFvEpCAM wurde, wie zuvor bei dem E-Cadherin-spezifischen scFv, mittels Transfektion in den *E. coli*-Stamm JM83 eingebracht und Produktionskulturen im 2-L-Maßstab angesetzt. Drei verschiedene Klone wurden hierbei getestet (scFvEpCAM1.1; scFvEpCAM2.4 und scFvEpCAM3.1).

Die Genexpression des scFv-Fragments wurde durch Zugabe von 1 mg IPTG (Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid) pro Liter Kulturmedium bei einer Zelldichte von OD550 = 0,5 nm induziert.

Die Dauer der Induktion betrug 3 h. Alle Kulturen befanden sich zu diesem Zeitpunkt im Übergang zur stationären Wachstumsphase, wobei noch keine Zellyse zu beobachten war. Die Zellen wurden geerntet und die periplasmatische Proteinfraction präpariert. Die Isolierung des scFv-Fragments erfolgte mittels Affinitätschromatografie.

Die Reinheit wurde anschließend im SDS-Polyacrylamid-Gel analysiert. Das scFv-Fragment konnte mittels Ni-NTA-Affinitätschromatografie gereinigt werden. Dies zeigte die Analyse der Eluatfraktionen durch SDS-PAGE (siehe Abbildung 20). Die eine Kette war als Bande bei ca. 30 kDa sichtbar. Ein Abbauprodukt zeigte sich unterhalb, dennoch wies das Fab-Fragment einen Reinheitsgrad von über 90 % auf. Die relative Ausbeute an funktionellem Fab-Fragment gekoppelt mit His-Tag betrug ca. 50 μ g.

Epcam 3,1

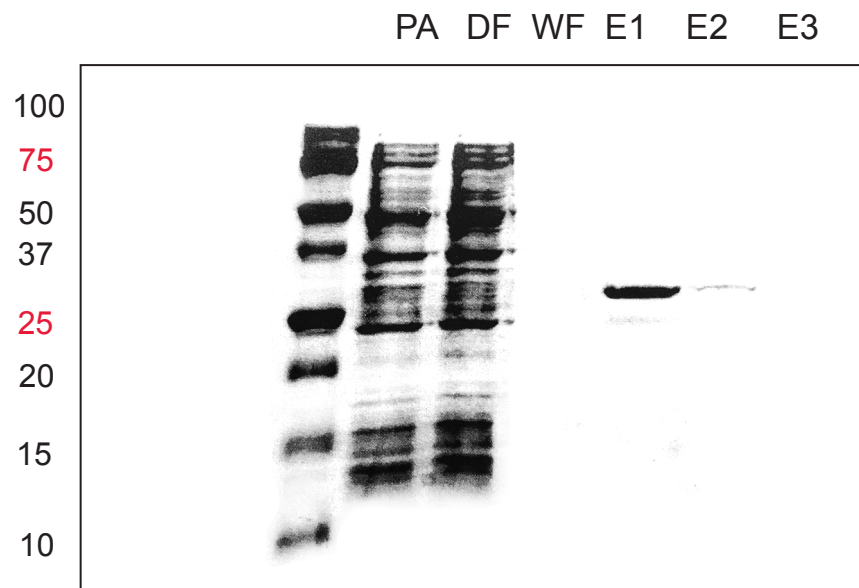


Abbildung 19: SDS-PAGE der Einschrittreinigung des scFv-Fragments mittels Metallchelataffinitätschromatografie: *E. coli* JM83/pAK400scFvEpCAM 3.1 wurde im 2-L-Maßstab bei 22 °C kultiviert, die periplasmatische Proteinfraction gewonnen und daraus das scFv-Fragment durch IMAC an Ni-NTA-Sepharose mit einem Imidazolgradienten von 0 bis 300 mM isoliert. Auf ein 12%iges SDS-Polyacrylamidgel wurde das periplasmatische Proteinextrakte (PA), der Durchlauf der Säule (DF), die Waschfraktion (WF) sowie die Eluatfraktion des kompetitiv eluierten rekombinanten scFv-Fragments aufgetragen (E1-E3)

Der spezifische Nachweis der rekombinanten Proteine erfolgte durch Western-Transfer-Experimente (siehe Abbildung 21), wobei ein Maus-anti-Pentahistidin-gekoppelter sowie ein sekundärer HRP-gekoppelter Antikörper verwendet wurden. Die elektrophoretische Mobilität des EpCAM-scFv-Fragments stimmte hierbei mit dem Molekulargewicht überein.

Zudem wurde die Stabilität des scFv-Fragments bei 4 °C und 20 °C (Fragmente wurden über Nacht gelagert) getestet.

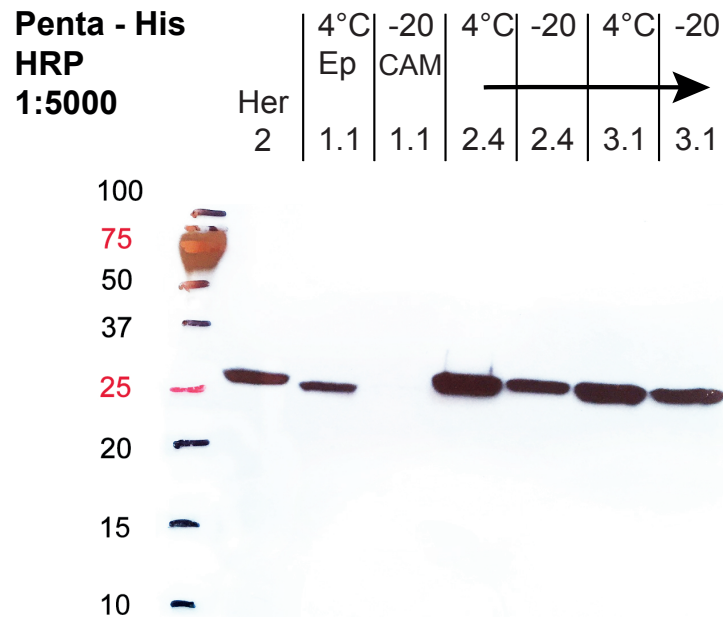


Abbildung 20: Nachweis des EpCAM-scFvs durch Penta-His-HRP mittels Western Blotting und Prüfung der Stabilität. Auf einem 12%igem SDS-Gel wurden die HER2 scFvs (Positivkontrolle) und jeweils das Eluat der drei verschiedenen scFv-EpCAM-Klone 1.1, 2.4 und 3.1 aufgetragen. Die Eluate waren jeweils bei 4 °C oder bei 20 °C über Nacht gelagert worden

Das scFv EpCAM konnte in ausreichenden Mengen (0,5 mg/L) produziert werden. Nach einer Produktion im 2-Liter-Kolben lag ca. 1 mg scFv für weitere Bindungstests und Stabilitätstestungen vor. Stabilitätstests, in denen das scFv jeweils bei 4 °C und –20 °C gelagert wurde, zeigten, dass die Stabilität bei 20 °C doch eindeutig geringer war, als bei 4 °C (s. Abbildung 20). Somit wurde das scFv für weitere Tests immer nur im Kühlschrank aufbewahrt.

Die Bindung des scFv EpCAM an EpCAM wurde abschließend zur Kontrolle noch mittels Immunhistochemie nachgewiesen (siehe Abbildung 21).

Epcam 3.1 scFv und anti-His 3D5

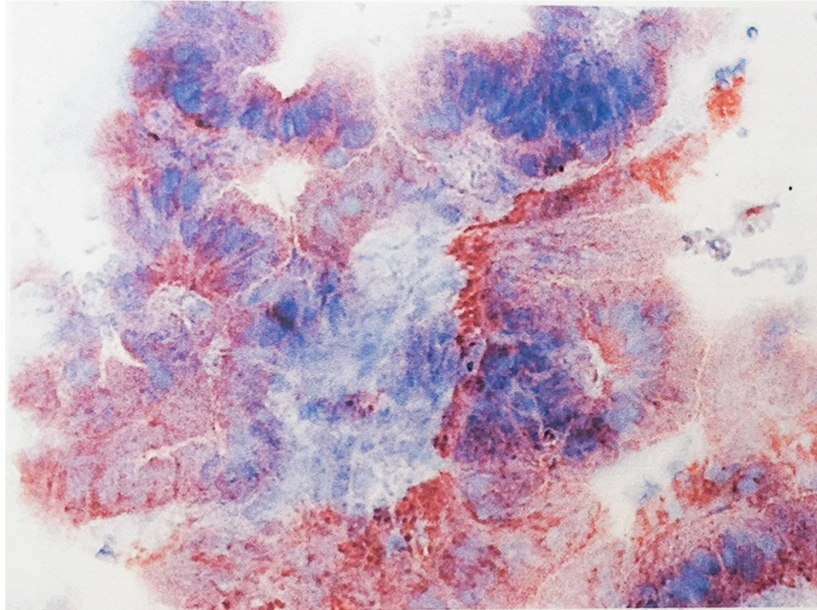


Abbildung 21: Immunhistochemie des scFvEpcam auf Ösophaguskarzinom-Zelllinie (OE19), 10-fache Vergrößerung. Die Zellen wurden mit scFv Epcam inkubiert und die Bindung mittels HRP-konjugierten anti-His-Antikörper 3D5 und AEC Substrat nachgewiesen

5 DISKUSSION

In der Entwicklung neuartiger Krebstherapien ist es seit Langem ein Ziel, eine Tumorbekämpfung über eine Aktivierung des Immunsystems zu erreichen.

Ziel dieser Studie war es, die magenkarzinomspezifische Mutante des E-Cadherin Δ 9 als Ansatz für neuartige Antikörpertherapeutika zu generieren und die Bedeutung bzw. Anwendbarkeit anhand der Bindungsqualität zum Antikörperfragment scFv 6H8 zu überprüfen. Diese konnte erfolgreich nachgewiesen werden.

Das bedeutendste Ergebnis ist hierbei der Nachweis der Stabilität, der in dieser Arbeit produzierten Antikörperfragmente, sowie der spezifische Bindungsnachweis des Antigen-Antikörperkonstruktes, welches nun in einem Triplebodyformat gezielt zur Krebsbekämpfung eingesetzt werden könnte.

5.1 Bewertung der Relevanz bispezifischer Antikörperfragmente

Ein Durchbruch in der Krebsforschung war die Entwicklung therapeutischer Antikörper, welche Krebszellen durch verschiedene Mechanismen bekämpfen können. Diese Antikörper greifen an unterschiedlichen Stellen in die Abläufe der Immunabwehr und können bestimmte regulatorische Effekte erzielen (Scott, Wolchok et al. 2012).

Die Bindung eines Antikörpers auf der Zelloberfläche kann z. B. Signale zur Initialisierung des Zelltodes auslösen (Todessignale). Ein anderer Effekt ist die antikörpervermittelte zelluläre Toxizität, wobei Bindungsstellen im Fußteil eines Antikörpers die Rezeptoren auf Immunzellen stimulieren (ADCC). Die komplementabhängige Zytotoxizität basiert auf der Perforation der Zellmembran einer Tumorzelle. Diese wird durch die Verankerung des Komplementproteins (C1q) an einer Tumorzelle durch einen IgG- oder IgM-Antikörper und die anschließend ausgelöste Kettenreaktion hervorgerufen (CDC).

Ein weiterer Ansatz ist die Blockierung der proliferativen oder angiogenetischen Wachstumsfaktoren oder deren Rezeptoren (Rajabi and Mousa 2017).

Es ist auch möglich, eine Stimulation des Immunsystems zu erreichen, indem aktivitätshemmende Proteine auf Immunzellen blockiert werden, wie zum Beispiel bei den neuerdings für viele Indikationen zugelassenen Checkpointinhibitoren (Little 2014, Chen and Mellman 2017).

Mit der Zulassung unterschiedlicher monoklonaler Antikörper, wie Trastuzumab (Handelsname Herceptin®, Roche) oder auch Rituximab (MabThera, Roche) konnte ein außergewöhnlicher Erfolg in der Behandlung verschiedenster maligner Erkrankungen erzielt werden. Trastuzumab ist ein humanisierter monoklonaler Antikörper, der gegen die extrazelluläre Domäne des häufig bei Mammakarzinomen exprimierten

Wachstumsfaktorrezeptors HER2/neu gerichtet ist. Dieses Medikament basiert lediglich auf der Wirkung der Tumorzellproliferationshemmung, nicht jedoch auf der Aktivierung der körpereigenen Immunabwehr. Um die Wirkung einer Anti-HER2-Therapie zu verstärken, wurde die ursprüngliche Monotherapie des Herceptin, in früheren Behandlungslinien vom metastasierten Magenkarzinom und Brustkrebs, durch Kombinationstherapien mit cytotoxischen Agentien (z. B. Docetaxel, Capecitabin, Paclitaxel) oder anderen Anti-HER2-mAbs (z. B. Pertuzumab), und/oder Tyrosinkinase-Inhibitoren (z. B. Lapatinib) ersetzt (Singh, Jhaveri et al. 2014). Alternativ kann ein Antikörper Drug Conjugate (ADC) wie beispielsweise Trastuzumab/Emtansin (T-DM1), ein Anti-HER2-mAb, der an die cytotoxische Substanz Emtansin (DM1) gekoppelt ist, eingesetzt werden (Lewis Phillips, Li et al. 2008, Sadeghi, Olevsky et al. 2014).

Wie oben schon erwähnt gibt es aber zahlreiche therapeutische Antikörper in der Onkologie, die spezifisch die Erhöhung der zellulären Toxizität als Wirkmechanismus haben. Das bekannteste Beispiel ist hierfür Rituximab (zb. Mabtera, Rituximab) (Boross and Leusen 2012). Die Wirkung dieser Antikörper beruht auf ADCC sowie auf CDC.

Es gibt allerdings bereits Ansätze mit bispezifischen Antikörperkonstrukten, welche darauf abzielen, die eigene Immunabwehr zur Zerstörung der Krebszellen stärker anzuregen, indem sie spezifisch zytotoxische T-Zellen rekrutieren. (Oberg, Kellner et al. 2018).

Beispiele für zugelassene bispezifische Antikörperkonstrukte sind Blinatumomab, (Blinicyto®, Amgen) welches zur Therapie der akuten lymphatischen Leukämie eingesetzt wird, oder auch Catumaxomab (Removab®, Fresenius Biotech) welches zur Behandlung des malignen Aszites zugelassen war (EMA 17.07.2017).

Solche Konstrukte haben gezeigt, dass eine erfolgreiche Redirektion von T-Zellen an eine Tumorzellstruktur mittels bispezifischer Antikörperfragmente möglich ist. Diese gezielte Redirection wurde bisher nur durch die Konstruktion von bispezifischen Antikörperkonstrukten ermöglicht.

Blinatumomab konnte das Überleben der Patienten, die zusätzlich zur Chemotherapie mit Antikörperpräparaten behandelt wurden, gegenüber Patienten, die lediglich eine reine Gabe einer Chemotherapie erhielten, deutlich verlängern (Kantarjian, Stein et al. 2017).

Ein enormer Nachteil ist jedoch die kurze Halbwertszeit der bispezifischen Antikörperkonstrukte, aufgrund ihres geringen Molekulargewichtes. Die Verabreichung ist für die Patienten nur als Dauerinfusion möglich und stellt damit eine Einschränkung der Lebensqualität dar (EMA 17.07.2017).

Ein erhebliches Risiko besteht zudem in der beobachteten Ausbildung von lebensbedrohlichen Nebenwirkungen. Die starke T-Zell-Aktivierung dieser Konstrukte birgt

die Gefahr der Ausbildung eines *Cytokin-Release-Syndroms* (CRS), einem sogenannten Zytokin-Sturm. Dieser basiert auf der Erhöhung des Zytokinspiegels, der mit dem Zerfall der Tumorzellen korreliert. Die Bandbreite der Nebenwirkungen reichte hierbei von leichter bis hin zur lebensbedrohlichen Symptomatik mit Todesfolge (Frey 2017).

Die Konstruktion eines Triplebodys mit erheblich höherer Molekularmasse konnte das Problem der kurzen Halbwertszeit lösen. Das Molekulargewicht eines Triplebody beträgt in etwa so viel wie jenes eines normalen IgG-Antikörpers. Auch in der Anzahl der Ig-Domänen ähneln sie sich, weshalb man von ähnlich langen Halbwertszeiten ausgehen kann, die im Schnitt bei Antikörpern 14 Tage betragen. Eine subkutane oder intravenöse Gabe des Triplebody als Therapeutikum in einem Abstand von 2 bis 4 Wochen ist somit denkbar, was für die Patienten enorme Vorteile gegenüber den üblichen bispezifischen Antikörperkonstrukten hätte.

Zudem werden mit den in dieser Arbeit vorgestellten Triplebody-Konstrukten, NK-Zellen und nicht zytotoxische T-Zellen rekrutiert, was die Inzidenz des *Cytokin-Release-Syndroms* verringern könnte. Dies müsste allerdings noch in klinischen Studien belegt werden. Da allerdings die Funktion solcher CD16-bindenden Antikörperkonstrukte bislang nur in präklinischen Versuchen gezeigt wurde (Gruel, Fridman et al. 2001, Shahied, Tang et al. 2004, Asano, Nakayama et al. 2012) steht dieser Beweis noch aus.

5.2 EpCAM sowie E-Cadherin Δ 9 als tumorassoziierte Antigene

Im Rahmen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass das E-Cadherin- Δ 9-bindende scFv-Fragment löslich in ausreichenden Mengen in *E. coli* hergestellt werden kann. Es ist in der Lage, die magenkarzinomspezifische Mutante, das Zielantigen, spezifisch zu binden. Für die Bindungsanalyse musste die Mutante in Säugerzellen überexprimiert werden und ergab eine ausreichende Affinität gegenüber dem Zielantigen. Dies konnte im Western Blot nachgewiesen werden (siehe Abbildung 16). Genauere Bindungsanalysen wurden im Rahmen dieser Arbeit nicht getätigt, da es sich um Vorversuche vor der Triplebodykonstruktion handelt. Die genaue Affinität zum Zielantigen müsste noch mittels Biacore und/oder ELISA getestet werden. Das ist allerdings erst nach Einbau in einen Triplebody sinnvoll, da das scFv an sich sehr instabil ist und sich die Bindungseigenschaften durch den Einbau in einen Triplebody durchaus noch verändern können.

Die Suche nach optimalen Targets auf Tumorzellen ist die größte Herausforderung in der zielgerichteten Immuntherapie. Im Rahmen dieser Arbeit konnte ein funktionales Fv-Fragment für ein höchst spezifisches Target auf Magenkarzinomzellen charakterisiert werden. Das zweite Target war allerdings noch offen. Ausschließlich auf dem Tumor

exprimierte Antigene sicher zu identifizieren ist selten möglich und schwierig. Es wird heute eher von tumorassoziierten Antigenen (TAA) gesprochen, die auf dem Tumor verstärkt exprimiert werden, jedoch auf gesunden Zellen ebenfalls vorhanden sind. Neben dem Hauptkriterium Spezifität, sollten TAA idealerweise auf Tumoren weit verbreitet und für Antikörper zugänglich sein (Greenall, Gherardi et al. 2012). All diese Eigenschaften haben später Einfluss auf Wirkung und Sicherheit der Antikörpertherapie.

Das bekannte und häufig vorkommendes TAA EpCAM, ist das erste Protein, welches mit monoklonalen Antikörpern identifiziert wurde (Koprowski, Steplewski et al. 1979). Hierbei handelt es sich um ein transmembranäres Glykoprotein, welches physiologisch auf der basolateralen Zelloberfläche der meisten Epithelien exprimiert wird (Balzar, Prins et al. 1999). Seine Hauptfunktion ist die interzelluläre Zelladhäsion (Patriarca, Macchi et al. 2012). EpCAM wird auf nahezu allen Karzinomen exprimiert, besonders Adenokarzinomen des Kolons, des Magens, der Lunge und des Pankreas zeigen eine ausgeprägte homogene EpCAM-Expression (Balzar, Prins et al. 1999, Went, Lugli et al. 2004).

Auch im menschlichen Organismus ist bekannt, dass EpCAM auf epitheliale, stark proliferierendem Gewebe physiologisch anzutreffen ist – ganz besonders in der Mucosa des Gastrointestinaltraktes (Litvinov, Velders et al. 1994). Das beschriebene Expressionsmuster lässt starke Toxizitäten aufgrund fehlender Tumorspezifität beim therapeutischen Einsatz von EpCAM-Antikörpern vermuten. Auch im Menschen konnten schwere unerwünschte Wirkungen durch EpCAM-Antikörper beobachtet werden (de Bono, Tolcher et al. 2004). Unter der Therapie mit zwei humanisierten IgG1-EpCAM-Antikörpern ING-1 und 3622W94 kam es zu schweren lebensbedrohlichen akuten Pankreatitiden (Goel, Bauer et al. 2007). Eine Expression von EpCAM auf normalem epitheliale Pankreasgewebe ist bekannt (Yonaiyama, Toyoki et al. 2013). Daher wird angenommen, dass eine unspezifische Bindung und Aktivierung des Immunsystems im Pankreas zu einer Autodigestion des Gewebes führte. Auch der EpCAM-biAK Catumaxomab zeigte in klinischen Studien starke Toxizität auf. Eine intravenöse und somit systemische Gabe des Antikörpers führte bei den Patienten unter anderem zu einem deutlichen Anstieg der Leberenzyme. Auch hier wird neben der oben schon erwähnten massiven Ausschüttung von Zytokinen durch die Immunaktivierung (Zytokinsturm), die unspezifische Bindung an EpCAM und damit Immunaktivierung auf epitheliale Zellen der Gallengänge, oder beides diskutiert (Sebastian, Passlick et al. 2007). Somit war EpCAM als TAA zwar vielversprechend, eignete sich aber aufgrund der extremen Nebenwirkungen zur Anwendung rein EpCAM-spezifischer Antikörper nicht. Eine Schädigung oder den Funktionsverlust von Gewebe wurde nicht verhindert, was zu vielen schwerwiegenden Nebenwirkungen führte und nur eines dieser Medikamente zur Anwendung zugelassen wurde (Balzar, Winter et al. 1999). Das oben schon erwähnte Catumaxomab wurde bei

Aszites nicht intravenös, sondern intraperitoneal verabreicht, weshalb viele unspezifische Nebenwirkungen verhindert werden konnten.

Die Kopplung des scFv EpCAM mit dem hochspezifischen anti-E-Cadherin- $\Delta 9$ -scFv im Triplebody scheint ideal, um diese Toxizitäten, sogenannte *Off-target*-Effekte, zu verhindern.

Solche Triplebodykonstrukte wurden ebenfalls in anderen Versuchen konstruiert und deren Stabilität erfolgreich nachgewiesen. Zum Beispiel wurde bereits ein Triplebody erfolgreich hergestellt, welcher EpCAM sowie das spezifische im Bauchspeicheldrüsenkarzinom exprimierte Tn-Antigen bindet. Dieser wirkt mittels Aktivierung des Immunsystems, genauer der körpereigenen NK-Zellen und erzeugt somit eine Krebszellyse (Schulz-Lüdeke 2017).

Ein bindungsaktives EpCAM-spezifisches scFv wurde im Rahmen dieser Arbeit aus Sequenzen des Patents WO2010142990A1 erfolgreich kloniert und exprimiert. Ebenso wie ein hochselektives magenkarzinomspezifisches scFv gegen E-Cadherin $\Delta 9$. Die Konstruktion von diesen zwei stabilen und bindungsfähigen scFvs kann hier als Erfolg gewertet werden. Der Einbau in einen Triplebody muss nun als nächster Schritt erfolgen.

5.3 Bewertung des Triplebody und seiner therapierelevanten Einsatzmöglichkeiten

Rekombinante trispezifische Antikörper zur immuntherapeutischen Anwendung im Magenkarzinom sind in dieser Form neuartig und in der Literatur bisher nicht zu finden. Hier wird somit ein neu entwickelter Antikörper beschrieben, der hinsichtlich seiner In-vitro-Eigenschaften charakterisiert worden ist. Wie in der Einleitung bereits erwähnt, bieten Triplebodys Vorteile im therapeutischen Ansatz und Wirkungsmechanismus. Durch das „*duale Targeting*“ der Triplebodys kann eine bevorzugte Bindung an die doppelt positiven, d. h. gezielt an die Krebszellen, im Vergleich zu den einfach positiven Zellen, erreicht werden. Für den Einsatz als Therapeutikum muss das spezifische scFv-Fragment nun als Triplebody hergestellt werden. Es gäbe auch andere Möglichkeiten, zielgerichtete Anti-Tumoraktivität zu erzeugen, allerdings scheint bei näherer Analyse die Konstruktion eines Triplebody am aussichtsreichsten zu sein. Eine Kopplung des scFv mit cytotoxischen Substanzen würde ebenfalls ein zielgerichtetes „*Killing*“ der Tumorzellen ermöglichen, allerdings wären die Stabilität und die Halbwertszeit dieser Konstrukte zu niedrig, um eine effektive Wirksamkeit sicherstellen zu können. Ein bispezifisches Konstrukt analog zu Blinatumomab wäre ebenfalls denkbar, jedoch haben diese Konstrukte – wie in Kapitel 5.1 bereits erwähnt – nur eine Halbwertszeit von Stunden.

Die Halbwertszeit der Triplebodys ist ungefähr doppelt so lang wie das der bsscFvs, wodurch sie in die Nähe der therapeutisch häufig eingesetzten Antikörper gelangen. Diese

beträgt normalerweise um die 14 Tage, was die Anwendung monoklonaler Antikörper für die Patienten wesentlich angenehmer macht (in der Regel i. V. Gabe alle 2–4 Wochen).

Ein Therapieansatz mit rekombinanten trispezifischen Antikörpern wurde bislang nicht zugelassen. Die tumorspezifischen Komponenten konnten hier anhand ihrer Stabilität und Bindungseigenschaften charakterisiert werden. Der Einbau in ein Triplebodyformat könnte nun zügig erfolgen und der Triplebody in Tumormodellen getestet werden.

6 ZUSAMMENFASSUNG

Patienten im voranschreitenden Stadium einer Magenkreberkrankung haben oftmals keine Therapiemöglichkeiten zur Bekämpfung des Tumors, werden meist lediglich hinsichtlich der Linderung ihrer Symptome behandelt.

Die Anwendung bispezifischer Antikörper wäre bei Patienten mit einem diagnostizierten Magenkarzinom ein erfolgversprechender Therapieansatz.

Bispezifische Antikörper sind in der Lage, immunkompetente und gleichzeitig maligne Zellen zu binden und gegen die gebundenen malignen Zellen zu aktivieren. Gegenwärtig konnte ein trifunktionaler monoklonaler Ratte-Maus-Hybridantikörper (Removab®, Catumaxomab) in der EU zugelassen werden. Weitere Produkte befinden sich in der klinischen Prüfung.

In der vorliegenden Arbeit wurde die Bindungsaktivität von Antikörperfragmenten gegen eine magenkarzinomspezifische Mutante des E-Cadherin, das E-Cadherin Δ 9 und gegen EpCAM evaluiert.

Das E-Cadherin- Δ 9-spezifische scFv 6H8 wurde durch die Firma Geneart® in Regensburg synthetisiert, anschließend in dem in dieser Arbeit konstruierten Expressionsvektor PAK400scFv6H8 eingebaut und durch periplasmatische Expression in *E. coli* produziert.

Eine wesentliche Charakterisierung des scFv 6H8 konnte mittels Western Blot gegen die per Gateway® Cloning Technology hergestellte Mutante des E-Cadherin Δ 9 nachgewiesen werden, welche eine zufriedenstellende Bindungsaktivität und Spezifität hervorbrachte bzw. aufwies.

Als zweites Target wurde zudem das in Tumorzellen generell stark exprimierte EpCAM ausgewählt. Ein EpCAM-spezifisches scFv wurde durch die Firma Geneart® in Regensburg synthetisiert, in dieser Arbeit in den Expressionsvektor PAK400scFvEpCAM eingebaut und durch periplasmatische Expression in *E. coli* produziert. Die Stabilität des EpCAM scFvs wurde getestet und die Bindung an Krebszellen mittels Immunhistochemie erfolgreich nachgewiesen. Mit den Ergebnissen dieser Arbeit wurde möglicherweise die Grundlage gelegt, nach einem Einbau der spezifischen Antikörperfragmente in einen Triplebody, einen neuen Therapieansatz für die Behandlung des Magenkarzinoms im fortgeschrittenen Stadium zu entwickeln.

7 SUMMARY

Generally, patients in the advancing stage of gastric cancer have no or limited curative therapy options, and are usually treated only to alleviate their symptoms.

The use of bispecific antibodies would be a promising therapeutic approach for patients diagnosed with gastric carcinoma.

Bispecific antibodies are able to redirect and activate immunocompetent cells to the malignant cells.

Currently, a trifunctional monoclonal rat-mouse hybrid antibody (Removab®, Catumaxomab) has been approved in the EU (however, approval has been withdrawn for economic reasons). Further products are in clinical trials.

The present dissertation evaluated the binding activity of antibody fragments against a gastric carcinoma-specific mutant of E-cadherin, E-Cadherin Δ 9 and against EpCAM.

The E-cadherin- Δ 9-specific scFv 6H8 was synthesized by Geneart® in Regensburg, subsequently incorporated into the expression vector PAK400scFv6H8 constructed in this dissertation and produced by periplasmic expression in *E. coli*.

An essential characterization of scFv 6H8 could be demonstrated by Western blot against the E-Cadherin Δ 9 mutant produced by Gateway® Cloning Technology, which produced or demonstrated satisfactory binding activity and specificity.

The second target was EpCAM, which is generally highly expressed in tumor cells. An EpCAM-specific scFv was synthesized by Geneart® in Regensburg, incorporated in this dissertation into the expression vector PAK400scFvEpCAM and produced by periplasmic expression in *E. coli*. The stability of the EpCAM scFvs was tested and the binding to cancer cells was successfully demonstrated by immunohistochemistry.

The results of this work may have laid the basis for developing a new therapeutic approach for the treatment of gastric carcinoma in the advanced stage after incorporation of the specific antibody fragments into a triplebody.

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

AK.....	Antikörper
Ampr.....	Ampicillin-Resistenz
Amp.....	Ampicillin
aP.....	Alkalische Phosphatase
attL.....	Attachment Site left
attR.....	Attachment Site right
BCA.....	Bicinchinonsäure
bp.....	Basenpaare
bsscFvs.....	bispezifischen scFv-Antikörper-Fragmenten
BSA.....	Rinderserumalbumin
C.....	Nukleobase Cytosin
C.a.....	Circa
°C.....	Grad Celsius
Cm.....	Chloramphenicol
CDC.....	Complement-dependent Cytotoxicity
Da.....	Dalton
DMEM.....	Dulbecco's modified Eagle Medium
DNA.....	Desoxyribonukleinsäure
DMSO.....	Dimethylsulfoxid
DNA.....	Desoxyribonukleinsäure
dNTP.....	Desoxynukleosidtriphosphat
dTTP.....	Desoxythymidintriphosphat
EDTA.....	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA.....	Enzyme-linked Immunosorbent Assay
EpCAM.....	epithelial cell adhesion molecule
EtOH.....	Ethanol
Fab.....	Fragment antigen binding
FACS.....	Fluorescence-activated Cell Sorting
Fc.....	Fragment crystallizable
Fv.....	Fragment variable
Gluc.....	Glucose
h.....	Stunde
HAMAM.....	humane Anti-Maus-Antikörper-Immunantwort
HCl.....	Salzsäure
H ₂ O*.....	Wasser 18 Megohm (DNase und RNase frei), steril
HRP.....	Horseradish Peroxidase
Ig.....	Immunglobulin

i. v.	intra Venös
IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid
K	Kanamycin
kb	Kilobase
kDa	Kilodalton
l	Liter
M	Molar
mAb	Monoclonal Antibody
μ g	Mikrogramm
μ l	Mikroliter
mg	Milligramm
ml	Milliliter
min	Minute
mM	Millimolar
mRNA	messenger-RNA
ng	Nanogramm
nM	Nanomolar
OD	Optische Dichte
OVA	Ovalbumin
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
pAK	polyklonale Antikörper
PBS	Phosphate-buffered Saline
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PDB	Protein Data Bank
pelB	Pektat-Lyase B
pmol	Picomol
PMS	Permethrinsäure
POD	Peroxidase
RE	Restriktionsenzyme
rAK	Rekombinante Antikörper
RT	Raumtemperatur
RU	Refractive Unit
RV	Restriktionsverdau
scAb	Single Chain Antibody
scFv	Single Chain Fragment
SDS	Natriumdodecylsulfat
T	Nukleobase Thymin
TAA	tumorassoziertes Antigen

TBS.....	<i>Tryptic soy broth</i>
TBS-T	<i>Tris-buffered saline with Tween20</i>
TEMED	Tetramethylethyldiamin
TMB	Tetramethylbenzidin
Tris.....	Trihydroxyaminomethan
UICC.....	Union Internationale Contre le Cancer
U	Unit
Δ	Symbol delta
%	Prozent

LITERATURVERZEICHNIS

1. Al-Amoudi, A., D. C. Diez, M. J. Betts and A. S. Frangakis (2007). "The molecular architecture of cadherins in native epidermal desmosomes." Nature **450**(7171): 832-837.
2. Albert Roessner, T. K., Hans Konrad Müller - Hermelink (2014). Kurzlehrbuch Pathologie, Urban & Fischer in Elsevir (Verlag).
3. Aricescu, A. R. and E. Y. Jones (2007). "Immunoglobulin superfamily cell adhesion molecules: zippers and signals." Curr Opin Cell Biol **19**(5): 543-550.
4. Arnaout, M. A., S. L. Goodman and J. P. Xiong (2007). "Structure and mechanics of integrin-based cell adhesion." Curr Opin Cell Biol **19**(5): 495-507.
5. Asano, R., M. Nakayama, H. Kawaguchi, T. Kubota, T. Nakanishi, M. Umetsu, H. Hayashi, Y. Katayose, M. Unno, T. Kudo and I. Kumagai (2012). "Construction and humanization of a functional bispecific EGFR x CD16 diabody using a refolding system." FEBS J **279**(2): 223-233.
6. Balakrishnan, M., R. George, A. Sharma and D. Y. Graham (2017). "Changing Trends in Stomach Cancer Throughout the World." Curr Gastroenterol Rep **19**(8): 36.
7. Balzar, M., F. A. Prins, H. A. Bakker, G. J. Fleuren, S. O. Warnaar and S. V. Litvinov (1999). "The structural analysis of adhesions mediated by Ep-CAM." Exp Cell Res **246**(1): 108-121.
8. Balzar, M., M. J. Winter, C. J. de Boer and S. V. Litvinov (1999). "The biology of the 17-1A antigen (Ep-CAM)." J Mol Med (Berl) **77**(10): 699-712.
9. Becker, H. (2012). "Die häufigsten Todesursachen in Deutschland."
10. Becker, K. F., M. J. Atkinson, U. Reich, I. Becker, H. Nekarda, J. R. Siewert and H. Hofler (1994). "E-cadherin gene mutations provide clues to diffuse type gastric carcinomas." Cancer Res **54**(14): 3845-3852.
11. Becker, K. F., E. Kremmer, M. Eulitz, I. Becker, G. Handschuh, C. Schuhmacher, W. Muller, H. E. Gabbert, A. Ochiai, S. Hirohashi and H. Hofler (1999). "Analysis of E-cadherin in diffuse-type gastric cancer using a mutation-specific monoclonal antibody." Am J Pathol **155**(6): 1803-1809.
12. Behrens, G., T. Gredner, C. Stock, M. F. Leitzmann, H. Brenner and U. Mons (2018). "Cancers Due to Excess Weight, Low Physical Activity, and Unhealthy Diet." Dtsch Arztebl Int **115**(35-36): 578-585.
13. Biondi, A., D. D'Ugo, F. Cananzi, S. Rausei, F. Sicoli, F. Santullo, A. Laurino, L. Ruspi, F. Belia, V. Quagliuolo and R. Persiani (2019). "Prognostic Indicators in Stage IV Surgically Treated Gastric Cancer Patients: A Retrospective Multi-Institutional Study." Dig Surg **36**(4): 331-339.
14. Birnboim, H. C. and J. Doly (1979). "A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA." Nucleic Acids Res **7**(6): 1513-1523.
15. Bondow, B. J., M. L. Faber, K. J. Wojta, E. M. Walker and M. A. Battle (2012). "E-cadherin is required for intestinal morphogenesis in the mouse." Dev Biol **371**(1): 1-12.
16. Boross, P. and J. H. Leusen (2012). "Mechanisms of action of CD20 antibodies." Am J Cancer Res **2**(6): 676-690.
17. Brooks-Wilson, A. R., P. Kaurah, G. Suriano, S. Leach, J. Senz, N. Grehan, Y. S. Butterfield, J. Jeyes, J. Schinas, J. Bacani, M. Kelsey, P. Ferreira, B. MacGillivray, P. MacLeod, M. Micek, J. Ford, W. Foulkes, K. Australie, C. Greenberg, M. LaPointe, C. Gilpin, S. Nikkel, D. Gilchrist, R. Hughes, C. E. Jackson, K. G. Monaghan, M. J. Oliveira, R. Seruca, S. Gallinger, C. Caldas and D. Huntsman (2004). "Germline E-cadherin mutations in hereditary diffuse gastric cancer: assessment of 42 new families and review of genetic screening criteria." J Med Genet **41**(7): 508-517.
18. C.Milstein, G. K. u. (07.08.1975). "Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity." Nature **256**: 495-497.

19. Chacaltana, A., C. Rodriguez, C. Urday, W. Ramon, J. Espinoza, H. Velarde, I. Rodriguez, E. Lucho and E. Rauch (2009). "[Preneoplastic gastric lesions and helicobacter pylori in endoscopic detection and early diagnosis of gastric cancer in a population of a medium and high socio-economic level]." Rev Gastroenterol Peru **29**(3): 218-225.
20. Chen, D. S. and I. Mellman (2017). "Elements of cancer immunity and the cancer-immune set point." Nature **541**(7637): 321-330.
21. Conacci-Sorrell, M., J. Zhurinsky and A. Ben-Ze'ev (2002). "The cadherin-catenin adhesion system in signaling and cancer." J Clin Invest **109**(8): 987-991.
22. Cummings, R. D. and D. F. Smith (1992). "The selectin family of carbohydrate-binding proteins: structure and importance of carbohydrate ligands for cell adhesion." Bioessays **14**(12): 849-856.
23. de Bono, J. S., A. W. Tolcher, A. Forero, G. F. Vanhove, C. Takimoto, R. J. Bauer, L. A. Hammond, A. Patnaik, M. L. White, S. Shen, M. B. Khazaeli, E. K. Rowinsky and A. F. LoBuglio (2004). "ING-1, a monoclonal antibody targeting Ep-CAM in patients with advanced adenocarcinomas." Clin Cancer Res **10**(22): 7555-7565.
24. Dr.Dr.Haller. (2009). "TNM Staging Clasification." from <https://www.cancertherapyadvisor.com/home/decision-support-in-medicine/hospital-medicine/gastric-cancer/>.
25. EMA. (17.07.2017). "European Public Assessment Report (EPAR) Remova." European Medicines Agency, from https://www.ema.europa.eu/en/documents/overview/removab-epar-summary-public_de.pdf.
26. Eyvazi, S., S. Farajnia, S. Dastmalchi, F. Kanipour, H. Zarredar and M. Bandehpour (2018). "Antibody Based EpCAM Targeted Therapy of Cancer, Review and Update." Curr Cancer Drug Targets **18**(9): 857-868.
27. Frey, N. (2017). "Cytokine release syndrome: Who is at risk and how to treat." Best Pract Res Clin Haematol **30**(4): 336-340.
28. Gallo, A. and C. Cha (2006). "Updates on esophageal and gastric cancers." World J Gastroenterol **12**(20): 3237-3242.
29. Gertler, R., J. Richter, L. Stecher, U. Nitsche and M. Feith (2016). "What to do after R1-resection of adenocarcinomas of the esophagogastric junction?" J Surg Oncol **114**(4): 428-433.
30. Goel, S., R. J. Bauer, K. Desai, A. Bulgaru, T. Iqbal, B. K. Strachan, G. Kim, A. Kaubisch, G. F. Vanhove, G. Goldberg and S. Mani (2007). "Pharmacokinetic and safety study of subcutaneously administered weekly ING-1, a human engineere monoclonal antibody targeting human EpCAM, in patients with advanced solid tumors." Ann Oncol **18**(10): 1704-1707.
31. Gotoda, T., A. Yanagisawa, M. Sasako, H. Ono, Y. Nakanishi, T. Shimoda and Y. Kato (2000). "Incidence of lymph node metastasis from early gastric cancer: estimation with a large number of cases at two large centers." Gastric Cancer **3**(4): 219-225.
32. Greenall, S. A., E. Gherardi, Z. Liu, J. F. Donoghue, A. A. Vitali, Q. Li, R. Murphy, L. Iamele, A. M. Scott and T. G. Johns (2012). "Non-agonistic bivalent antibodies that promote c-MET degradation and inhibit tumor growth and others specific for tumor related c-MET." PLoS One **7**(4): e34658.
33. Gruel, N., W. H. Fridman and J. L. Teillaud (2001). "Bypassing tumor-specific and bispecific antibodies: triggering of antitumor immunity by expression of anti-FcgammaR scFv on cancer cell surface." Gene Ther **8**(22): 1721-1728.
34. Ho, V. K. Y., E. P. M. Jansen, B. P. L. Wijnhoven, K. J. Neelis, J. W. van Sandick, R. H. A. Verhoeven, V. E. P. Lemmens and H. W. M. van Laarhoven (2017). "Adjuvant Chemoradiotherapy for Non-Pretreated Gastric Cancer." Ann Surg Oncol **24**(12): 3647-3657.

35. Huang, L., Y. Yang, F. Yang, S. Liu, Z. Zhu, Z. Lei and J. Guo (2018). "Functions of EpCAM in physiological processes and diseases (Review)." Int J Mol Med **42**(4): 1771-1785.
36. Huber, O., R. Kemler and D. Langosch (1999). "Mutations affecting transmembrane segment interactions impair adhesiveness of E-cadherin." J Cell Sci **112 (Pt 23)**: 4415-4423.
37. Kaikawus Arstéh, H.-W. B., Christiane Bieber, Roland Brandt, Tushar Thomas Chatterjee (2018). Duale Reihe Innere Medizin, Georg Thieme Verlag KG Stuttgart.
38. Kantarjian, H., A. Stein, N. Gokbuget, A. K. Fielding, A. C. Schuh, J. M. Ribera, A. Wei, H. Dombret, R. Foa, R. Bassan, O. Arslan, M. A. Sanz, J. Bergeron, F. Demirkan, E. Lech-Maranda, A. Rambaldi, X. Thomas, H. A. Horst, M. Bruggemann, W. Klapper, B. L. Wood, A. Fleishman, D. Nagorsen, C. Holland, Z. Zimmerman and M. S. Topp (2017). "Blinatumomab versus Chemotherapy for Advanced Acute Lymphoblastic Leukemia." N Engl J Med **376**(9): 836-847.
39. Katafiasz, B. J., M. T. Nieman, M. J. Wheelock and K. R. Johnson (2003). "Characterization of cadherin-24, a novel alternatively spliced type II cadherin." J Biol Chem **278**(30): 27513-27519.
40. Kim, S. G., H. S. Seo, H. H. Lee, K. Y. Song and C. H. Park (2017). "Comparison of the Differences in Survival Rates between the 7th and 8th Editions of the AJCC TNM Staging System for Gastric Adenocarcinoma: a Single-Institution Study of 5,507 Patients in Korea." J Gastric Cancer **17**(3): 212-219.
41. Koprowski, H., Z. Steplewski, K. Mitchell, M. Herlyn, D. Herlyn and P. Fuhrer (1979). "Colorectal carcinoma antigens detected by hybridoma antibodies." Somatic Cell Genet **5**(6): 957-971.
42. Kowalski, M., J. Guindon, L. Brazas, C. Moore, J. Entwistle, J. Cizeau, M. A. Jewett and G. C. MacDonald (2012). "A phase II study of oportuzumab monatox: an immunotoxin therapy for patients with noninvasive urothelial carcinoma in situ previously treated with bacillus Calmette-Guerin." J Urol **188**(5): 1712-1718.
43. Lauren, P. (1965). "The Two Histological Main Types of Gastric Carcinoma: Diffuse and So-Called Intestinal-Type Carcinoma. An Attempt at a Histo-Clinical Classification." Acta Pathol Microbiol Scand **64**: 31-49.
44. Lee, J. H., H. S. Han and J. H. Lee (2005). "A prospective randomized study comparing open vs laparoscopy-assisted distal gastrectomy in early gastric cancer: early results." Surg Endosc **19**(2): 168-173.
45. Lewis Phillips, G. D., G. Li, D. L. Dugger, L. M. Crocker, K. L. Parsons, E. Mai, W. A. Blattler, J. M. Lambert, R. V. Chari, R. J. Lutz, W. L. Wong, F. S. Jacobson, H. Koeppe, R. H. Schwall, S. R. Kenkare-Mitra, S. D. Spencer and M. X. Sliwkowski (2008). "Targeting HER2-positive breast cancer with trastuzumab-DM1, an antibody-cytotoxic drug conjugate." Cancer Res **68**(22): 9280-9290.
46. Little, M. (2014). Antikörper in der Krebsbekämpfung, Springer-Verlag Berlin Heidelberg 2015.
47. Litvinov, S. V., M. P. Velders, H. A. Bakker, G. J. Fleuren and S. O. Warnaar (1994). "Ep-CAM: a human epithelial antigen is a homophilic cell-cell adhesion molecule." J Cell Biol **125**(2): 437-446.
48. Lordick, F. and J. R. Siewert (2008). "[Bevacizumab (Avastin) related surgical complications: comment to Abbrederis K et al. (2007)]." Chirurg **79**(4): 356-360.
49. Messerschmidt, K., S. Hempel, P. Holzlohner, R. G. Ulrich, D. Wagner and K. Heilmann (2012). "IgA antibody production by intrarectal immunization of mice using recombinant major capsid protein of hamster polyomavirus." Eur J Microbiol Immunol (Bp) **2**(3): 231-238.
50. Muller, D. and R. E. Kontermann (2007). "Recombinant bispecific antibodies for cellular cancer immunotherapy." Curr Opin Mol Ther **9**(4): 319-326.
51. München, T. (2018). from <https://www.tumorregister-muenchen.de/>.

52. Oberg, H. H., C. Kellner, D. Gonnermann, S. Sebens, D. Bauerschlag, M. Gramatzki, D. Kabelitz, M. Peipp and D. Wesch (2018). "Tribody [(HER2)2xCD16] Is More Effective Than Trastuzumab in Enhancing gammadelta T Cell and Natural Killer Cell Cytotoxicity Against HER2-Expressing Cancer Cells." Front Immunol **9**: 814.
53. Patriarca, C., R. M. Macchi, A. K. Marschner and H. Mellstedt (2012). "Epithelial cell adhesion molecule expression (CD326) in cancer: a short review." Cancer Treat Rev **38**(1): 68-75.
54. Paul-Ehrlich-Institut. (2018). from <http://www.pei.de/DE/anzneimittel/immunglobuline-monoklonale-antikoerper/monoklonale-antikoerper/monoklonale-antikoerper-node.html>.
55. Rajabi, M. and S. A. Mousa (2017). "The Role of Angiogenesis in Cancer Treatment." Biomedicines **5**(2).
56. S3-Leitlinie. (August 2019). "S3-Leitlinie Magenkarzinom, Langversion 2.0, 2019 AWMF", from https://www.leitlinienprogramm-onkologie.de/fileadmin/user_upload/Downloads/Leitlinien/Magenkarzinom/Version_2/LL_Magenkarzinom_Langversion_2.0.pdf.
57. Sadeghi, S., O. Olevsky and S. A. Hurvitz (2014). "Profiling and targeting HER2-positive breast cancer using trastuzumab emtansine." Pharmgenomics Pers Med **7**: 329-338.
58. Schiller, C. B., T. A. Braciak, N. C. Fenn, U. J. Seidel, C. C. Roskopf, S. Wildenhain, A. Honegger, I. A. Schubert, A. Schele, K. Lammermann, G. H. Fey, U. Jacob, P. Lang, K. P. Hopfner and F. S. Oduncu (2016). "CD19-specific triplebody SPM-1 engages NK and gammadelta T cells for rapid and efficient lysis of malignant B-lymphoid cells." Oncotarget **7**(50): 83392-83408.
59. Schulz-Lüdeke, D. m. d. A. (2017). Evaluierung der Bindungsaktivität des scFv83D4 an die tumorassoziierte Glykostruktur Tn-Antigen als Zielstruktur eines trispezifischen Immuntherapeutikums, Universitätsklinikum Hamburg Eppendorf.
60. Scientific, T. F. (2017). from https://www.thermofisher.com/de/de/home/life-science/cloning/gateway-cloning.html?gclid=EAlaIQobChMlvba1m8yW5gIVFc93Ch3OgwDIEAAYASAAEgI2N_D_BwE&s_kwcid=AL!3652!3!248418031326!p!!g!!gateway%20cloning&ef_id=EAlaIQobChMlvba1m8yW5gIVFc93Ch3OgwDIEAAYASAAEgI2N_D_BwE:G:s&s_kwcid=AL!3652!3!248418031326!p!!g!!gateway%20cloning.
61. Scott, A. M., J. D. Wolchok and L. J. Old (2012). "Antibody therapy of cancer." Nat Rev Cancer **12**(4): 278-287.
62. Sebastian, M., B. Passlick, H. Friccius-Quecke, M. Jager, H. Lindhofer, F. Kannies, R. Wiewrodt, E. Thiel, R. Buhl and A. Schmittel (2007). "Treatment of non-small cell lung cancer patients with the trifunctional monoclonal antibody catumaxomab (anti-EpCAM x anti-CD3): a phase I study." Cancer Immunol Immunother **56**(10): 1637-1644.
63. Sefan Dübel, P. R., Andreas Schmiedl (2004). "Rekombinante Antikörper."
64. Senekowitsch-Schmidtke, R., C. Schuhmacher, K. F. Becker, T. K. Nikula, C. Seidl, I. Becker, M. Miederer, C. Apostolidis, C. Adam, R. Huber, E. Kremmer, K. Fischer and M. Schwaiger (2001). "Highly specific tumor binding of a ²¹³Bi-labeled monoclonal antibody against mutant E-cadherin suggests its usefulness for locoregional alpha-radioimmunotherapy of diffuse-type gastric cancer." Cancer Res **61**(7): 2804-2808.
65. Shahied, L. S., Y. Tang, R. K. Alpaugh, R. Somer, D. Greenspon and L. M. Weiner (2004). "Bispecific minibodies targeting HER2/neu and CD16 exhibit improved tumor lysis when placed in a divalent tumor antigen binding format." J Biol Chem **279**(52): 53907-53914.
66. Singer, H., C. Kellner, H. Lanig, M. Aigner, B. Stockmeyer, F. Oduncu, M. Schwemlein, C. Stein, K. Mentz, A. Mackensen and G. H. Fey (2010). "Effective elimination of acute myeloid leukemic cells by recombinant bispecific antibody derivatives directed against CD33 and CD16." J Immunother **33**(6): 599-608.

67. Singh, J. C., K. Jhaveri and F. J. Esteva (2014). "HER2-positive advanced breast cancer: optimizing patient outcomes and opportunities for drug development." Br J Cancer **111**(10): 1888-1898.
68. Skerra, A. (1994). "A general vector, pASK84, for cloning, bacterial production, and single-step purification of antibody Fab fragments." Gene **141**(1): 79-84.
69. Smyth, E. C., M. Verheij, W. Allum, D. Cunningham, A. Cervantes, D. Arnold and E. G. Committee (2016). "Gastric cancer: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up." Ann Oncol **27**(suppl 5): v38-v49.
70. Spiessl, B., Beahrs, O.H., Hermanek, P., Hutter, R.V.P., Scheibe, O., Sobin, L.H., Wagner, G. (Hrsg.) TNM-Atlas Tumoren des Verdauungstracktes, Springer Verlag, Berlin, Heidelberg.
71. Stefan Dübel, P. R., Andreas Schmiedl, Ed. (2004). Biologie in unserer Zeit, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim.
72. Sun, F., H. Sun, X. Mo, J. Tang, Y. Liao, S. Wang, Y. Su and H. Ma (2018). "Increased survival rates in gastric cancer, with a narrowing gender gap and widening socioeconomic status gap: A period analysis from 1984 to 2013." J Gastroenterol Hepatol **33**(4): 837-846.
73. Tajiri, H., K. Arai, S. Kagimoto, R. Kunisaki, N. Hida, N. Sato, H. Yamada, M. Nagano, Y. Susuta, K. Ozaki, K. Kondo and T. Hibi (2019). "Infliximab for pediatric patients with ulcerative colitis: a phase 3, open-label, uncontrolled, multicenter trial in Japan." BMC Pediatr **19**(1): 351.
74. Takeichi, M. (1991). "Cadherin cell adhesion receptors as a morphogenetic regulator." Science **251**(5000): 1451-1455.
75. Wanebo, H. J. (2000). "The challenge of early gastric cancer: the need to optimize microstaging and therapy." Gastric Cancer **3**(3): 121-122.
76. Went, P. T., A. Lugli, S. Meier, M. Bundi, M. Mirlacher, G. Sauter and S. Dirnhofer (2004). "Frequent EpCam protein expression in human carcinomas." Hum Pathol **35**(1): 122-128.
77. Yonaiyama, S., Y. Toyoki, S. Morohashi, S. Sakuraba, T. Yoshizawa, T. Suzuki, Y. Wu, H. Kijima and K. Hakamada (2013). "Epithelial cell adhesion molecule (EpCAM) overexpression is correlated with malignant potentials of intraductal papillary mucinous neoplasms (IPMNs) of the pancreas." Biomed Res **34**(2): 87-95.
78. Yoshida-Noro, C., N. Suzuki and M. Takeichi (1984). "Molecular nature of the calcium-dependent cell-cell adhesion system in mouse teratocarcinoma and embryonic cells studied with a monoclonal antibody." Dev Biol **101**(1): 19-27.
79. Zhang, X. Y. and P. Y. Zhang (2017). "Gastric cancer: somatic genetics as a guide to therapy." J Med Genet **54**(5): 305-312.
80. Zylberberg, H. M., K. Sultan and S. Rubin (2018). "Hereditary diffuse gastric cancer: One family's story." World J Clin Cases **6**(1): 1-5.

DANKSAGUNG

Zuerst möchte ich meinem Doktorvater, PD Dr. med. Michael Tachezy herzlichst danken, der mir stets mit konstruktiver Kritik und Anregungen zur Seite stand.

Mein besonderer Dank gilt auch Frau Dr. Hilke Zander, welche mich als unmittelbare Betreuerin und Mentorin mit ihrem wissenschaftlichen Rat und Wissen, ihrer eingebrachten Zeit und unendlichen Geduld stets ermutigt und unterstützt hat. Vor allem danke ich ihr für das entgegengebrachte Vertrauen in den Zeiten, die nicht sonderlich von Erfolg gekrönt waren.

Ich danke Herrn Gerrit Wolters für seine Unterstützung, Hilfestellung und Geduld, auch wenn etwas nicht geklappt hat und neu überdacht werden musste.

Im Weiteren danke ich allen Mitarbeitern des Labors des Campus Forschung am UKE für ihre Hilfsbereitschaft und für die freundschaftliche Arbeitsatmosphäre.

Innigst danke ich meiner Mutter, die vom erfolgreichen Abschluss dieser Arbeit nie erfahren wird, im Herzen jedoch stets an mich geglaubt und mich ermutigt hat, das für mich Ungreifbare zu erreichen. Nur mit ihrer Liebe und hingebungsvollen Erziehung konnte diese Arbeit überhaupt entstehen.

Meiner Familie, meinem Vater sowie meiner Schwester, die mich stets mit ihrer Liebe und ihren positiven Worten ermutigt haben, möchte ich ebenso meinen Dank für ihre Unterstützung aussprechen.

Außerdem danke ich Dr. Marcin Specht für seine fachliche Beurteilung, technische Beratung und liebevolle Unterstützung bei der Entstehung dieser Arbeit.

Meinen Freunden, besonders Dr. Sylwia Martensen, Sarah Henkel, Nadine Faitas, Guoda Rechenberger und Dr. Auste Gruodyte, danke ich für den notwendigen Ausgleich und die ermutigenden Worte in dieser intensiven Zeit.

Ich danke ebenfalls Herrn Dr. Meyer sowie Frau Dr. Dehlwes, die mich in den anstrengendsten und stressigsten Lebensphasen bestärkt haben, nicht aufzugeben.

Frederike Gauss für ihr ausgeprägtes technisches Verständnis und die herzliche Hilfsbereitschaft.

LEBENS LAUF

Der Lebenslauf wurde aus datenschutzrechtlichen Gründen entfernt

EIDESSTATTLICHE VERSICHERUNG

Ich versichere ausdrücklich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig und ohne fremde Hilfe verfasst, andere als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt und die aus den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen einzeln nach Ausgabe (Auflage und Jahr des Erscheinens), Band und Seite des benutzten Werkes kenntlich gemacht habe.

Ferner versichere ich, dass ich die Dissertation bisher nicht einem Fachvertreter an einer anderen Hochschule zur Überprüfung vorgelegt oder mich anderweitig um Zulassung zur Promotion beworben habe.

Ich erkläre mich einverstanden, dass meine Dissertation vom Dekanat der Medizinischen Fakultät mit einer gängigen Software zur Erkennung von Plagiaten überprüft werden kann.

Unterschrift: