

Visualisierung und Analysen von Therapieansätzen durch fluoreszenzbasierte molekulare Bildgebungsverfahren

Von der Fakultät für Mathematik, Informatik und Naturwissenschaften der
RWTH Aachen University zur Erlangung des akademischen Grades einer
Doktorin der Naturwissenschaften genehmigte Dissertation

vorgelegt von

Diplom-Biologin

Alessa Pardo

aus Datteln

Berichter: Universitätsprofessor Dr. rer. nat. Rainer Fischer
Universitätsprofessor Dr. rer. nat. Dr. rer. medic. Stefan Barth

Tag der mündlichen Prüfung: 25. September 2012

Diese Dissertation ist auf den Internetseiten der Hochschulbibliothek online verfügbar.

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	iv
1 Einleitung	1
1.1 Krebsbehandlung mit rekombinanten Immuntoxinen	1
1.1.1 <i>Pseudomonas aeruginosa</i> Exotoxin A basierte Immuntoxine	1
1.1.2 Das Immuntoxin 425(scFv)-ETA' und der EGF-Rezeptor	2
1.2 Darstellung von Behandlungseffekten <i>in vivo</i>	4
1.2.1 Darstellung apoptotischer Zellen	5
1.3 Die molekulare Bildgebung	6
1.3.1 Verfahren der molekularen Bildgebung	7
1.3.2 Fluoreszenzbasierte molekulare Bildgebung	9
1.3.3 Das Maestro™ System	10
1.4 Zielsetzung	11
2 Material und Methoden	14
2.1 Geräte und Verbrauchsmaterialien	14
2.1.1 Geräte	14
2.1.2 Verbrauchsmaterialien	16
2.2 Feinchemikalien	16
2.3 Biologisches Material	18
2.3.1 Enzyme	18
2.3.2 Antikörper	18
2.3.3 Plasmide	19
2.4 Medien und Anzuchtbedingungen	19
2.4.1 Medien und Anzuchtbedingungen von Bakterien	19
2.4.2 Medien und Anzuchtbedingungen von eukaryotischen Zellen	20
2.5 Molekularbiologische Methoden	21
2.5.1 Transfektion eukaryotischer Zellen	22
2.5.2 Fermentation von Bakterien	22
2.5.3 Lyse von Bakterien	22
2.6 Proteinchemische Methoden	23
2.6.1 Proteinreinigung mittels Ni-NTA-Immobilisierter-Metall-Affinitäts- Chromatographie	23
2.6.2 Proteinreinigung mittels Anionenaustauschchromatographie	24
2.6.3 Proteinreinigung mittels Gelfiltrationschromatographie	24
2.6.4 SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese	25
2.6.5 Western Blot zum Nachweis gereinigter Proteine durch Antikörperbindung	26
2.6.6 Coomassie-Färbung von SDS-Polyacrylamid Gelen	27
2.6.7 Proteinkonzentrationsbestimmung durch einen Bradford-Assay	27
2.6.8 Durchflusszytometrische Analysen	27
2.6.9 Fluorescence Activated Cell Sorting	28
2.6.10 XTT-basierter Zellviabilitätsassay	28
2.6.11 Annexin-Assay	29

2.6.12	Markierung von SNAP-Fusionen	30
2.7	<i>In vivo</i> Versuche	30
2.7.1	Rekultivierung von A-431 Zellen aus der Maus	30
2.7.2	Darstellung fluoreszierender Tumorzellen	30
2.7.3	Behandlung mit 425(scFv)-ETA' und Doxorubicin	31
2.7.4	Messung der Apoptoseinduktion	31
2.7.5	Bindungsanalysen von 425(scFv)SNAP-747	31
2.8	Computergestützte Methoden	32
2.8.1	Analysen der <i>in vivo</i> Versuche	32
2.8.2	Digitale Bildbearbeitung	32
3	Ergebnisse	33
3.1	Produktion des Immuntoxins 425(scFv)-ETA' für den Einsatz <i>in vivo</i>	33
3.1.1	Fermentation und Reinigung des Immuntoxins 425(scFv)-ETA'	33
3.1.2	Funktionale <i>in vitro</i> Analysen von 425(scFv)-ETA'	37
3.2	Darstellung der apoptoseinduzierenden Wirkung von 425(scFv)-ETA'	40
3.2.1	Eukaryotische Expression von Annexin A5-EGFP	40
3.2.2	Darstellung apoptotischer Tumorzellen nach Inkubation mit 425(scFv)-ETA'	40
3.3	Vorbereitung der <i>in vivo</i> Experimente zur optischen Darstellung subkutaner Tumoren	41
3.3.1	Herstellung rot fluoreszierender Zelllinien	42
3.3.2	Darstellung von fluoreszierenden Zellen <i>in vivo</i>	44
3.4	<i>In vivo</i> Experimente zur Visualisierung und Evaluierung von Behandlungseffekten im subkutanen Mausmodell	46
3.4.1	Optische Darstellung und Bestimmung des Tumorwachstums während der Behandlung mit 425(scFv)-ETA' und Doxorubicin	47
3.4.2	Bestimmung des Tumorwachstums mit Hilfe der Schieblehre während der Behandlung mit 425(scFv)-ETA' und Doxorubicin	49
3.4.3	Optische Darstellung und Bestimmung der Fluoreszenzintensität während der Behandlung mit 425(scFv)-ETA' und Doxorubicin	50
3.4.4	Makroskopische Evaluierung der Tumoren während der Behandlung mit 425(scFv)-ETA' und Doxorubicin	52
3.4.5	Evaluierung der Tumoren über die optische Darstellung von apoptotischen Zellen während der Behandlung mit 425(scFv)-ETA' und Doxorubicin	55
3.5	Darstellung der EGF-Rezeptor-Expression von A431scM3-Kat2 Zellen <i>in vivo</i> über die spezifische Bindung von 425(scFv)SNAP-747	57
4	Diskussion	59
4.1	Systemische/Technische Voraussetzungen für die erfolgreiche Visualisierung von Behandlungseffekten	60
4.1.1	Wahl des Tumormodells	60
4.1.2	Das Maestro™ System	62
4.2	Die Therapie mit 425(scFv)-ETA' im Vergleich zur Therapie mit Doxorubicin	63
4.3	Vergleich der Methoden zur Messung der Tumorgröße	66
4.4	Die Messung apoptotischer Zellen <i>in vivo</i> über die Bindung von Annexin A5	68

4.5	Der Nachweis des EGF-Rezeptors nach der Therapie	71
4.6	Ausblick	72
5	Zusammenfassung	74
6	Literaturverzeichnis	76
7	Anhang	I
7.1	425(scFv)-ETA' Sequenzinformationen	I
7.2	Ein- und Dreibuchstaben-Code der Aminosäuren.....	III
7.3	Spektren der verwendeten fluoreszierenden Proteine	IV
7.4	Auswertungen mit dem Maestro™ System	IV
7.5	Tabellenverzeichnis.....	V
7.6	Abbildungsverzeichnis.....	VI
	Veröffentlichungen	I
	Publikationen.....	I
	Posterpräsentationen	I
	Auszeichnungen	I
	Danksagung.....	I

Abkürzungsverzeichnis

A. dest	destilliertes Wasser
AP	alkalische Phosphatase
APS	Ammoniumpersulfat
AV-AF750	Annexin A5-Alexa Fluor750
BSA	Rinderserumalbumin
DNA	Desoxyribonukleinsäure
ECS	Enterokinase-Erkennungssequenz
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGFP	„enhanced green fluorescent protein“
EGFR	Rezeptor des epidermalen Wachstumsfaktors
ER	Endoplasmatisches Retikulum
ETA	<i>Pseudomonas</i> Exotoxin A
ETA'	<i>Pseudomonas</i> Exotoxin A (mit Deletion der ursprünglichen Zellbindedomäne)
EtBr	Ethidiumbromidlösung
FACS	„Fluorescence Activated Cell Sorting“
FITC	Fluoreszeinisothiocyanat
FKS	fötales Kälberserum
FPLC	„fast protein liquid chromatography“
GAM	Ziege anti Maus (Antikörper)
GFP	grün fluoreszierendes Protein
His	Histidin-Motiv zur Proteinreinigung
IC ₅₀	mittlere inhibitorische Konzentration
Ig- <i>k</i> -L	Signalsequenz zur Sezernierung eines Proteins in den Zellüberstand nach eukaryotischer Expression
IMAC	Immobilisierte Metall-Affinitäts-Chromatographie
Immunglobulin	Ig
Immuntoxin	IT
i.v.	intravenös

Kat2	Katushka
kDa	Kilodalton
mAK	monoklonale Antikörper
MRT	Magnetresonanztomographie
NBT/BCip	Nitro Tetrazolium Blue Chloride/5-Brom-4-Chlor-3-Indolyl-Phosphat
Ni	Nickel
NIR	Nahinfrarot
NTA	Nitrilotriessigsäure
PBS(T)	„phosphate buffered saline“ (mit Tween)
PE40 oder 38	<i>Pseudomonas</i> Exotoxin A (40 bzw. 38 kDa)
PES	Polyethersulfon (hydrophob)
PET	Positronen-Emissions-Tomographie
PI	Propidiumiodid
PO	Peroxidase
PS	Phosphatidylserin
RT	Raumtemperatur
s.c.	subkutan
scFv	„single-chain fragment-variable“, rekombinant erzeugtes einzelsträngiges Fragment der variablen Domänen eines Antikörpers
SDS	Natriumdodecylsulfat
SPECT	Einzelphotonen-Emissions-Tomographie
TAE	Tris/Acetat/EDTA
TEMED	Acrylamid-N,N'-Methylen-bisacrylamid-tetramethylendiamin
TGS	Tris/Glycin/SDS
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
ÜN	über Nacht
v/v	Volumen pro Volumen
w/v	Gewicht pro Volumen

1 Einleitung

1.1 Krebsbehandlung mit rekombinanten Immuntoxinen

Krebs stellt eine der höchsten Mortalitätsraten in der westlichen Welt dar (1). Die heutzutage gängigsten Behandlungsmöglichkeiten sind Chemo- und Radiotherapien, sowie die operative Entfernung der malignen Zellen (WHO Cancer, Fact Sheet No. 297, 2009). Trotz der zunächst relativ hohen Erfolgsquote bei der Behandlung kommt es einige Zeit später nicht selten zu Rückfällen aufgrund des Zurückbleibens residueller Tumorzellen. Bedingt durch z.B. einen kurzzeitig inaktiven Zellstatus oder die Entwicklung von Resistenzen gegen das Chemotherapeutikum werden diese Zellen von der Chemotherapie nicht erfasst und können zur Metastasierung führen (2). Eine Therapie ist dann in vielen Fällen nicht mehr möglich. Angesichts der oft hohen Toxizität von Chemotherapeutika in Verbindung mit der Unspezifität in ihrer Wirkweise können starke Nebenwirkungen hervorgerufen werden, die selbst beim Ausbleiben von Metastasen eine effektive Behandlung unmöglich machen.

Mit der Entdeckung monoklonaler Antikörper (mAk) und deren Nutzung in der Krebstherapie ist, durch die Möglichkeit der spezifischen und hochaffinen Bindung an einzelne Zellen, eine gezieltere Bekämpfung residueller, maligner Zellen möglich (3). Die Kopplung der mAk an wirksame Toxine stellt einen Therapieansatz dar, welcher seit den frühen 1980er Jahren konsequent verfolgt wird (2). Mit diesen so genannten Immuntoxinen (IT) bediente man sich eines Produktes des Immunsystems, um ein bestimmtes Toxin in einzelne Tumorzellen zu bringen und diese so gezielt zu zerstören (4). Auf diese Weise war es möglich, auch sich nicht teilende, überdauernde Zellen zu vernichten (5).

1.1.1 *Pseudomonas aeruginosa* Exotoxin A basierte Immuntoxine

Die Toxine, welche anfangs für die Konstruktion von IT verwendet wurden, waren in ihrer Herkunft grundverschieden. So wurden Toxine aus Vertebraten, Pflanzen, Insekten und sogar Mikroorganismen genutzt (3). Aufgrund ihrer hohen Toxizität, niedrigeren Nebenwirkungen und ihrer einfachen Herstellung in *E. coli* wurden bisher zwei bakterielle Toxine in klinischen Studien eingesetzt: Diphtheria Toxin (4; 6; 7) und *Pseudomonas aeruginosa* Exotoxin A (ETA) (8-10). Die Struktur (11) sowie die genaue Wirkweise von ETA waren schon früh bis ins Detail geklärt. Das Toxin besteht aus drei Domänen mit unterschiedlichen funktionellen Eigenschaften (12). Domäne I ist für die Zellbindung verantwortlich. Diese ist in den verwendeten IT üblicherweise deletiert und durch einen, gegen die jeweilige Zelle spezifisch

gerichteten Antikörper oder ein „single chain variable fragment“ (scFv) ersetzt worden. Dies macht die Spezifität des IT aus. Das verkürzte Toxin (Domäne II, Ib und III) wird auch als *Pseudomonas aeruginosa* Exotoxin A' (ETA') oder nach einer weiteren Deletion in der Domäne Ib als *Pseudomonas aeruginosa* Exotoxin A' 38 (PE38) bezeichnet (13). Nach der zielzellspezifischen Bindung des IT kommt es zur Internalisierung in die Zelle und die Aufnahme des IT ins Endosom. Nach proteolytischer Spaltung innerhalb der Domäne II vermittelt diese die Translokation eines 37 kDa großen Fragments über das Endoplasmatische Retikulum (ER) ins Zytosol (14-17). Dort führt Domäne III dann zur Inaktivierung des Elongationsfaktors EF2 und damit zum Stillstand der Proteinbiosynthese und zum Zelltod (Abbildung 1).

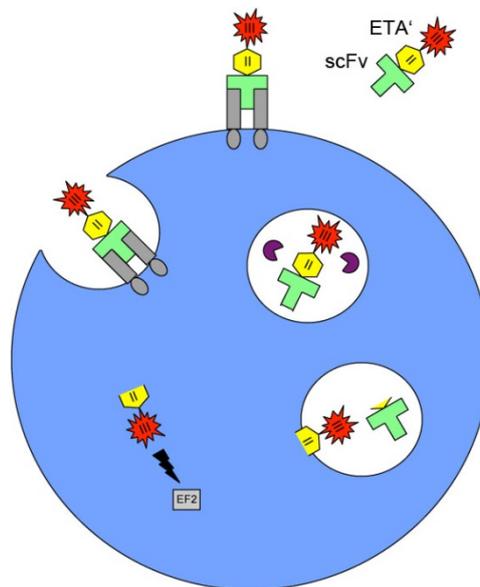


Abbildung 1: Schematische Darstellung der Wirkung eines ETA'-basierten IT.

Das IT bindet über einen spezifischen Rezeptor an die Zelle und löst somit die Internalisierung aus. Im Endosom finden proteolytische Prozessierungen statt. Die Spaltung innerhalb der Domäne II von ETA' führt zum Transport in das Endoplasmatische Retikulum und von dort in das Zytosol. Die Domäne III vermittelt die Inaktivierung von EF2, was anschließend zum Zelltod führt. Abbildung: A. Pardo (Dissertation 2012).

1.1.2 Das Immuntoxin 425(scFv)-ETA' und der EGF-Rezeptor

Die Wirksamkeit mehrerer ETA' basierter IT wurde bereits im Mausmodell getestet (18-22). Auch 425(scFv)-ETA' erwies sich in der Maus als wirkungsvoll. Das 425(scFv) (23; 24) bindet spezifisch an den humanen EGF-Rezeptor (EGFR; „epidermal growth factor receptor“), welcher auf diversen Tumorzellen wie z.B. Zellen des Mammakarzinoms, Pankreaskarzinoms und Glioblastoms überexprimiert ist (25-27). Am stärksten vertreten ist er jedoch auf Zellen des Plattenepithelkarzinoms (28; 29). Der 170 kDa große, humane EGFR gehört zu einer Rezeptor-Familie (ErbB/HER), welche vier verschiedene Rezeptoren umfasst.

Alle diese Rezeptoren sind nah miteinander verwandt. Sie sind Transmembranglykoproteine und bestehen aus einer extrazellulären, sowie einer funktionellen intrazellulären Domäne mit Tyrosinkinaseaktivität. Die aus vier leucin- und cysteinreichen Subdomänen bestehende extrazelluläre Domäne des EGFR dient der Bindung von Liganden wie z.B. EGF („epidermal growth factor“), TGF („transforming growth factor“)- α , AR („amphiregulin“), ER („epiregulin“) oder NR („neuroregulin“). Dies bewirkt die Rezeptor-Dimerisierung und Aktivierung der Tyrosinkinase, was zu einer intrazellulären Signalkaskade und der Auslösung von z.B. Zellproliferation, Differenzierung oder Angiogenese führt (30). Eine Überexpression des EGFR auf Tumorzellen kann jedoch eine erhöhte Zellteilungsrate aufweisen und so zur Metastasierung beitragen. Auch ist eine erhöhte Expression der Liganden EGF, TGF- α , Amphiregulin und Epiregulin im Tumorgewebe nachgewiesen worden, was durch autokrine Aktivierungszyklen ebenfalls zu einer Erhöhung der Zellproliferation und der damit verbundenen Tumoraggressivität führen kann (31-34). Manche Tumorzellen exprimieren hingegen eine mutierte Form des EGFR (EGFRvIII), welche eine konstitutiv exprimierte Tyrosinkinase aufweist (35). Aufgrund der relativ geringen Expression des EGFR auf gesunden Zellen ist er ein geeignetes Zielantigen, um Tumorzellen spezifisch zu binden.

Die erfolgreiche Entwicklung verschiedenster Arten von Therapeutika gegen dieses Antigen unterstreicht seine Bedeutung in der Tumorthherapie. Zu den bereits zugelassenen Therapeutika zählen Gefitinib (Iressa) und Erlotinib (Tarceva), sowie Cetuximab (Erbix) und Panitumumab (Vectibix). Gefitinib (36; 37) und Erlotinib (38) gehören zur Klasse der Tyrosinkinase-Inhibitoren, während Cetuximab (39) und Panitumumab (40) mAK sind, die an den EGFR binden. Beide Substanzklassen verhindern die Aktivierung und Weiterleitung der Signale über die Signalkaskade des EGFR. Somit wird die Proliferation, Differenzierung und Angiogenese der Tumorzellen unterbunden. Nichtsdestotrotz entwickeln viele Patienten nach einiger Zeit Resistenzen gegen diese Therapeutika. Dies hängt womöglich damit zusammen, dass im Laufe der Behandlung andere Signalwege unabhängig von der Aktivierung des EGFR zur Zellproliferation führen. Außerdem kann es zur konstitutiven Aktivierung von Prozessen kommen, die der Tyrosinkinase in der Signalkaskade nachgeschaltet sind (41).

In einigen Tumoren kommt es zur Herunterregulierung der Rezeptorexpression, was eine rezeptorspezifisch gerichtete Therapie erschwert, wenn nicht sogar unmöglich macht. Es konnte gezeigt werden, dass in Cetuximab resistenten Zellen der EGFR in den Zellkern transportiert wurde und von dort aus die Proliferation der Zelle steuert (42). Weiterhin ist bekannt, dass Erlotinib resistente Tumoren über eine geringere Anzahl aktivierter EGFR verfügen, während der Level der Genexpression unverändert ist (43).

Das IT 425(scFv)-ETA' wurde in unserem Labor zunächst *in vitro* zur Behandlung von Zellen des Plattenepithelkarzinoms (A431) und von Zellen des Pankreaskarzinoms (L3.6pl und FG) eingesetzt (44). Mit einer mittleren inhibitorischen Konzentration (IC_{50}) von 7,5 ng/ml konnte die spezifische Eliminierung der aggressiven Pankreaskarzinomzelllinie L3.6pl dargestellt werden. Weiterführende Versuche im disseminierten Mausmodell bestätigten die Funktionalität des IT auch *in vivo*. Nach intravenöser (i.v.) Inokulation von L3.6pl Tumorzellen in immundefiziente Mäuse wurde das IT präventiv in einer einmaligen Dosis (20 μ g) oder an vier aufeinanderfolgenden Tagen (jeweils 10 μ g) verabreicht. 49 Tage später konnte nach Präparation der Lungen ein signifikanter Unterschied in der mittleren Anzahl der entwickelten Lungenmetastasen in den mit 425(scFv)-ETA' behandelten Mäusen im Vergleich zur Kontrollgruppe festgestellt werden. Während die Mäuse in der Kontrollgruppe im Mittel 56,25 Lungenmetastasen aufwiesen, waren es bei den mit 425(scFv)-ETA' behandelten Tieren 0,875 (einmalige Dosis) bzw. 0,286 (wiederholte Dosis; (45)). 425(scFv)-ETA' ist somit eins der wenigen IT, welche auch im Mausmodell eine Wirkung zeigen und daher eine Perspektive zur Behandlung von EGFR-positiven Tumoren darstellen.

1.2 Darstellung von Behandlungseffekten *in vivo*

Eine erfolgreiche Behandlung mit Chemotherapeutika oder IT resultiert in der Regel in einer Stagnation oder Reduktion des Tumorwachstums, sowie in der verminderten Entwicklung von Metastasen. Diese Effekte können über verschiedene Methoden nachgewiesen werden. Bei der Behandlung von Tumoren wird in den meisten Studien das Gewicht der Tiere bestimmt und eventuelle Änderungen während der Behandlung beobachtet. Oft werden die Tumoren (46) sowie auch einzelne Organe (45) *ex vivo* gewogen, um eventuelle therapiebedingte Veränderungen oder das Auftreten von Metastasen feststellen zu können. Sind die Tumoren von außen gut sichtbar (wie bei subkutan (s.c.) wachsenden Tumoren), kann ihre Größe mittels einer Schieblehre bestimmt und so das Wachstumsverhalten während der Therapie beobachtet werden (47). Spezifischere Analysen zum Nachweis therapiebedingter Veränderungen in bestimmten Zellprozessen werden in der Regel *ex vivo* durchgeführt. Kryo- oder Paraffinschnitte entnommener Organe können je nach zu untersuchendem Prozess spezifisch angefärbt werden. Hämatoxylin-Eosin Färbungen geben eine Übersicht über Gewebsstrukturen und die sie enthaltenen Zellen. Mit Hilfe der Immunhistochemie ist es möglich, zu einem bestimmten Zeitpunkt spezifische Veränderungen in Zellen oder deren Rezeptorexpressionsstatus zu analysieren und optisch

darzustellen. Andere Möglichkeiten zur Analyse von Tumorgewebe ist die Bestimmung des Proliferationsindex der Zellen über den spezifischen Antikörper anti-Ki-67 (48) oder über eine Zellzyklusanalyse (49).

1.2.1 Darstellung apoptotischer Zellen

Viele verwendete Chemotherapeutika oder IT wirken durch Induktion von Apoptose in den Tumorzellen. Sie ist definiert als ein von der Zelle aktiv durchgeführtes Programm zur Selbstzerstörung, welches z.B. auch zur Kontrolle der Zellzahl und Größe eines Gewebes abgerufen wird. Es gibt verschiedene Methoden, um apoptotische Zellen nach Therapieabschluss nachzuweisen. Eine der auch heute noch am häufigsten angewandten ist die 1992 eingeführte TUNEL-Färbung, bei der die hydroxylierten Endstücke fragmentierter DNA sichtbar gemacht werden (50; 51). Eine weitere Möglichkeit zum Nachweis von Apoptose ist die spezifische Anfärbung von Caspase 3, ein Enzym, welches beim programmierten Zelltod eine zentrale Rolle spielt (52; 53). Apoptose ist jedoch nicht nur intrazellulär nachweisbar. Im Gegensatz zur Nekrose kommt es bei apoptotischen Zellen zur Abschnürung von Vesikeln, den sogenannten „apoptotischen Körperchen“, welche von Phagozyten aufgenommen und beseitigt werden. Die Erkennung der apoptotischen Körperchen geschieht hierbei über Phosphatidylserin (PS), einem Phospholipid, welches beim Vorgang der Apoptose von der Innenseite der Plasmamembran auf die Außenseite verlagert wird. PS kann somit auch als Marker genutzt werden, um apoptotische Zellen *in vitro* nachzuweisen. Dies kann über mAK (54) sowie über die Bindung von Annexin A5 (55) an das Phospholipid erfolgen (Abbildung 2).

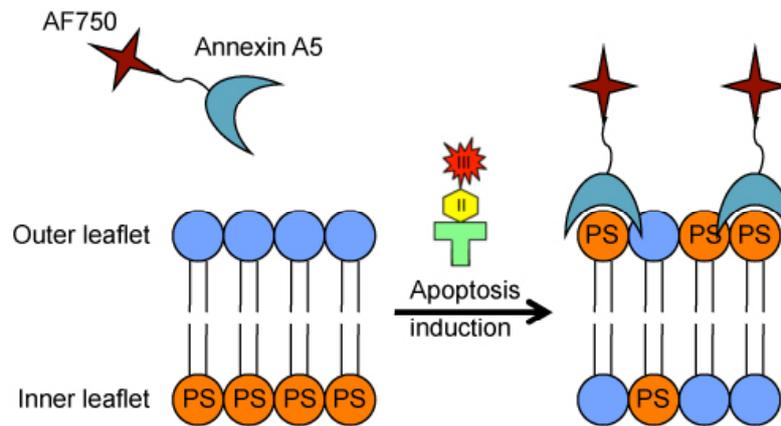


Abbildung 2: Detektion apoptotischer Zellen über die Bindung von Annexin A5.

Beim Vorgang der Apoptose (ausgelöst z.B. durch die Wirkung eines IT) kommt es zu einer Umlagerung des in der Zellmembran verankerten Phospholipids PS von der Innen- auf die Außenseite der Membran. Annexin A5 ist ein Protein, welches spezifisch an PS bindet. Markiertes Annexin A5 (z.B. durch den Fluoreszenzfarbstoff AlexaFluor750 (AF750)) kann dazu genutzt werden, apoptotische Zellen *in vitro* oder auch *in vivo* nachzuweisen. Abbildung: A. Pardo (Dissertation 2012).

Annexin A5 ist ein humanes Protein, welches in hohen Konzentrationen in der Plazenta, aber auch z.B. in endothelialen Zellen, in den Nieren, im Myokardium, in Muskeln und der Haut vorkommt (56). Obwohl seine Funktion bisher ungeklärt ist, konnten verschiedene Eigenschaften des Proteins gezeigt werden. Annexin A5 spielt z.B. eine Rolle bei der Inhibierung der Blutgerinnung sowie bei immunmodulatorischen Effekten von apoptotischen und nekrotischen Zellen (57). Die Entdeckung der calciumabhängigen Bindung des Proteins an PS führte zum Einsatz von Annexin A5 in der Detektion apoptotischer Zellen *in vitro* und *in vivo* (58; 59). Letzteres beruht insbesondere auf der Verwendung radioaktiv markierter Annexin A5-Konstrukte. Die ständige Weiterentwicklung von Annexin A5-basierten Konstrukten macht das Protein dabei tauglich für Anwendungen in den unterschiedlichen Modalitäten der molekularen Bildgebung.

1.3 Die molekulare Bildgebung

Das Verfahren der molekularen Bildgebung ermöglicht die Beobachtung und Messung biologischer Prozesse *in vivo* auf einer zellulären und molekularen Ebene (60). Daher wird es ebenfalls zunehmend zur Beobachtung und Kontrolle therapiebezogener Effekte genutzt. Hierbei wird die Evaluierung von Fragestellungen ermöglicht, bei denen herkömmliche histologische oder zytologische Untersuchungen an ihre Grenzen stoßen. Die Durchführung von chemischer Fixierung entnommener Gewebe und deren Verwahrung unter nicht

physiologischen Bedingungen können zu Beobachtungen führen, die denen im komplexen zellulären *in vivo* Milieu nicht entsprechen (61). Dies ist zurückzuführen auf die Einstellung veränderter molekularer Prozesse, welche mit veränderten physiologischen Bedingungen einhergehen kann. Ein weiterer Nachteil konventioneller Analysen ist die Quantität an Daten, die in mehreren Experimenten erzielt werden muss, um eine signifikante Aussage treffen zu können. Mit der molekularen Bildgebung ist es möglich, in nur einem experimentellen „Setup“ einerseits mehreren Fragestellungen nachzugehen als auch eine Fragestellung an mehreren Zeitpunkten evaluieren zu können. Letzteres bedingt zusätzlich eine Verringerung in der Varianz der Ergebnisse verglichen mit Datensätzen aus mehreren Tieren, die jeweils zu unterschiedlichen Zeitpunkten geopfert werden müssen (62). Dies ermöglicht auch die Reduzierung der Anzahl benötigter Tiere, ohne jedoch die Signifikanz der Ergebnisse zu beeinflussen. Außerdem ist im Gegensatz zur makroskopischen Beurteilung von Krankheitsbildern in z.B. Gewebeproben eine viel frühere Diagnose möglich, welche mit einer früher einsetzenden Therapie und daher höheren Heilungschancen einhergehen kann (63). Therapieeffekte können hierbei kontinuierlich beobachtet und dabei besser kontrolliert werden.

Ein für die molekulare Bildgebung geeignetes Molekül muss mehrere Voraussetzungen erfüllen. Zum einen muss es eine hohe Serumstabilität aufweisen, es darf keine toxischen Nebenwirkungen zeigen und muss für seine jeweilige Zielstruktur spezifisch sowie hochaffin sein. Des Weiteren muss es die Eigenschaft besitzen, biologische Barrieren wie z.B. Zellmembranen oder Blutgefäßwände zu überwinden (64). Solche Moleküle können unterschiedlich geartet sein. Eingesetzt werden z.B. Rezeptorliganden, Enzymsubstrate, mAK oder rekombinante Proteine (60). Darüber hinaus spielen Nanopartikel eine zunehmende Rolle. Diese Moleküle im 1 – 1000 nm Bereich zeigen einzigartige neue optische, elektrische, magnetische und strukturelle Eigenschaften (65).

1.3.1 Verfahren der molekularen Bildgebung

Es gibt drei gängige Modalitäten der molekularen Bildgebung: die nuklearmedizinische Tomographie, Magnetresonanztomographie (MRT) und die optische Bildgebung. Jede dieser Methoden hat ihre Vor- und Nachteile. Sie variieren in der Sensitivität, der räumlichen und zeitlichen Auflösung, der Durchdringungstiefe des Gewebes und den Kosten.

Die nuklearmedizinische Tomographie wird unterschieden in der Positronen-Emissions-Tomographie (PET) und Einzelphotonen-Emissions-Tomographie (SPECT). Beide Methoden

beruhen auf dem Einsatz von sogenannten Radiopharmakonen. Dies sind Moleküle, welche zu ihrer Detektion mit einem Radioisotop markiert sind. Dabei werden für PET Positronemitter (wie z.B. ^{11}C und ^{18}F) eingesetzt, mit welchen die sogenannte Vernichtungsstrahlung gemessen werden kann. Für SPECT werden Gammaemitter (wie z.B. ^{123}I , ^{111}In und $^{99\text{m}}\text{Tc}$) zur direkten Messung der Gammastrahlung verwendet. Die nuklearmedizinische Tomographie wird hauptsächlich zur Ermessung und Einstufung von malignen Erkrankungen sowie zur Untersuchung der Genexpression bestimmter Enzyme (66) oder Rezeptoren (67) eingesetzt. Dies geschieht z.B. über die Messung der Internalisierung des radioaktiv markierten ^{18}F -FDG, ein Glukose-Analog, welches über den in malignen Zellen erhöhten Glukose-Stoffwechsel aufgenommen wird (68).

Auch die MRT dient der Unterscheidung von malignen und nicht-malignen Geweben und basiert auf der physikalischen Gegebenheit, dass Atomkerne einen „Spin“ besitzen, welcher im äußeren Magnetfeld eine bestimmte Orientierung einnimmt. Bei zusätzlicher Einwirkung eines elektromagnetischen Wechselfeldes (durch z.B. Radiowellen) ändert sich die Orientierung. Diese Änderung wird bei der MRT gemessen. Die unterschiedlichen Signale, welche von malignen bzw. nicht-malignen Geweben erzeugt werden, können in Bildern dargestellt werden (64).

Ein Vorteil optischer bildgebender Verfahren ist der Einsatz von Substanzen, die nicht radioaktiv markiert sein müssen wie bei der nuklearmedizinischen Tomographie, bei welcher die Studien am Patienten durch die verwendete radioaktive Dosis limitiert sind (69). Weiterhin sind sie in der Regel kostengünstiger und weiter verbreitet als die nuklearmedizinische Tomographie und MRT. Die optische Bildgebung umfasst hauptsächlich die Darstellung mittels Biolumineszenz oder Fluoreszenz. Sie beruht auf der Aufnahme von Lichtphotonen unter Verwendung einer CCD („charge-coupled device“)-Kamera. Diese ermöglicht die Lichtaufnahme innerhalb und außerhalb des sichtbaren Spektrums. Im Fall der Biolumineszenz verwendet man das Enzym Luciferase zur Lichtemission aus energieabhängigen chemischen Reaktionen. Da das Enzym aus den verschiedensten Organismen wie z.B. Bakterien, Glühwürmchen, Korallen, Quallen oder Dinoflagellaten gewonnen wird, ist die klinische Anwendung der Biolumineszenz zur Zeit noch nicht absehbar (60; 69). Daher ist die fluoreszenzbasierte optische Bildgebung von besonderem Interesse und im Fokus der aktuellen Forschung.

1.3.2 Fluoreszenzbasierte molekulare Bildgebung

Wird ein Molekül durch die Aufnahme von Licht einer bestimmten Wellenlänge angeregt, gibt es die Energie beim Rückgang in den Ausgangszustand wieder ab. Dieser Vorgang wird als Fluoreszenz bezeichnet. Die Nutzung der Fluoreszenz in der optischen Bildgebung bietet vielfältige Möglichkeiten. Fluoreszierende Antikörper oder Antikörperfragmente können eingesetzt werden, um bestimmte Zellen spezifisch zu binden. Weiterhin können Pharmakologie-Studien durchgeführt werden oder man verwendet fluoreszierende Zellen um deren Wachstumsverhalten *in vivo* zu verfolgen. Dabei ist die Nutzung von Fluoreszenzfarbstoffen im längerwelligen Bereich (z.B. Nahinfrarot (NIR)) des Lichtspektrums von besonderem Interesse. Endogene Moleküle, wie z.B. Hämoglobin, Melanin, Lipide etc., absorbieren im kurzwelligen, grünen Bereich des Spektrums (Abbildung 3).

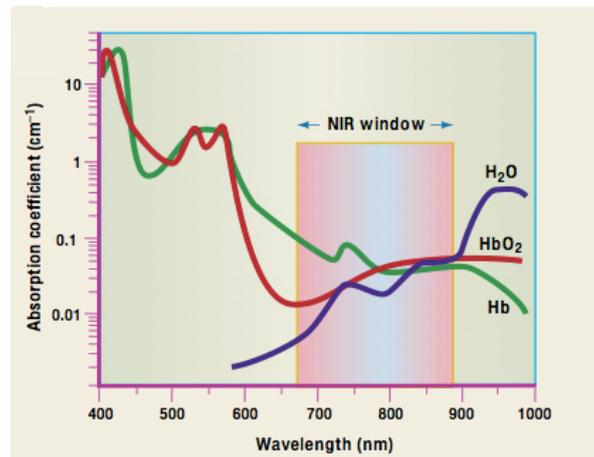


Abbildung 3: Darstellung der Autofluoreszenz von endogenen Molekülen.

Aufgrund der Absorption endogener Moleküle im Bereich von 400 - 650 nm sowie > 900 nm und der damit verbundenen Autofluoreszenz ist der NIR-Bereich für die Messung spezifischer Fluoreszenzsignale am besten geeignet (Abbildung aus: (70)).

Die Messung im roten Bereich ermöglicht somit die Darstellung spezifischer Signale, welche weitestgehend frei von den endogen generierten Hintergrundsignalen sind (69; 71). Des Weiteren weisen rote Fluoreszenzfarbstoffe eine höhere Durchdringungstiefe in das Gewebe auf, was die Darstellung von im Gewebe tiefer generierten Signalen ermöglicht. Heute sind eine große Anzahl an Fluorochromen mit einem Emissionsmaximum im Bereich des sichtbaren Lichts (390 - 650 nm) bis hin zum dunkelroten Spektrum (650 nm) verfügbar, wie z.B. HcRed, mPlum und AQ143 (72-74). Diese Proteine konnten *in vivo* dargestellt werden, sie zeichneten sich jedoch durch eine weitaus geringere Fluoreszenzintensität aus als das im grünen Bereich absorbierende grün fluoreszierende Protein (GFP; (75)). Des Weiteren ist die

Extinktion des Lichtes in diesem Wellenlängenbereich im lebenden Organismus schwieriger, was wiederum zu einer verminderten Fluoreszenzintensität führt. Die Mutagenese eines pH-stabilen, stark fluoreszierenden Proteins führte zu einer Variante (Katushka (Kat2)), welche sich durch eine geringe Halbwertszeit, hohe Stabilität und einer hohen Fluoreszenzintensität im dunkelroten Bereich des Lichtspektrums auszeichnet (76). Extinktions- und Emissionsmaxima liegen hierbei nah beieinander, was eine effektive Extinktion jenseits der Absorption zellinherenter Moleküle im lebenden Organismus gewährleistet. Im direkten Vergleich mit anderen rot fluoreszierenden Proteinen wird deutlich, wieviel stärker Kat2 fluoresziert. So konnte eine 7 - 10fach stärkere Fluoreszenzintensität im Vergleich zu HcRed oder mPlum dargestellt werden. Kat2 stellt somit ein geeignetes Fluorochrom für die *in vivo* Detektion dar.

Die fluoreszenzbasierte molekulare Bildgebung findet hauptsächlich ihre Anwendung in der Visualisierung von Tumorzellen, der Beobachtung ihres Wachstums (77; 78) und Fähigkeiten zur Metastasierung (79; 80) sowie in Studien zur Genexpression (81).

1.3.3 Das Maestro™ System

Das CRi Maestro™ ist ein kommerzielles System zur fluoreszenzbasierten molekularen Bildgebung in Kleintieren. Aufgrund seiner manuell einstellbaren und unterschiedlich kombinierbaren Filter ist es möglich, mehrere Fluoreszenzsignale in einem Tier zu erfassen und getrennt voneinander darzustellen. Hierbei können auch sich räumlich und spektral überlagernde Signale einzeln dargestellt werden. Dies bietet die Möglichkeit, mehrere Fragestellungen gleichzeitig in einem Tier zu untersuchen.

Das Maestro™ System beinhaltet eine CCD-Kamera, mit der unter Verwendung verschiedener Filter Signale in einem Gesamtbereich von 500 - 950 nm aufgenommen werden können. Je nach eingesetztem Fluorophor wird ein bestimmter einstellbarer Bereich des Lichtspektrums gemessen, wobei unterschiedliche Kombinationen verschiedener Exzitations- und Emissionsfilter verwendet werden können. Darüberhinaus verfügt das Gerät über einen dritten Schmalbandfilter, mit welchem die Schrittgröße bei der Aufnahme eines Wellenlängenbereiches variiert werden kann, wobei jeweils maximal alle 10 nm ein Bild aufgenommen werden kann. Die Informationen einer Messung werden anschließend in einem Bild verpackt, wobei alle gemessenen Signale zunächst in einem Bild visualisiert werden. Die Trennung der verschiedenen Signale erfolgt dann durch die Berechnung der signalspezifischen Spektren (d.h. die jeweiligen Intensitäten als Funktion der Wellenlänge).

Dadurch können Signale voneinander unterschieden werden, die mit bloßem Auge gleich erscheinen (Abbildung 4).

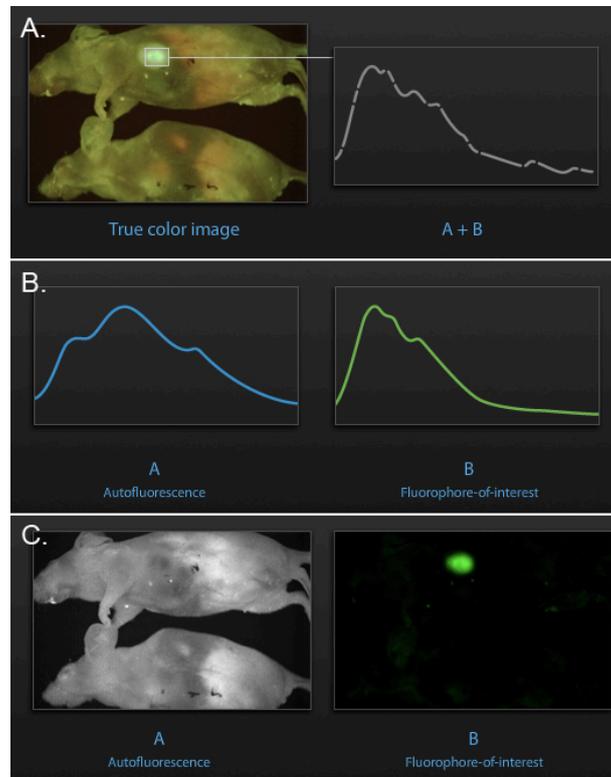


Abbildung 4: Darstellung der Bildanalyse des Maestro™ Systems.

Gezeigt ist die Funktionsweise bei der Bildanalyse durch das Maestro™ System. A. Dargestellte Signale können durch Absorptionen in unterschiedlichen Wellenlängenbereichen zustande kommen. B. und C. Mit Hilfe der „Analysesoftware“ des Maestro™ Systems ist es möglich, nicht nur die generierten Signale, sondern die zugrundeliegenden Spektren darzustellen und zu analysieren. Dadurch ist es möglich, auch gleichfarbige Signale voneinander zu unterscheiden (Quelle: <http://www.cri-inc.com/support/multispectral-imaging-tutorial.asp>).

Weiterhin können die bei einer bestimmten Wellenlänge gemessenen Informationen abgerufen werden. Somit ist für jede Fragestellung eine individuelle Datenauswertung möglich.

1.4 Zielsetzung

Mit der fluoreszenzbasierten, molekularen Bildgebung eröffnen sich neue Möglichkeiten der Beobachtung und Darstellung von Therapieeffekten im lebenden Organismus. Anders als bei der nuklearmedizinischen Tomographie werden hier keine radioaktiv markierten Substanzen verwendet, welche sich schädlich auf das umgebende Gewebe auswirken können und die verabreichende Dosis allein deshalb limitieren (69). Mit der Weiterentwicklung der fluoreszierenden Proteine ist es möglich, bestimmte Strukturen oder Zellprozesse mit sehr

geringem Hintergrundsignal darzustellen. Hierbei ist das Protein Kat2 eine Variante, welche sich nicht nur durch die Emission im dunkelroten Lichtspektrum auszeichnet, sondern auch durch eine besonders starke Fluoreszenzintensität (76). Dies ist eine ideale Voraussetzung für die Anwendung von Kat2 in der fluoreszenzbasierten molekularen Bildgebung zur Darstellung von Therapieeffekten. In der vorliegenden Arbeit sollte das Kat2 Protein eingesetzt werden, um den Effekt bei einer Therapie mit dem IT 425(scFv)-ETA' optisch darstellen zu können. 425(scFv)-ETA' wurde bereits im Mausmodell in einem präventiven Ansatz erfolgreich eingesetzt und führte zu einer Reduktion in der Entwicklung von Lungenmetastasen im Vergleich zu nicht behandelten Tieren (45). Das IT ist daher für die Etablierung des Systems zur optischen Darstellung von Behandlungseffekten bestens geeignet. Um die zu behandelnden Tumoren vergleichsweise auch makroskopisch evaluieren zu können, wurde ein subkutanes Tumormodell gewählt. Die für 425(scFv)-ETA' *in vitro* hochsensitiv getestete Plattenepithelkarzinomzelllinie A-431 sollte mit Kat2 transfiziert als auch die Funktionalität von 425(scFv)-ETA' *in vitro* verifiziert werden. Hierfür sollten die Zellen vorher in der Maus passagiert werden, um das Anwachsen *in vivo* von vornherein zu begünstigen. Die rot fluoreszierenden Zellen sollten anschließend in der Maus optimal dargestellt werden. Anschließend sollte eine Therapie mit dem IT durchgeführt und eventuelle Behandlungseffekte anhand der Fluoreszenzintensität und der über die Fluoreszenz bestimmbaren Tumorgöße während und nach der Behandlung optisch dargestellt werden. Es war vorgesehen, den Therapieerfolg ebenfalls durch die optische Darstellung apoptotischer Zellen nachzuweisen. Hierfür konnte im Rahmen einer Kooperation mit CARIM (Maastricht) das fluoreszierende Annexin A5-Alexa Fluor 750 (AV-AF750)-Konstrukt genutzt werden. Die Ergebnisse der beschriebenen Methoden zur Evaluierung der Behandlungseffekte sollten anschließend miteinander und mit den makroskopisch erfassbaren Parametern, wie z.B. der Messung der Tumorgöße mittels Schieblehre, verglichen werden. Nach Therapieabschluss war der Nachweis der EGFR-Expression *in vivo* vorgesehen, um die Kontinuität der Rezeptorexpression auch nach der Behandlung darzustellen und die Möglichkeit der Herunterregulierung des Rezeptors im Verlauf der Therapie auszuschließen. Die Etablierung der optischen Erfassung von Therapieerfolgen im lebenden Organismus trägt wesentlich zur Verbesserung weiterer präklinischer Studien zur Untersuchung der Wirksamkeit verschiedener Therapeutika *in vivo* bei. Sie kann anschließend schnell auf unterschiedliche Tumormodelle übertragen werden, was die Evaluierung zukünftiger Therapeutika vereinfacht und beschleunigt. In Abbildung 5 ist die Strategie zur Erreichung der Zielsetzung der vorliegenden Arbeit noch einmal veranschaulicht.

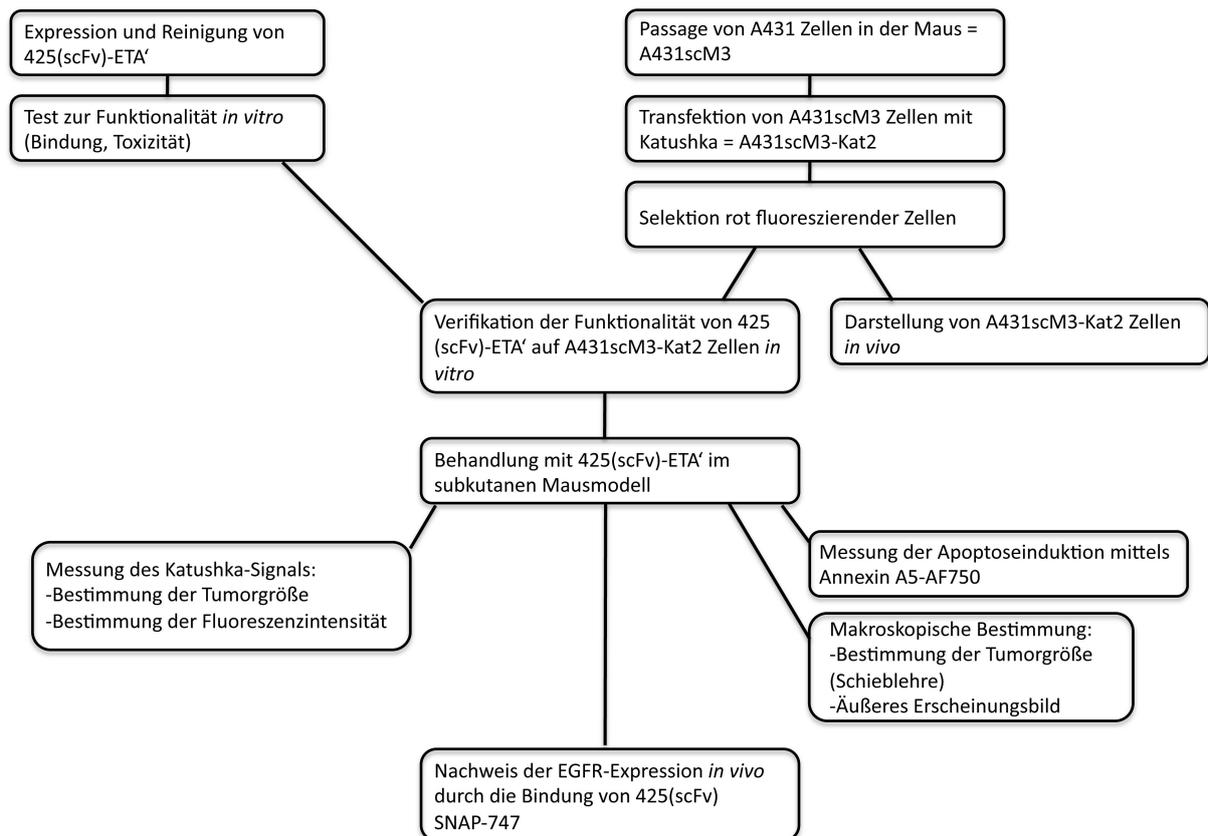


Abbildung 5: Flussdiagramm zur Veranschaulichung der Vorgehensweise in dieser Arbeit.

2 Material und Methoden

2.1 Geräte und Verbrauchsmaterialien

2.1.1 Geräte

Autoklaven	Varioklav H+P 75S (Thermo Electron Corporation, Oberschleißheim)
„Crossflow“	Ultrafiltrationskassette Viva Flow 200 (Sartorius) & Pumpe (Masterflex [®] L/S [™])
Durchflusszytometer	FACSCalibur (BECTON DICKINSON, Heidelberg)
Eismaschine	Icematic D201 (Castel Mac, Castelfranco Veneto, Italy)
Elektrophorese	„Mini-PROTEAN 3Electrophoresis System“ & „Mini Trans-Blot Cell“ für Proteinarbeiten (Bio-Rad, CA, USA)
„ELISA Reader“	ELx808 (BioTek, Winooski, VT, USA)
FPLC	ÄKTA FPLC (General Electric, Willich)
Heizblock	QBT (Grant, Berlin)
Inkubatoren	Function Line Typ UT12 (Heraeus, Hanau), CO ₂ -Inkubator mit Heißluftsterilisation CB 210 (Binder, Tuttlingen)
<i>In vivo</i> „Imager“	Maestro [™] System (CRi Inc., Woburn, MA, USA)
Laborabzüge	mc6-Laborabzüge (Waldner, Wangen)
Mikroskop	Fluoreszenz-Mikroskop (Leica, Bensheim)
MilliQ-Anlage	Membra-Pure Reinstwasseranlage mit einer MemCap1 mit 0,2 µm PES
pH-Meter	Basic Meter PB-11 (Sartorius, Göttingen)

Photodokumentation	„Gel Doc XR System“ (Bio-Rad, CA, USA), HP Scanjet 4890 (Hewlett Packard, Böblingen)
Photometer	Biophotometer (Eppendorf, Wesseling-Berzdorf)
Pipettierhilfen	Transferpette -8/-12 electronic (Brand, Voerde-Friedrichsfeld), CellMate II Pipettus (Matrix, über Szabo-Scandic, Wien), Multipette® plus (Eppendorf, Wesseling-Berzdorf), Pipetman Starter Kit (Gilson, WI, USA)
Schüttel- und Mixgeräte	Vortex-Genie 2 (Scientific Industries, über Roth, Karlsruhe), Magnetrührer RCT basic (IKA, Staufen), Thermomixer „comfort“ und „compact“ (Eppendorf, Wesseling-Berzdorf), CMV Überkopfrator, Intelli-Mixer RM 2L (LTF Labortechnik, Wasserburg)
Sterilbänke	Biowizard 2 MSC (Kojair, Berkshire, UK) mit dem Gasprofi 2 (WLD-TEC, Göttingen), Herasafe Typ HS-9 (Heraeus, Hanau)
Thermokonstanträume	Krum-Schröder /Pfeiffer
Waagen	Präzisions- und Analysewaagen der Reihe Talent: TE6101, TE64, TE31025, TE12000 (Sartorius, Göttingen)
Waschzentrifuge	Dade Serocent Waschzentrifuge (Dade, Liederbach)
Wasserbäder	TW20 Wasserbäder (Julabo, Seelbach)
Zellzähler	Casy1 Cell Counter (Schärfe System, Reutlingen)

Zentrifugen	Eppendorf-Tischzentrifuge 5415D und 5415R (Eppendorf, Wesseling-Berzdorf), Multifuge 1S und 3S-R (Heraeus, Hanau), neoLab Mikrozentrifuge, Biofuge Primo R (Heraeus, Hanau), PICO Fuge (Stratagene, Amsterdam, The Netherlands), Mikrozentrifuge AL (Roth, Karlsruhe), Rotilabo-Zentrifuge mit Butterfly-Rotor (Roth, Karlsruhe)
-------------	--

2.1.2 Verbrauchsmaterialien

FACS-Röhrchen	BECTON DICKINSON, Heidelberg
Faltenfilter, 125 mm Ø	Macherey-Nagel, Düren
HiTrap-Sephadex-Säulen	Amersham, NJ (USA)
Polyethersulfon-Membran, 30 kDa (für Ultrafiltration)	Sartorius, Göttingen
Protran-Nitrozellulose-Transfer-Membran, 0,45 µm Ø	Whatman Schleicher & Schuell über Labomedic, Bonn
Spritzenfilter steril, 0,45 µm & 0,22 µm	Roth, Karlsruhe
Whatman-Papier	Whatman Schleicher & Schuell, über Labomedic, Bonn

Alle weiteren Geräte und Verbrauchsmaterialien entsprachen dem üblichen Laborstandard.

2.2 Feinchemikalien

„2-Log DNA Ladder“-Marker	New England Biolabs, Frankfurt/Main
β-Mercaptoethanol	Invitrogen, Karlsruhe
Agar-Agar	Roth, Karlsruhe
Agarose	Invitrogen, Karlsruhe
Ampicillin	Sigma, München
Ammoniumperoxodisulfat	Roth, Karlsruhe

BCip	Roth, Karlsruhe
BG-747	Covalys, Witterswil
Brilliant Blau R-250	Roth, Karlsruhe
„Broad Range Prestained Protein“-Marker	New England Biolabs, Frankfurt/Main
Bromphenolblau	Roth, Karlsruhe
BSA	Roth, Karlsruhe
Calciumchlorid-Dihydrat ($\text{CaCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$)	Merck, Darmstadt
Dimethylformamid	Roth, Karlsruhe
Dinatriumphosphat (Na_2HPO_4)	Roth, Karlsruhe
D-PBS	Invitrogen, Karlsruhe
Doxorubicin (Ribodox™)	Apotheke Uniklinik, Aachen
Essigsäure	Roth, Karlsruhe
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Roth, Karlsruhe
Ethidiumbromidlösung (EtBr)	Roth, Karlsruhe
Fötale Kälberserum (FKS)	Biochrom, Berlin
Geneticin	Nalgene
Glycerol	Roth, Karlsruhe
Glycin	Roth, Karlsruhe
Hefeextrakt	Roth, Karlsruhe
Imidazol	Roth, Karlsruhe
Kaliumacetat	Roth, Karlsruhe
Kaliumchlorid (KCl)	Roth, Karlsruhe
Kaliumdihydrogenphosphat (KH_2PO_4)	Roth, Karlsruhe
Kanamycin	Sigma, München
Mangan(II)-chlorid-Tetrahydrat ($\text{MnCl}_2 \cdot 4 \text{H}_2\text{O}$)	Roth, Karlsruhe
Methanol	Roth, Karlsruhe
MOPS	Roth, Karlsruhe
Natriumchlorid (NaCl)	Roth, Karlsruhe
Natriumdihydrogenphosphat-Monohydrat (NaH_2PO_4)	Roth, Karlsruhe
NBT	Roth, Karlsruhe
Ni-NTA-Agarose	QIAGEN, Hilden

Orange G	Sigma, München
Penicillin/Streptomycin-Lösung	Invitrogen, Karlsruhe
Phenanzin-N'-Methylsulfat	Sigma, München
Propidiumiodid	Calbiochem, über Merck, Darmstadt
Roti [®] -Block Lösung	Roth, Karlsruhe
Roti [®] -Fect	Roth, Karlsruhe
Rotiphorese [®] Gel 30	Roth, Karlsruhe
RPMI 1640 Glutamax	Invitrogen, Karlsruhe
Rubidiumchlorid (RbCl ₂)	Roth, Karlsruhe
SDS ultra pure	Roth, Karlsruhe
SIGMAFast [™] DAB	Sigma, München
TEMED	Roth, Karlsruhe
Trichloressigsäure	Roth, Karlsruhe
Tris	Roth, Karlsruhe
Trypton Pepton	Roth, Karlsruhe
Tween 20	Roth, Karlsruhe
XTT (C ₂₂ H ₁₆ N ₇ NaO ₁₃ S ₂)	Sigma, München
Zeocin	Invitrogen, Karlsruhe

2.3 Biologisches Material

2.3.1 Enzyme

Restriktionsenzyme	New England Biolabs, Frankfurt/Main
TrypLE [™] Express	Gibco, über Invitrogen, Karlsruhe

2.3.2 Antikörper

Ziege anti-Maus („Goat-anti-mouse“) IgG (Fc spezifisch)	Sigma, München
-Alkalische Phosphatase, polyklonal (Gam ^{AP})	
Ziege anti-Maus („Goat-anti-mouse“) IgG	Sigma, München
-Peroxidase, polyklonal (Gam ^{PO})	

Maus anti-Histidin („Mouse-anti-polyHistidine“), monoklonal (anti-penta-His)	Sigma, München
Penta-His Alexa Fluor 488 Conjugate (anti-His-Alexa488)	QIAGEN, Hilden
Ziege anti-Maus („Goat-anti-mouse“) FITC (Gam ^{FITC})	Dianova, Hamburg

2.3.3 Plasmide

Die im Rahmen dieses Projektes verwendeten Vektoren sind im Folgenden, unter Angabe des einklonierten Konstruktes, tabellarisch aufgelistet (s. Tabelle 2-1).

Tabelle 1: Beschreibung wichtiger Vektoren.

Vektor	Konstrukt	Referenz / Bezugsquelle
pBM-425(scFv)-ETA'	425(scFv)-ETA'	(44; 82)
pMS-425(scFv)SNAP	425(scFv)SNAP	(83)
pMS-L-Annexin A5-EGFP-MH	Annexin A5-EGFP	(84)
pTag-Katushka2-N	Kat2	Evrogen

2.4 Medien und Anzuchtbedingungen

2.4.1 Medien und Anzuchtbedingungen von Bakterien

LB-Medium/-Agar (85)

1% (w/v) Trypton Pepton

1% (w/v) NaCl₂

0,5% (w/v) Hefeextrakt

1,5% (w/v) Agar (nur für Platten)

Gelöst wurden die Stoffe in Millipore-Wasser. Anschließend wurden sie autoklaviert.

Die Anzucht von *Escherichia coli* DH5 α fand in Flüssig-LB-Medium unter Selektionsdruck (25 μ g/ml Kanamycin) bei 37°C über Nacht (ÜN) in einem Über-Kopf-Schüttler statt. Die Ausplattierung erfolgte auf LB-Platten mit 25 μ g/ml Kanamycin.

Folgende Bakterien wurden im Rahmen dieses Projektes verwendet:

Tabelle 2: Verwendete Bakterienstämme unter Angabe ihres Genotypen.

Bakterienstamm	Genotyp	Referenz/ Bezugsquelle
<i>E. coli</i> DH5 α	F'/endA1, hsdR17(rK ⁻ , mK ⁺), supE44, thi1, recA1, gyrA, (Nal ^r), relA	Invitrogen
<i>E. coli</i> Rosetta 2 DE3	F ⁻ <i>ompT</i> <i>hsdS</i> _B (r _B ⁻ m _B ⁻) <i>gal</i> <i>dcm</i> (DE3) pRARE2 (Cam ^R)	Novagen

E. coli DH5 α diente der Vermehrung und Isolierung von Plasmid-DNA. *E. coli* Rosetta 2 DE3 eignete sich als Expressionsstamm für die Produktion von 425(scFv)-ETA'.

2.4.2 Medien und Anzuchtbedingungen von eukaryotischen Zellen

RPMI-Medium

RPMI1640-Medium

50 μ g/ml Penicillin

50 μ g/ml Streptomycin

2 mM L-Glutamin

Die Arbeiten mit Zellkulturen erfolgten unter Einhaltung der allgemeinen Regeln des sterilen Arbeitens (86). Die Kultur der eukaryotischen Zellen fand bei 37°C in einer humiden Atmosphäre und 5% CO₂ statt. Die Ausgangszellen wurden in RPMI-Medium, supplementiert mit 10% (v/v) FKS, kultiviert. Die mit pMS-425(scFv)SNAP und pMS-L-Annexin A5-EGFP-MH (2.3.3) transfizierten 293T-Zellen wurden zusätzlich mit einem Selektionsdruck von 100 μ g/ml Zeocin angezogen.

Folgende Zelllinien wurden in Kultur gehalten:

Tabelle 3: Verwendete Zelllinien und deren Ursprung.

Zelllinie	Ursprung	Wachstums- eigenschaften	Referenz bzw. ATCC-Nr.
A-431	Epidermoides Karzinom	adhärent wachsend	CRL-1555 TM
A431scM3	Epidermoides Karzinom, isoliert aus einem subkutanen Tumor aus der Maus	adhärent wachsend	
L3.6pl	Pankreaskarzinom, Ursprungszelllinie FG, isoliert aus Lungenmetastasen in der Maus	adhärent wachsend	(87)
L3.6pl-GFP	L3.6pl Zellen, transfiziert mit maxGFP	adhärent wachsend	(99)
Capan-1	Pankreaskarzinom, isoliert aus Lebermetastasen	adhärent wachsend	HTB-79 TM
SU.86.86	Pankreaskarzinom, isoliert aus Lebermetastasen	adhärent wachsend	CRL-1837
BxPC-3	Pankreaskarzinom	adhärent wachsend	CRL-1687 TM
S2-0028	Pankreaskarzinom	adhärent wachsend	Universität Ulm
L540	Hodgkin-Lymphom	Suspensionszellen	(88)
293T	Humane, embryonale Nierenzellen	adhärent wachsend	CRL-11268 TM

2.5 Molekularbiologische Methoden

Die gentechnischen Arbeiten wurden am Fraunhofer IME in der gentechnischen Anlage 64-K-1.50/05 (Genehmigungsnummer 64-K-1.19/01) durchgeführt.

2.5.1 Transfektion eukaryotischer Zellen

Die Transfektion von A431scM3 und L3.6pl Zellen (**Tabelle 3**) mit pTag-Katushka2-N (**Tabelle 1**) erfolgte mit Roti[®]-Fect, einem Reagenz zur liposomenvermittelten Transfektion eukaryotischer Zellen. Der Ansatz zur Transfektion setzte sich aus folgenden Komponenten zusammen:

- 1 µg DNA
- 5 µl Roti[®]-Fect
- 300 µl serumfreies RPMI-Medium

Die Zellen wurden am Tag zuvor in einer Dichte von $1 \cdot 10^4$ in die Vertiefungen einer Zwölf-Napf-Platte ausgesät. Der Transfektionsansatz wurde gemischt und 15 Minuten bei Raumtemperatur (RT) inkubiert. Anschließend wurde der Überstand von den ÜN inkubierten A431scM3 und L3.6pl Zellen abgenommen und durch den Transfektionsansatz ersetzt. Im Anschluss an eine vierstündige Inkubation bei 37°C und 5% CO₂ wurde der Transfektionsansatz abgenommen und 1 ml RPMI-Medium mit 10% (v/v) FKS hinzugegeben. Die Platte wurde drei Tage im Brutschrank inkubiert. pTag-Katushka2-N enthält das Geneticin-Resistenzgen. Transfizierte A431scM3-Kat2 und L3.6pl-Kat2 Zellen konnten im Weiteren unter 200 µg/ml Geneticin-Selektionsdruck in einer Zellkulturflasche mit einem Arbeitsvolumen von 15 – 38 ml kultiviert werden. Die Zellen konnten durch die rote Fluoreszenz mit Hilfe eines Fluoreszenzmikroskops (Leica, DM IL) visualisiert werden.

2.5.2 Fermentation von Bakterien

Um eine möglichst große Menge von 425(scFv)-ETA' für die *in vivo* Experimente bereitstellen zu können, wurde eine Fermentation in einem 4 l Rührfermenter durchgeführt. Dazu wurde der Fermenter mit 4 l synthetischem Medium befüllt und mit 50 ml einer ÜN-Kultur von *E. coli* Rosetta 2 DE3 Bakterien (**Tabelle 2**), welche zuvor mit pBM-425(scFv)-ETA' DNA (**Tabelle 1**) transformiert wurden, angeimpft. 18 Stunden nach IPTG Induktion wurde die Kultur abzentrifugiert und das 480 g schwere Pellet bei -80°C gefroren.

2.5.3 Lyse von Bakterien

Das Zellpellet aus der fermentierten Bakterienkultur (2.5.2) wurde in 960 ml kaltem, modifizierten PBS mit 300 mM NaCl resuspendiert. Anschließend wurden die Bakterien mit

Hilfe eines Hochdruckhomogenisators lysiert. Es wurden zwei Zyklen durchgeführt. Die Kultur wurde vor und nach der Lyse auf Eis gehalten.

2.6 Proteinchemische Methoden

2.6.1 Proteinreinigung mittels Ni-NTA-Immobilisierter-Metall-Affinitäts-Chromatographie

Alle Proteinreinigungen wurden aufgrund des vorhandenen Histidin-Motivs mittels Ni-NTA durchgeführt. Bei dieser Methode binden die Proteine über ihr Histidin-Motiv an die Nickel-Ionen einer Nitrilotriessigsäure (NTA) Matrix und können anschließend mit dem Histidinanalog Imidazol eluiert werden (89). Imidazol kompetiert mit den Proteinen um die Bindung.

4x Inkubationspuffer

200 mM NaH₂PO₄, pH 8,0

1,2 M NaCl₂

40 mM Imidazol

Elutionspuffer

50 mM NaH₂PO₄, pH 8,0

300 mM NaCl₂

250 mM Imidazol

Etwa 800 ml proteinhaltige Zellkulturüberstände (425(scFv)SNAP und Annexin A5-EGFP) bzw. ca. 1 l 425(scFv)-ETA' (Tabelle 1) in modifiziertem PBS mit 300 mM NaCl wurden über eine Ni-NTA-Immobilisierte-Metall-Affinitäts-Chromatographie (IMAC) gereinigt. Dazu wurden die im Überstand bzw. Lysat vorhandenen restlichen Zellen vor der Reinigung abzentrifugiert und der reine Zellüberstand entweder durch einen Faltenfilter oder mittels einer Filtrationsvorrichtung (Porengröße: 1 µm) filtriert. Die filtrierten Zellüberstände wurden anschließend mit einem Drittel des 4x Inkubationspuffers versetzt.

Für die Reinigung der Zellkulturüberstände wurde eine 5 ml HiTrap-Sephadex Säule verwendet. Diese wurde nach Anschluss an eine „Äkta Purifier“ FPLC zunächst mit 1x Inkubationspuffer gewaschen, bis sich die Flussrate auf eine stabile Lage eingependelt hat und der Probenauftrag stattfinden konnte. Vor der vollständigen Elution wurde die Säule mit 5 Säulenvolumen 5% Elutionspuffer (verdünnt mit Inkubationspuffer) gespült, um unspezifisch gebundene Proteine herunterzuspülen. Zur Elution des Zielproteins wurde anschließend 100% Elutionspuffer auf die Säule gegeben.

Für die Reinigung des Bakterienlysats wurde eine „Streamline“ IMAC Säule verwendet. Nach dem Probenauftrag wurde diese mit modifiziertem PBS (300 mM NaCl) mit 10 mM, 20 mM und 30 mM Imidazol gewaschen, bevor mit modifiziertem PBS (300 mM NaCl) mit 500 mM Imidazol eluiert wurde.

2.6.2 Proteinreinigung mittels Anionenaustauschchromatographie

Das mit der IMAC erhaltene 425(scFv)-ETA' enthaltende Eluat (2.6.1) wurde über eine Anionenaustauschchromatographie weiter aufgetrennt. Hierbei kommt es durch den Einsatz einer stationären Säulen-Matrix mit positiv geladenen Gruppen zu einer Bindung des negativ geladenen Proteins. Dies kann anschließend durch die sukzessive Erhöhung der Ladungsstärke einer Lösung wieder eluiert werden. Je stärker dabei ein Protein an die Matrix gebunden ist, desto langsamer löst es sich, so dass eine Trennung aufgrund der unterschiedlichen Ladungsstärke der Proteine in dem Gemisch entsteht.

Das Eluat aus der IMAC wurde zunächst in 10 mM Tris, 25 mM NaCl umgepuffert. Das Volumen wurde auf 40 ml aufgefüllt und auf eine 5 ml XK1620 Säule mit Q-Sepharose FF Matrix (GE Healthcare) gegeben. Eluiert wurde in mehreren Schritten mit 10 mM Tris mit 50 mM, 100 mM, 150 mM, 200 mM, 250 mM, 300 mM, 400 mM und 500 mM NaCl. Das Eluat jeder eingesetzten Salzkonzentration wurde separat aufgefangen.

2.6.3 Proteinreinigung mittels Gelfiltrationschromatographie

Mit Hilfe der Gelfiltrationschromatographie wurde das aus der Anionenaustauschchromatographie erhaltene 425(scFv)-ETA' enthaltende Eluat (2.6.2) einem letzten Reinigungsschritt unterzogen. Bei dieser chromatographischen Methode werden die Proteine ihrer Größe nach aufgetrennt. Große Proteine passieren hierbei zuerst die Matrix, während kleinere Proteine in den unterschiedlich großen Poren vorübergehend hängen bleiben.

Für die Trennung des Proteingemischs wurde eine 120 ml XK70 Säule mit Superdex 75 Matrix (GE Healthcare) eingesetzt. Die Probe wurde zuvor auf 6 ml konzentriert und in A. dest umgepuffert. Die Elution erfolgte in 2 ml Fraktionen. Die reinen 425(scFv)-ETA' haltigen Fraktionen wurden für die Langzeitlagerung lyophilisiert und bei -20°C eingefroren.

2.6.4 SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese

4% (v/v) Sammelgel (85)

3,6 ml A. dest
 625 µl Tris-Stock (1 M, pH 6,8)
 830 µl Acrylamid-Stock, 30%
 („Rotiphorese® Gel 30”)
 50 µl SDS (10%)
 5 µl TEMED
 15 µl APS (20%)

12% (v/v) Trenngel (85)

2,1 ml A. dest
 3,75 ml Tris-Stock (1 M, pH 8,8)
 4 ml Acrylamid-Stock, 30%
 („Rotiphorese® Gel 30”)
 100 µl SDS (10%)
 10 µl TEMED
 30 µl APS (20%)

TGS-Puffer (1x) (85)

25 mM Tris-HCl
 192 mM Glycin
 0,1% (w/v) SDS

Ladepuffer (5x)

62,5 mM Tris-HCl, pH 6,8
 30% (v/v) Glycerin
 4% (w/v) SDS
 10% (v/v) β-Mercaptoethanol
 0,05% (w/v) Bromphenolblau
 A. dest (steril)
 Die Lagerung des Ladepuffers erfolgte bei RT.

Zur Überprüfung der gereinigten Proteine (2.6.3) wurden diese in einer denaturierenden SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese (SDS-PAGE) aufgetrennt (90). Dazu wurde ein Acrylamid-Anteil von 12% (v/v) verwendet. Die Gele setzten sich aus einem Sammel- und einem Trenngel zusammen, was eine saubere Trennung der Proteine gewährleistet.

Die Proteinproben wurden zur Trennung auf dem Gel zuvor 5:1 mit Ladepuffer versetzt und unmittelbar vor der Trennung fünf Minuten bei 100°C gekocht.

Als Laufpuffer wurde 1x TGS-Puffer verwendet und der Gellauf bei 150 V für eine Stunde in einer Bio-Rad Protean-II-Zelle nach Angaben des Herstellers durchgeführt.

Zum Vergleich der Größen der aufgetrennten Proteine wurde ein vorgefärbter Proteinmarker („Broad Range Prestained Protein“ Marker, NEB) verwendet.

2.6.5 Western Blot zum Nachweis gereinigter Proteine durch Antikörperbindung

<u>1x Transfer Puffer (85)</u>	<u>PBS(T), pH 7,4 (85)</u>
25 mM Tris-HCl, pH 8,3	137 mM NaCl
192 mM Glycin	2,7 mM KCl
20% (v/v) Methanol	8,1 mM Na ₂ HPO ₄ · 12 H ₂ O
0,05% (w/v) SDS	1,5 mM KH ₂ PO ₄
A. dest	(0,05% (v/v) Tween20)

NBT/BCip

3,33% (w/v) NBT
 1,65% (w/v) BCip
 Dimethylformamid

Um die auf einem SDS-Polyacrylamid Gel (2.6.4) aufgetrennten gereinigten Proteine mit verschiedenen Antikörpern spezifisch nachzuweisen, wurden die Proteinbanden von dem Gel auf eine Nitrozellulose Membran transferiert (91). Hierzu ist die „Mini-Protean II-Modul“ Kammer von Bio-Rad mit 1x Transfer Puffer verwendet worden.

Der Transfer wurde in Anlehnung an das zugehörige Protokoll 70 Minuten bei 350 mA durchgeführt. Anschließend wurde die Membran eine Stunde in Roti®-Block Lösung (Roth) unter Schütteln inkubiert, um unspezifische Bindungsstellen abzusättigen. Nach Waschen in PBST konnte die Membran mit dem ersten Antikörper (anti-penta-His, 1:5000 verdünnt in PBST) bei RT auf dem Schüttler ebenfalls 30 Minuten bis eine Stunde inkubiert werden. Anschließend wurde wieder gewaschen und der zweite Antikörper (Gam^{AP} oder Gam^{PO}, je 1:5000 verdünnt in PBST) auf die Membran gegeben. Die Inkubation erfolgte wieder 30 Minuten bis eine Stunde auf dem Schüttler. Schließlich wurde die Membran, nachdem sie mit PBST gewaschen wurde, mit dem Substrat NBT/BCip für die alkalische Phosphatase oder SIGMAFast™ (Sigma) für die Peroxidase inkubiert. Die Umsetzung des Substrats geschah innerhalb weniger Minuten im Dunkeln.

2.6.6 Coomassie-Färbung von SDS-Polyacrylamid Gelen

Coomassie Brilliant Blau (85)

0,25% (w/v) Coomassie Brilliant Blau R-250

50% (v/v) Methanol

→ 1 Stunde rühren

9% (v/v) Essigsäure (Eisessig)

→ durch „Whatman“-Papier filtrieren

Coomassie-Entfärbelösung (85)

5% (v/v) Methanol

7,5% (v/v) Essigsäure

Zur Proteindetektion auf SDS-Polyacrylamid Gelen (2.6.4) wurden die Gele zur Anfärbung mindestens 15 Minuten in 50 ml Coomassie Brilliant Blau gelegt und anschließend mit Coomassie-Entfärbelösung entfärbt. Danach konnten die entfärbten Gele fotografiert werden.

2.6.7 Proteinkonzentrationsbestimmung durch einen Bradford-Assay

Nach der Reinigung der Proteine konnte die enthaltene Menge an Gesamtprotein in einem Bradford-Assay bestimmt werden (92). Dazu wurde zunächst ein BSA-Standard in eine 96-Napf-Mikrotiterplatte pipettiert. Dieser bestand aus einer Reihe von 0,5 µg bis 10 µg BSA. Danach wurden 5 oder 10 µl der zu messenden Proben in die Vertiefungen darunter pipettiert. Schließlich wurde sowohl zu der Standardreihe, als auch zu den zu messenden Proben jeweils 200 µl Roti®-Nanoquant (1:5 verdünnt mit A. dest.) gegeben. Je stärker die Proteinkonzentration war, desto stärker war der Farbumschlag von dunkelrot nach blau. Anschließend wurde die Extinktion bei 630 nm im „ELISA Reader“ gemessen. Die Auswertung der Daten anhand der BSA-Standardreihe erfolgte mit Microsoft Excel.

2.6.8 Durchflusszytometrische Analysen

Zur Überprüfung der Bindungsaktivität von 425(scFv)-ETA' und zur Messung der EGFR-Expression auf den verschiedenen Pankreaskarzinomzelllinien (**Tabelle 3**) mittels EGF-SNAP⁶⁴⁷ wurden Bindungsanalysen in einem Durchflusszytometer durchgeführt.

Das Prinzip beruht auf einem Flüssigkeitssystem, welches die Zellen in einem Laserstrahl fokussiert. Je nach Größe und Granularität einzelner Zellen verändert sich die Vorwärtsstreuung bzw. die Seitwärtsstreuung des kohärenten Laserlichtes. Durch Zugabe eines Fluoreszenz-markierten Antikörpers, welcher direkt oder indirekt an die zu messenden Zellen bindet, wird entsprechend der verwendeten Farbstoffe Licht definierter Wellenlängen

emittiert. Die rechnergestützte Visualisierung im Emissionsspektrum der Proben ist proportional zur Bindung der Antikörper an die jeweiligen Zellen.

Zunächst wurde eine Zellzählung in einem Zellzähler vorgenommen, um je Ansatz $5 \cdot 10^5$ Zellen einsetzen zu können. Diese wurden in „Fluorescence activated cell sorting“ (FACS)-Röhrchen pipettiert und mit PBS in der Waschzentrifuge gewaschen. Anschließend wurde ca. 1 µg des gereinigten Proteins in 200 µl PBS hinzupipettiert und für ca. 45 min. auf Eis inkubiert, bevor wieder mit PBS in der Waschzentrifuge gewaschen wurde. Zu den Ansätzen wurde nun anti-His-Alexa488 (1:100), oder anti-penta-His (1:250) als Erstantikörper und Gam^{FITC} (1:250) als Zweitantikörper gegeben. Die Inkubation erfolgte auf Eis im Dunkeln. Es wurde zweimal mit PBS in der Waschzentrifuge gewaschen. Nach Zugabe von 500 µl PBS konnten die Ansätze mit dem Programm „CellQuest“ von BECTON DICKINSON, Heidelberg (Version 3.3) im Durchflusszytometer gemessen werden. L3.6pl-Kat2 und A431scM3-Kat2 Zellen (2.5.1) sowie die mit EGF-SNAP⁶⁴⁷ inkubierten Pankreaskarzinomzellen konnten direkt ohne Antikörperzugabe im Durchflusszytometer detektiert werden. Die Auswertung und Erstellung der Histogramme wurde mit „WinMDI“ (Version 2.8) durchgeführt.

2.6.9 Fluorescence Activated Cell Sorting

Die direkt nach Transfektion (2.5.1) mit pTag-Katushka2-N (Tabelle 1) erhaltenen A431scM3-Kat2 sowie L3.6pl-Kat2 Zellpopulationen sind mit einem FACSVantage Zellsortierer (Becton Dickinson) anhand ihrer roten Fluoreszenz weiter angereichert worden. Dazu wurden die Zellen zunächst in ein FACS-Röhrchen pipettiert. Die Sortierung erfolgte in RPMI-Medium (mit 10% (v/v) FKS) enthaltende Zwölf-Napf-Platten. Es wurden 2000 Zellen pro Napf ausgesäht. Die Platten wurden anschließend in einem Brutschrank bei 37°C und 5% CO₂ kultiviert und die Zellen nach ca. drei Wochen in eine Zellkulturflasche umgesetzt.

2.6.10 XTT-basierter Zellviabilitätsassay

Zur Bestimmung der Toxizität von 425(scFv)-ETA' auf verschiedenen Zelllinien wurde ein XTT-basierter Zellviabilitätsassay durchgeführt. Dabei wird das gelbe Tetrazoliumsalz XTT von lebenden Zellen in einen orangenen Formazanfarbstoff umgesetzt, welcher im Photometer ausgelesen werden kann.

Für den Assay wurde jeder Napf einer 96-Napf-Mikrotiterplatte mit 50 µl RPMI-Medium, supplementiert mit 10% (v/v) FKS, bestückt. Anschließend wurden 200 ng des gereinigten

Proteins (2.6.3), Zeocin oder PBS in einer Dreifachbestimmung hinzugegeben und eine 1:5 Verdünnungsreihe pipettiert. Es wurden $5 \cdot 10^3$ der jeweiligen Zellen zu jedem Napf hinzugegeben und die Platte für drei Tage bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. Anschließend wurde zu jedem Napf XTT + Phenazin (Serva) nach Herstellerangaben pipettiert und nach zwei- bis vierstündiger Inkubation bei 37°C und 5% CO₂ die Extinktion bei 450 - 630 nm im „ELISA Reader“ gemessen.

2.6.11 Annexin-Assay

10x Annexin-Puffer

0,1 M HEPES-NaOH, pH 7,4

1,4 M NaCl

25 mM CaCl₂

Zum Nachweis der Apoptose von A431scM3-Kat2 Zellen (2.5.1) nach Inkubation mit dem IT 425(scFv)-ETA' (Tabelle 1) wurde ein Annexin-Assay durchgeführt. Der Versuch basiert auf Anfärbung des Membranphospholipids PS, welches in einem frühen Stadium der Apoptose durch Membranstülpung nach außen gerichtet wird. Eine zusätzliche Propidiumiodid (PI)-Färbung ermöglicht die Unterscheidung von früh und spät apoptotischen Zellen.

Für den Versuch wurden pro Ansatz $5 \cdot 10^5$ Zellen in 3 ml RPMI-Medium, supplementiert mit 10% (v/v) FKS, in die Vertiefungen einer Sechs-Napf-Platte pipettiert. Anschließend wurden 5, 10, 20 oder 40 µg 425(scFv)-ETA' (2.6.3), 40 µl PBS bzw. 50 µl Zeocin oder Camptothecin hinzugegeben und ÜN bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Zellen vorsichtig trypsiniert, mitsamt dem Überstand in FACS-Röhrchen pipettiert und in der Waschzentrifuge mit 1x Annexin-Puffer gewaschen. Es wurden 450 µl Annexin A5-EGFP haltiger, steriler Zellkulturüberstand und 50 µl 10x Annexin-Puffer hinzugegeben und die Zellen zehn Minuten bei RT inkubiert. Danach wurden sie erneut in der Waschzentrifuge mit 1x Annexin-Puffer gewaschen und in jeweils 500 µl 1x Annexin-Puffer + 1 µg/ml PI aufgenommen. Schließlich konnten die Ansätze mit dem Programm „CellQuest“ von BECTON DICKINSON, Heidelberg (Version 3.3) im Durchflusszytometer gemessen werden. Die Auswertung und Erstellung der Histogramme wurde mit „WinMDI“ (Version 2.8) durchgeführt.

2.6.12 Markierung von SNAP-Fusionen

Für den Einsatz von 425(scFv)SNAP (Tabelle 1) für die Bindungsanalysen *in vivo* musste das Konstrukt vorher mit dem Farbstoff BG-747 (Covalys) markiert werden. Hierfür wurden 219 µg (4,38 nmol) 425(scFv)SNAP mit einem 1,5 molaren Überschuss an BG-747 Farbstoff (= 6,57 nmol) gemischt. Die Inkubation erfolgte eine Stunde bei RT und anschließend ÜN bei 4°C, jeweils im Dunkeln. Anschließend wurde der Ansatz ÜN bei 4°C gegen PBS dialysiert, um nicht gebundenen Farbstoff abzutrennen und die Kopplungseffizienz nach Angaben des Herstellers bestimmt.

2.7 *In vivo* Versuche

Alle durchgeführten Tierversuche wurden vom Landesamt für Natur, Umwelt und Verbraucherschutz Nordrhein-Westfalen (LANUV) genehmigt (Genehmigungsnummer: 8.87-51.04.20.09.315).

In allen durchgeführten *in vivo* Experimenten wurden Balb/c nu/nu Mäuse eingesetzt. Ihnen fehlt aufgrund einer unvollkommenen Entwicklung des Thymus die T-Zell-basierte Immunität. Aus diesem Grund eignen sich Balb/c nu/nu Mäuse für die Implantation humaner Zellen.

2.7.1 Rekultivierung von A-431 Zellen aus der Maus

Den Mäusen (2.7) wurden $2 \cdot 10^6$ A-431 Zellen (Tabelle 3) s.c. appliziert. Nach zwölf Tagen des Tumorwachstums wurden die Mäuse geopfert, der Tumor heraus präpariert und zerteilt. Diese Teilstücke konnten anschließend in RPMI-Medium, supplementiert mit 10% (v/v) FKS, weiterkultiviert werden. Nach ca. einer Woche waren einzelne, angewachsene Zellen sichtbar.

2.7.2 Darstellung fluoreszierender Tumorzellen

Den Tieren (2.7) wurden $1 \cdot 10^5$ L3.6pl-GFP (Tabelle 3) und L3.6pl-Kat2 bzw. $5 \cdot 10^6$ A431scM3-Kat2 Zellen (2.5.1) s.c. appliziert. Das jeweilige Tumorwachstum war im Fall der transfizierten L3.6pl Zellen nach acht Tagen und im Fall der A431scM3-Kat2 Zellen nach elf Tagen von außen erkennbar.

2.7.3 Behandlung mit 425(scFv)-ETA' und Doxorubicin

Den Tieren (2.7) wurden $5 \cdot 10^6$ A431scM3-Kat2 Zellen (2.5.1) s.c. appliziert. Sobald die Tumoren von außen sichtbar waren (elf Tage nach Implantation der Zellen) wurden die Tiere in drei Gruppen zu je sechs Mäusen eingeteilt und das erste Mal behandelt (Behandlungstag 0). Dazu wurde ihnen 10 μg 425(scFv)-ETA' (2.6.3) in PBS (Injektionsvolumen 50 μl), 100 μg Doxorubicin (Ribodox™) oder 50 μl PBS i.v. durch retrobulbäre Injektion verabreicht. Behandelt wurde an Tag 0, 1, 3 und 5 (erster Behandlungszyklus) und Tag 17, 18, 20 und 22 (zweiter Behandlungszyklus). Die Messungen im *in vivo* „Imager“ (1.3.3) wurden an den Behandlungstagen sowie außerhalb der Zyklen zwei mal wöchentlich mit dem gelben Filter (630 – 850 nm) vorgenommen. Des Weiteren wurden die Tiere täglich gewogen und die Tumoren mit der Schieblehre ausgemessen. Für die Applikationen von 425(scFv)-ETA', Doxorubicin und PBS und die Messungen im *in vivo* „Imager“ wurden die Tiere anästhesiert.

2.7.4 Messung der Apoptoseinduktion

Für die Messung der Apoptose *in vivo* wurde das Konstrukt AV-AF750 verwendet, welches von CARIM (Maastricht) bereitgestellt wurde. 24 Stunden nach 425(scFv)-ETA'- bzw. PBS-Applikation wurde den L3.6pl-GFP (Tabelle 3) und L3.6pl-Kat2 (2.5.1) tragenden Mäusen 50 μg AV-AF750 (Injektionsvolumen 50 μl) i.v. retrobulbär verabreicht. Die Fluoreszenz wurde 10 Stunden, 24 Stunden und 48 Stunden nach AV-AF750 Applikation im *in vivo* „Imager“ mit dem dunkelroten Filter (820 - 880 nm) gemessen. Den A431scM3-Kat2 (2.5.1) tragenden Mäusen wurden an Tag 2 während des ersten Behandlungszyklus 50 μg einer modifizierten Variante von AV-AF750 i.v. durch retrobulbäre Injektion verabreicht. Die Messung im Maestro™ System erfolgte 24 Stunden, 72 Stunden sowie 8 Tage später mit dem gelben (630 – 850 nm) und dem dunkelroten Filter (730 - 950 nm).

2.7.5 Bindungsanalysen von 425(scFv)SNAP-747

Für die Bindungsanalysen mit 425(scFv)SNAP-747 wurde gereinigtes (2.6.1), frisch markiertes Protein verwendet (2.6.12). Den Tieren wurden 0,75 nmol von 425(scFv)SNAP-747 i.v. durch retrobulbäre Injektion verabreicht. Die Messung im *in vivo* „Imager“ (1.3.3) erfolgte vor und zehn Stunden nach der Applikation mit dem gelben Filter (630 – 850 nm) zur Detektion des Kat2 Signals und dem dunkelroten Filter (730 – 950 nm) zur Detektion des 425(scFv)SNAP-747 Signals.

2.8 Computergestützte Methoden

2.8.1 Analysen der *in vivo* Versuche

Die Auswertungen der Messungen im CRi Maestro™ System (1.3.3) wurden mit dem Programm „Maestro“ (Version 2.6.0) durchgeführt.

2.8.2 Digitale Bildbearbeitung

Eine Bearbeitung der in dieser Arbeit abgebildeten Bilder erfolgte mit dem Programm „Adobe Photoshop CS4“ (Version 11.0.2).

3 Ergebnisse

Im Rahmen dieser Arbeit wurde das rot fluoreszierende Protein Kat2 eingesetzt, um Behandlungserfolge im lebenden Organismus mittels molekularer Bildgebung dokumentieren zu können. Im Gegensatz zu herkömmlichen Methoden der Evaluierung von Krankheitsbildern und Behandlungseffekten bietet die molekulare Bildgebung die Möglichkeit der optischen Darstellung von Echtzeit-Aufnahmen. Hierbei ist die Voraussetzung zur kontinuierlichen Beobachtung von Therapieeffekten gegeben, wodurch eine bessere Kontrolle sowie Evaluierung der Behandlung möglich ist.

Mit der Verwendung fluoreszierender, s.c. implantierter Tumorzellen wurde die Wirksamkeit des bereits beschriebenen IT 425(scFv)-ETA' getestet. Die Funktionalität von 425(scFv)-ETA' konnte nach einer präventiven Verabreichung *in vivo* bereits gezeigt werden und war somit geeignet für die Etablierung der Darstellung des Therapieerfolgs (45). Dies geschah durch die Beobachtung und Analyse verschiedener Parameter zu unterschiedlichen Zeitpunkten. Anhand des starken Fluoreszenzsignals der eingesetzten Tumorzellen wurde das Tumorwachstum während und über den Behandlungszeitraum hinaus bestimmt und mit der makroskopischen Messung der Tumorgöße mittels Schieblehre sowie der Beurteilung über die äußere Erscheinung des Tumors verglichen. Gleichzeitig wurde die Intensität der fluoreszierenden Tumorzellen gemessen. Der Einsatz von AV-AF750 diente der Darstellung apoptotischer Zellen.

3.1 Produktion des Immuntoxins 425(scFv)-ETA' für den Einsatz *in vivo*

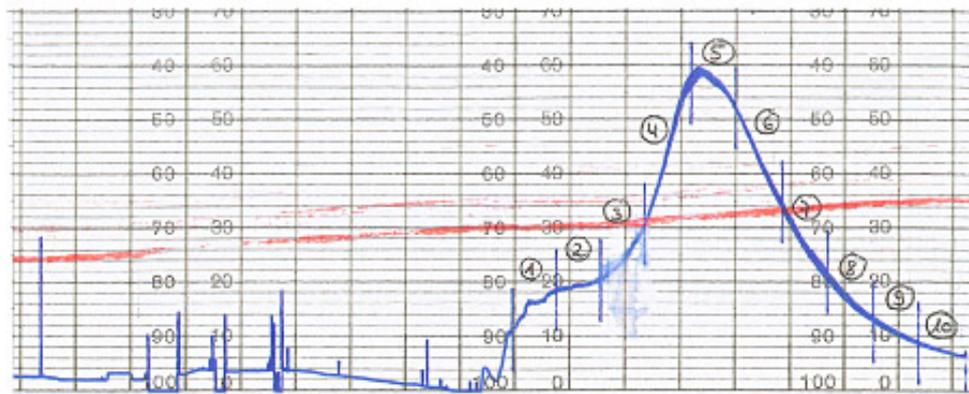
Für die Etablierung der optischen Darstellung von Behandlungseffekten durch die molekulare Bildgebung wurde das in unserer Arbeitsgruppe bereits beschriebene Konstrukt 425(scFv)-ETA' verwendet. 425(scFv)-ETA' ist ein gegen den EGFR gerichtetes IT, dessen grundsätzliche Effektivität in einem präklinischen *in vivo* Modell auf Lungenmetastasen des Pankreaskarzinoms bereits gezeigt worden ist (45).

3.1.1 Fermentation und Reinigung des Immuntoxins 425(scFv)-ETA'

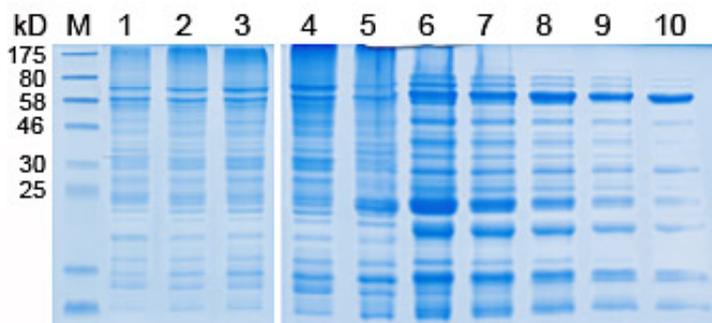
Um für die Bestätigung der Effektivität *in vitro* und die nachfolgenden *in vivo* Experimente eine genügende Proteinmenge bereitstellen zu können, wurde der ursprüngliche 425(scFv)-ETA' Klon in einem 4 l Rührfermenter exprimiert (2.5.2) und das Pellet von 480 g in einem Hochdruckhomogenisator aufgeschlossen (2.5.3). Das anschließend umgepufferte Filtrat

wurde mittels einer Ni-NTA-Affinitätschromatographie gereinigt (2.6.1) und die gesammelten Fraktionen in einer SDS-PAGE aufgetrennt (2.6.4) und auf Nitrozellulose transferiert (Abbildung 6; 2.6.5).

A.



B.



C.



Abbildung 6: Reinigung von 425(scFv)-ETA' mittels Ni-NTA-Affinitätschromatographie.

Die erste Reinigung des Filtrats erfolgte durch eine Affinitätschromatographie mit einer mit Ni-NTA beladenen Matrix einer Chromatographiesäule (2.6.1). Nach dem Beladen der Säule mit dem Filtrat wurde mit einer steigenden Imidazolkonzentration gewaschen. Die Elution erfolgte mit 500 mM Imidazol in zehn Fraktionen. Diese wurden anschließend in einer SDS-PAGE (2.6.4) aufgetrennt und auf Nitrozellulose transferiert (2.6.5). A. Chromatogramm der Reinigung. Die Einteilung in die zehn gesammelten Fraktionen ist gekennzeichnet, B. Coomassie gefärbtes SDS Gel (2.6.6), C. Western Blot (2.6.5). Der Nachweis von 425(scFv)-ETA' in den Elutionsfraktionen erfolgte mit einem gegen das Histidin-Motiv gerichteten Antikörper und einem Gam^{PO} Zweitantikörper. Dieser wurde durch Zugabe des Substrats „Sigma Fast“ detektiert. M: „Prestained Protein“ Marker, 1 - 10: Elutionsfraktionen 1 – 10.

Aufgrund der noch starken Verunreinigung des Eluats wurden die aus der Ni-NTA-Reinigung erhaltenen Fraktionen 6 und 7, sowie 8, 9 und 10 vereint und über eine Anionenaustauschchromatographie weiter gereinigt (Abbildung 7; 2.6.2).

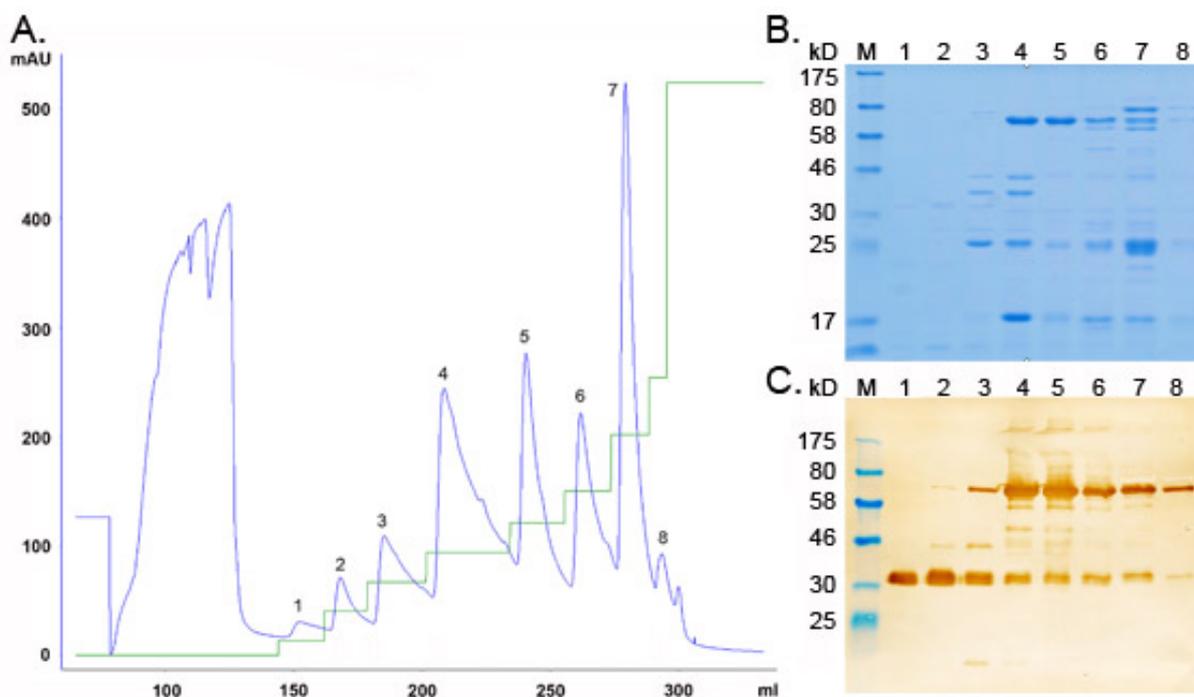


Abbildung 7: Darstellung der erhaltenen Fraktionen nach Durchführung einer Anionenaustauschchromatographie.

Ein zweiter Reinigungsschritt wurde mittels einer Anionenaustauschchromatographie durchgeführt (2.6.2). Hierbei wurden die vereinten Fraktionen aus der Ni-NTA Affinitätschromatographie (2.6.1) über eine mit Q-Sepharose Matrix gefüllte Säule weiter aufgetrennt. Die Elution der Proteine erfolgte mit einer steigenden Konzentration an NaCl. Die acht gesammelten Elutionsfraktionen wurden in einer SDS-PAGE aufgetrennt (2.6.4) und auf Nitrozellulose transferiert (2.6.5). A. Chromatogramm der Reinigung. Die Einteilung in die acht Elutionsfraktionen ist gekennzeichnet, B. Coomassie gefärbtes SDS Gel (2.6.6), C. Western Blot (2.6.5). Der Nachweis von 425(scFv)-ETA' in den Elutionsfraktionen erfolgte mit einem gegen das Histidin-Motiv gerichteten Antikörper und einem Gam^{PO} Zweitantikörper. Dieser wurde durch Zugabe des Substrats „Sigma Fast“ detektiert. M: „Prestained Protein“ Marker, 1: Elution Fraktion 1 (50 mM NaCl); 2: Elution Fraktion 2 (100 mM NaCl); 3: Elution Fraktion 3 (150 mM NaCl); 4: Elution Fraktion 4 (200 mM NaCl); 5: Elution Fraktion 5 (250 mM NaCl); 6: Elution Fraktion 6 (300 mM NaCl); 7: Elution Fraktion 7 (400 mM NaCl); 8: Elution Fraktion 8 (500 mM NaCl).

Die Elution der Proteine erfolgte hier über eine steigende Salzkonzentration, wobei 425(scFv)-ETA' ab einer Konzentration von 200 mM NaCl eluiert wurde. Durch die Anionenaustauschchromatographie konnte ein Teil der Verunreinigungen von den 425(scFv)-ETA' haltigen Fraktionen getrennt werden. Die Fraktionen 4 und 5 enthielten die größten Mengen an 425(scFv)-ETA'. Während Fraktion 5 für die Langzeitlagerung lyophilisiert werden konnte, musste Fraktion 4 in einer anschließend durchgeführten Gelfiltrationschromatographie einem letzten Reinigungsschritt unterzogen werden (Abbildung 8; 2.6.3).

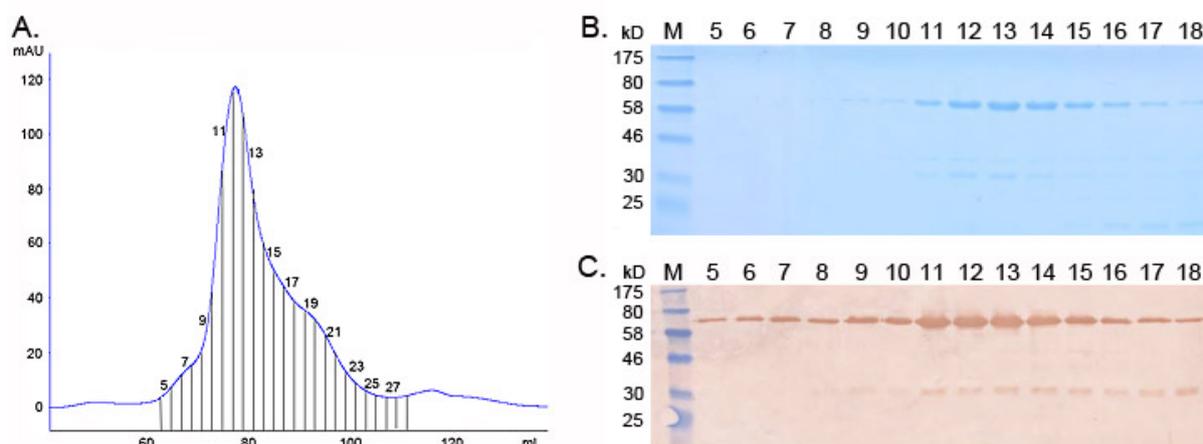


Abbildung 8: Darstellung der Fraktionierung des Eluats aus der Gelfiltrationschromatographie.

Mit der durchgeführten Gelfiltration (2.6.3) sind die in Fraktion 4 aus der Anionenaustauschchromatographie (2.6.2) enthaltenen Proteine der Größe nach aufgetrennt worden. Das erhaltene Eluat wurde in 28 separaten Fraktionen gesammelt. Diese wurden in einer SDS-PAGE aufgetrennt (2.6.4) und auf Nitrozellulose transferiert (2.6.5). A. Chromatogramm der Reinigung. Die blaue Kurve zeigt die relative UV-Absorption des Eluats in den einzelnen Fraktionen, B. Coomassie gefärbtes SDS Gel (2.6.6), C. Western Blot (2.6.5). Der Nachweis von 425(scFv)-ETA' in den Elutionsfraktionen erfolgte mit einem gegen das Histidin-Motiv gerichteten Antikörper und einem Gam^{PO} Zweitantikörper. Dieser wurde durch Zugabe des Substrats „Sigma Fast“ detektiert. M: „Prestained Protein“ Marker, 5 - 18: Elutionsfraktionen 5 - 18.

Die Fraktionierung des Eluats führte zu einer erfolgreichen Abtrennung der kontaminierenden Bande bei 17 kDa und zu einer teilweisen Abtrennung der Bande bei ca. 30 kDa. Die Fraktionen 9 - 13 wurden vereint und lyophilisiert. Abbildung 9 zeigt die Proteinintegrität der rekonstituierten Probe auf einem SDS Gel (2.6.4) und Western Blot (2.6.5).

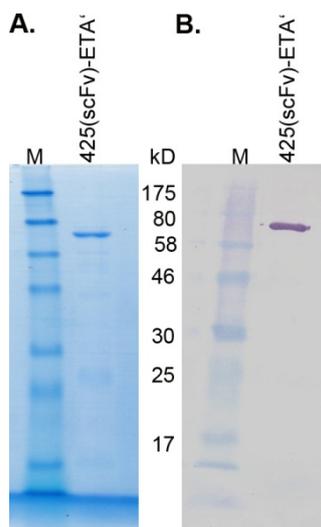


Abbildung 9: Darstellung des gereinigten 425(scFv)-ETA'.

Die aus der Gelfiltrationschromatographie (2.6.3) erhaltenen Fraktionen 9 - 13 wurden vereint und anschließend mittels SDS-PAGE aufgetrennt (2.6.4) sowie auf Nitrozellulose transferiert (2.6.5). A. Coomassie gefärbtes SDS Gel (2.6.6), B. Western Blot (2.6.5). Der Nachweis des Proteins erfolgte mit einem gegen das Histidin-Motiv gerichteten Antikörper und einem Gam^{AP} Zweitantikörper. Dieser wurde durch Zugabe des Substrats NBT/BCip detektiert. M: „Prestained Protein“ Marker.

Insgesamt konnten aus der 4 Liter Fermentation ca. 10 mg Protein gewonnen werden.

3.1.2 Funktionale *in vitro* Analysen von 425(scFv)-ETA'

Vor dem Einsatz von 425(scFv)-ETA' in einem *in vivo* Modell wurde das Protein *in vitro* hinsichtlich seiner Funktionalität überprüft. Hierbei wurde die Bindung sowie auch das toxische Potential des IT auf die EGFR-positiven Zelllinien A-431 und L3.6pl getestet (Abbildung 10).

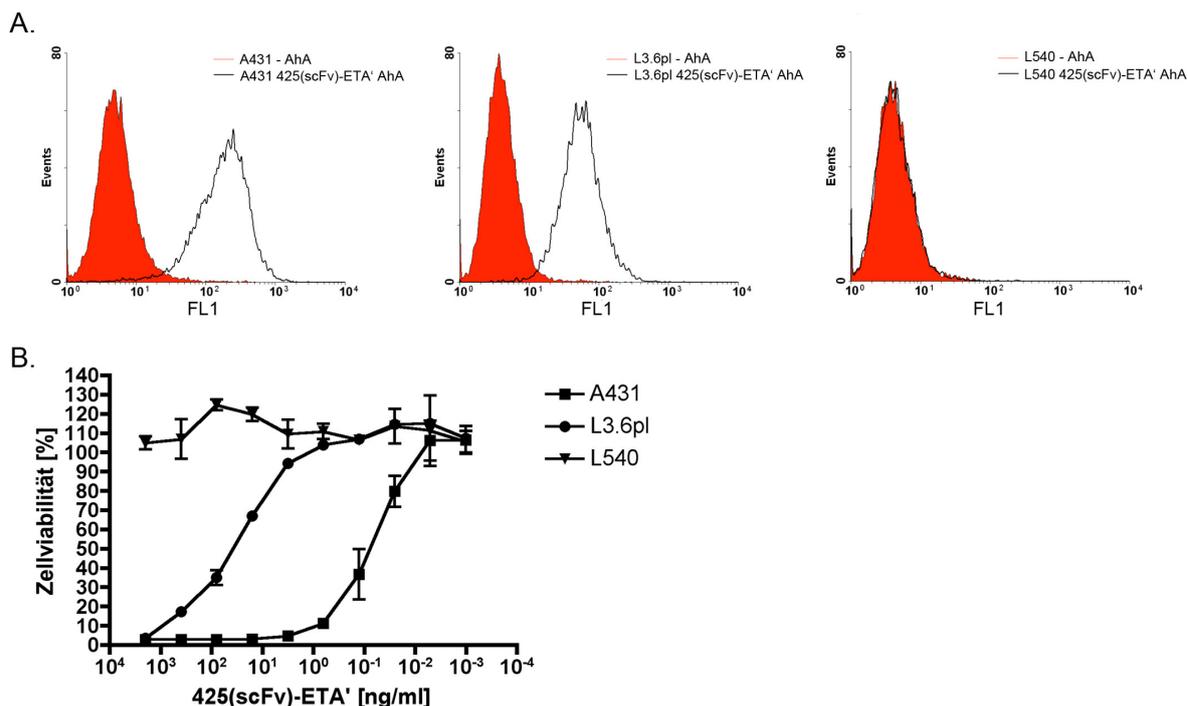


Abbildung 10: Darstellung der Bindung und Toxizität von 425(scFv)-ETA' auf A-431- und L3.6pl-Zellen. Die Funktionalität des gereinigten Proteins (2.6.3) wurde sowohl auf A-431-Zellen als auch auf L3.6pl-Zellen (Tabelle 3) getestet. Die EGFR-negative Zelllinie L540 diente als Negativkontrolle. A. Durchflusszytometrische Analyse zur Verifizierung der Bindung von 425(scFv)-ETA' (2.6.8). Es wurde 1 µg des Proteins eingesetzt. Die Bindung von 425(scFv)-ETA' an die jeweilige Zelllinie wurde mit anti-His-Alexa488 nachgewiesen und ist durch die Verschiebung im Fluoreszenzkanal 1 (FL1) gekennzeichnet. B. Die Toxizität von 425(scFv)-ETA' wurde in einem XTT-Viabilitätsassay überprüft (2.6.10).

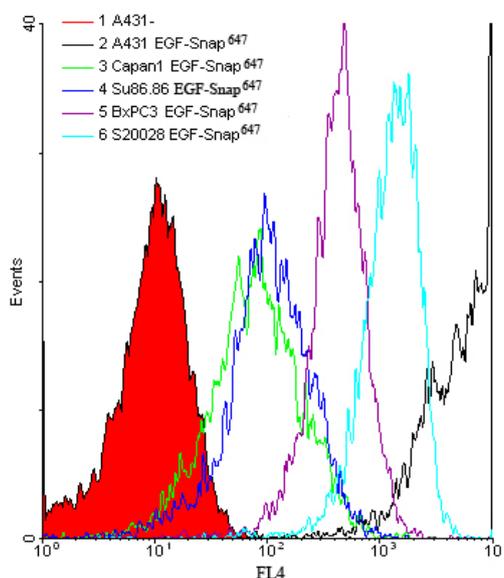
425(scFv)-ETA' bindet sowohl an die epidermoide Karzinomzelllinie A-431 als auch an die Pankreaskarzinomzelllinie L3.6pl. Die bei der Bindung an A-431-Zellen sichtbare stärkere Verschiebung im Fluoreszenzkanal ist auf die höhere EGFR-Expression dieser Zelllinie im Vergleich zu L3.6pl zurückzuführen. Des Weiteren konnte mit einer IC₅₀ von 0,1 ng/ml eine 700fach höhere Toxizität auf die A-431-Zellen im Vergleich zu L3.6pl-Zellen (IC₅₀: 70 ng/ml) dokumentiert werden.

Die zytotoxische Wirkung von 425(scFv)-ETA' wurde ebenfalls auf verschiedenen weiteren Pankreaskarzinomzelllinien bestätigt. Die Sensitivität dieser Zelllinien war hierbei unterschiedlich. Die IC₅₀'s aller getesteten Zelllinien sind in Tabelle 4 dargestellt.

Tabelle 4: Getestete Zelllinien und ihre Sensitivität gegenüber 425(scFv)-ETA'.

Zelllinie	Mittlere inhibitorische Konzentration (IC ₅₀)
Capan-1	100 ng/ml
L3.6pl	70 ng/ml
BxPC3	30 ng/ml
S2-0028	20 ng/ml
SU.86.86	10 ng/ml
A-431	0,1 ng/ml

Die gemessene Zytotoxizität korrelierte hierbei nicht mit der gemessenen Fluoreszenzintensität nach EGF-SNAP⁶⁴⁷ Bindung auf den jeweiligen Zelllinien (Abbildung 11). So konnte für die Pankreaskarzinomzelllinie SU.86.86 eine IC₅₀ von 10 ng/ml verzeichnet werden, ihre Verschiebung im Fluoreszenzkanal war jedoch geringer als z.B. bei der Zelllinie S2-0028, welche eine IC₅₀ von 20 ng/ml aufwies (Tabelle 4).

**Abbildung 11: EGFR-Expression auf verschiedenen Pankreaskarzinomzelllinien im Vergleich zu A-431.**

Mehrere Pankreaskarzinomzelllinien (Tabelle 3) wurden mittels Bindung von EGF-SNAP⁶⁴⁷ auf die Stärke der EGFR-Expression hin getestet (2.6.8). Es wurde 1 µg EGF-SNAP⁶⁴⁷ eingesetzt. Die Bindung ist durch die Verschiebung im Fluoreszenzkanal 4 (FL4) gekennzeichnet.

Die stärkste Verschiebung im Fluoreszenzkanal zeigte die Zelllinie A-431. Capan-1 ist von allen getesteten Zelllinien durch die schwächste Verschiebung im Fluoreszenzkanal gekennzeichnet (Abbildung 11).

3.2 Darstellung der apoptoseinduzierenden Wirkung von 425(scFv)-ETA'

Die apoptoseinduzierende Wirkung von ETA ist hinreichend bekannt (93-95) und sollte mittels Annexin A5 nachgewiesen werden. Das Protein bindet an das in apoptotischen Zellen externalisierte PS (55) und kann so als Apoptose-Marker eingesetzt werden. Für die *in vitro* Versuche zur Apoptosedarstellung (2.6.11) wurde ein Annexin A5-EGFP Fusionsprotein verwendet (84).

3.2.1 Eukaryotische Expression von Annexin A5-EGFP

Für die Expression des Fusionsproteins standen mit pMS-L-Annexin A5-EGFP-MH transfizierte HEK 293T Zellen zur Verfügung (Abbildung 12). Die N-terminal gelegene Igκ-Sequenz des pMS-Vektors ermöglichte hierbei die Sekretion des Proteins in den Zellkulturüberstand (96). Der proteinhaltige Überstand konnte ohne Reinigung direkt für die Detektion apoptotischer Zellen eingesetzt werden.

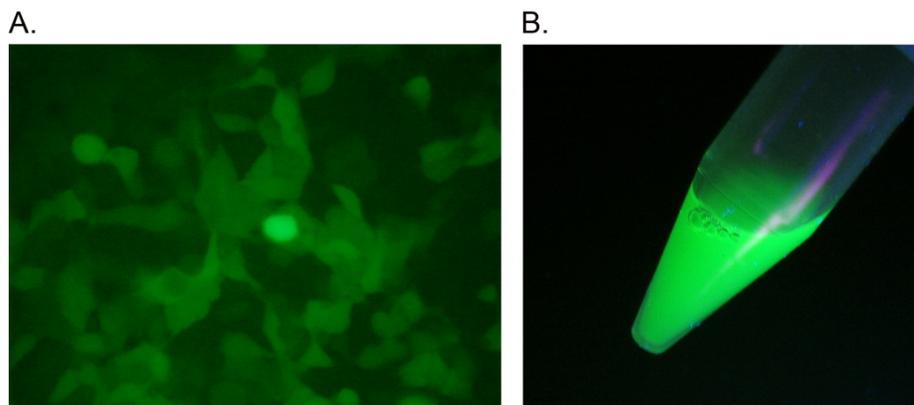


Abbildung 12: Darstellung von Annexin A5-EGFP im Zellkulturüberstand.

Die Produktion von Annexin A5-EGFP erfolgte durch mit pMS-L-Annexin A5-EGFP-MH (Tabelle 1) transfizierte 293T Zellen (2.5.1). Das Protein wurde hierbei in den Zellkulturüberstand sezerniert. A. Darstellung der transfizierten 293T Zellen unter dem Fluoreszenzmikroskop (Vergrößerung: 400x). B. Zellfreier Zellkulturüberstand. Die transfizierten Zellen sowie der proteinhaltige Überstand leuchten nach Anregung mit UV-Licht aufgrund der Fusion mit EGFP grün.

3.2.2 Darstellung apoptotischer Tumorzellen nach Inkubation mit 425(scFv)-ETA'

Die gezielte Darstellung apoptotischer Tumorzellen war ein wesentlicher Nachweis der apoptoseinduzierenden Wirkung des IT. A431scM3 Zellen wurden *in vitro* mit 425(scFv)-

ETA' inkubiert und anschließend hinsichtlich der Bindung von Annexin A5-EGFP untersucht. Apoptotische A431scM3 Zellen wurden nachfolgend durchflusszytometrisch dargestellt (2.6.11).

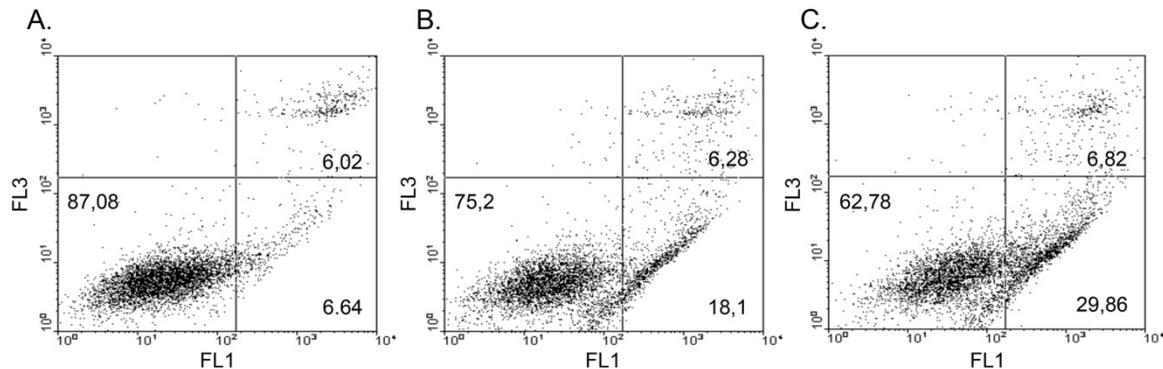


Abbildung 13: Darstellung der Induktion von Apoptose nach Inkubation mit 425(scFv)-ETA'.

$5 \cdot 10^5$ A431scM3 Zellen (2.7.1) wurden mit verschiedenen Konzentrationen 425(scFv)-ETA' (Tabelle 1) 24 Stunden inkubiert. Die Induktion der Apoptose wurde anschließend über die Bindung von Annexin A5-EGFP nachgewiesen (2.6.11). Eine Färbung der Zellen mit PI unmittelbar vor der Messung ermöglichte die Unterscheidung von früh und spät apoptotischen Zellen. Durch Annexin A5-EGFP (Tabelle 1) gebundene Zellen zeigen eine Verschiebung im 1. Fluoreszenzkanal (FL1). PI gefärbte Zellen sind durch eine Verschiebung im 3. Fluoreszenzkanal (FL3) gekennzeichnet. Früh apoptotische Zellen zeigen eine Verschiebung im FL1. Spät apoptotische Zellen zeigen sowohl eine Verschiebung im FL1 als auch im FL3. Die Zahlen geben den Prozentsatz der Zellpopulation in den jeweiligen Quadranten an. A. A431scM3 Zellen. B. A431scM3 Zellen + 1 µg 425(scFv)-ETA'. C. A431scM3 Zellen + 5 µg 425(scFv)-ETA'.

Die Induktion der Apoptose ist bereits nach 24 Stunden im Durchflusszytometer messbar und von der Menge des zudosierten IT abhängig.

3.3 Vorbereitung der *in vivo* Experimente zur optischen Darstellung subkutaner Tumoren

Die optimale Darstellung fluoreszierender Tumorzellen *in vivo* war ein wichtiges Ausgangskriterium für die erfolgreiche Analyse des Behandlungserfolgs anhand des Fluoreszenzsignals. Dies war abhängig sowohl von der Eigenschaft der Zellen *in vivo* geeignete Tumoren auszubilden, als auch von der bestmöglichen optischen Darstellung des reinen Fluoreszenzsignals. Letzteres bedingte ein hohes Emissionsmaximum des Fluoreszenzfarbstoffes, um das Hintergrundsignal der Maus möglichst vollständig eliminieren zu können. Des Weiteren verspricht längerwelliges Licht eine stärkere Durchdringungstiefe des Gewebes, was für die Erfassung des Signals von eventuell tiefer gelegenen Zellen notwendig ist. Aufgrund dieser Überlegungen wurde für die Transfektionen der Karzinomzelllinien das rot fluoreszierende Protein Kat2 gewählt. Kat2 besitzt nicht nur ein

hohes Emissionsmaximum im dunkelroten Bereich des Lichtspektrums, sondern auch eine im Vergleich zu anderen rot fluoreszierenden Proteinen wie z.B. DsRed, viel stärkere Leuchtkraft (76).

3.3.1 Herstellung rot fluoreszierender Zelllinien

Basierend auf den Daten zur Darstellung der Effektivität von 425(scFv)-ETA' auf Lungenmetastasen der Pankreaskarzinomzelllinie L3.6pl und der dokumentierten hohen Anwachsrate dieser Zelllinie (45; 87), wurde eine erste Visualisierung mit fluoreszierenden L3.6pl Zellen durchgeführt. Zusätzlich erfolgte die Darstellung fluoreszierender A-431-Zellen. Die epidermoide Karzinomzelllinie zeigte eine ca. 700fach höhere Sensitivität im Vergleich zu L3.6pl Zellen *in vitro* (3.1.2). Um eine möglichst hohe Anwachsrate auch dieser Zellen zu gewährleisten, wurden sie in der Maus passagiert, bevor sie wieder in Kultur genommen wurden (2.7.1). Diese als A431scM3 bezeichneten Zellen standen anschließend zur Transfektion mit Kat2 zur Verfügung.

Die Transfektion der L3.6pl- und A431scM3-Zellen erfolgte mittels Lipofektion (2.5.1). Anschließend durchgeführte Sortierungszyklen mit einem FACSVantage Zellsortierer führten zur Anreicherung rot fluoreszierender Zellen (2.6.9), die neben der fluoreszenzmikroskopischen Darstellung auch im Durchflusszytometer eindeutig dargestellt werden konnten (Abbildung 14; 2.6.8).

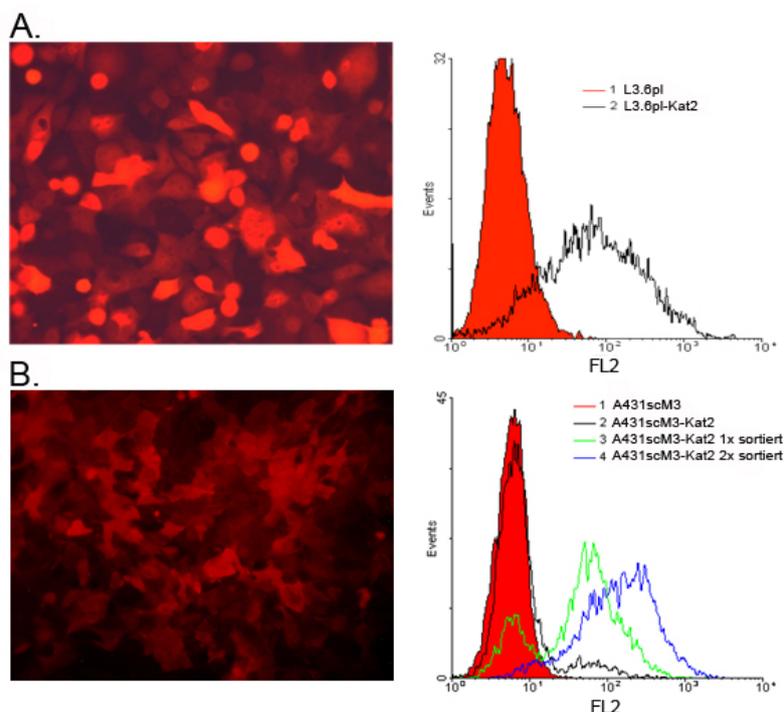


Abbildung 14: Darstellung von L3.6pl-Kat2 und A431scM3-Kat2 Zellen unter dem Mikroskop und im Durchflusszytometer.

Die L3.6pl-Zellen (Tabelle 3) und die in der Maus passagierten A431scM3-Zellen (2.7.1) wurden mittels Lipofektion mit dem pTag-Katushka2-N Plasmid (Evrogen) transfiziert (2.5.1) und die rot fluoreszierenden Zellen durch einen bzw. zwei Zellsortierungszyklen bis zu einer nahezu homogen fluoreszierenden Zellpopulation weiter angereichert (2.6.9). A. Rot fluoreszierende L3.6pl Zellen unter dem Fluoreszenzmikroskop (Vergrößerung: 200x) und Darstellung der Fluoreszenz im Durchflusszytometer (2.6.8), B. Rot fluoreszierende A431scM3-Zellen unter dem Fluoreszenzmikroskop (Vergrößerung: 200x) und Darstellung der Fluoreszenz im Durchflusszytometer (2.6.8): A431scM3 (rot), A431scM3-Kat2 direkt nach der Transfektion (schwarz), A431scM3-Kat2 nach einem Zellsortierungszyklus (grün) und A431scM3-Kat2 nach zwei Zellsortierungszyklen (blau).

Um die Sensitivität der fluoreszierenden Zellen gegenüber dem IT auch nach der Transfektion sicher zu stellen, wurde sowohl die Bindung als auch das toxische Potential von 425(scFv)-ETA' überprüft (Abbildung 15).

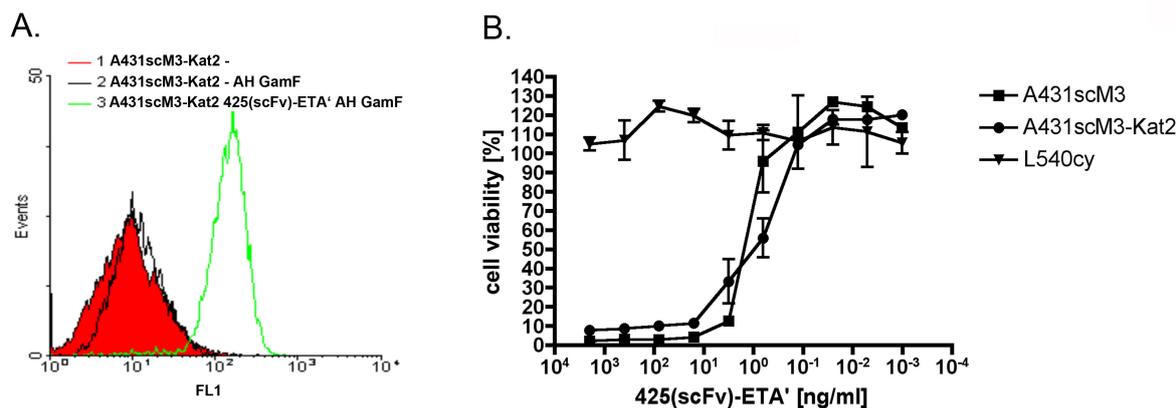


Abbildung 15: Darstellung der Sensitivität von A431scM3 und A431scM3-Kat2 Zellen gegenüber 425(scFv)-ETA'.

Auch nach der Passage in der Maus (2.7.1) und der Transfektion mit pTag-Katushka2-N (2.5.1) sind die A431scM3 und A431scM3-Kat2 Zellen bezüglich ihrer Sensitivität gegenüber dem IT getestet worden. A. Darstellung der Bindung von 425(scFv)-ETA' an A431scM3-Kat2 Zellen (2.6.8). Es wurde 1 µg Protein für die Überprüfung der Bindung eingesetzt. Die Bindung wurde mit den Antikörpern anti-penta-His (AH) und Gam^{FITC} (GamF) nachgewiesen und wird durch die Verschiebung im FL1 dargestellt. B. Darstellung der Zytotoxizität von 425(scFv)-ETA' in einem XTT-Zellviabilitätsassay (2.6.10).

Wie der Abbildung 15 zu entnehmen, ist die Sensitivität der L3.6pl-Kat2 Zellen gegenüber 425(scFv)-ETA' auch nach der Transfektion gegeben.

Ebenso konnte eine Bindung von 425(scFv)-ETA' an A431scM3-Kat2 Zellen als auch eine spezifische Toxizität des IT diesen Zellen gegenüber gezeigt werden. Dabei ist die Sensitivität der A431scM3-Kat2 Zellen nicht signifikant unterschiedlich zur Sensitivität der A431scM3 Zellen oder der A-431 Zellen (vgl. Abbildung 10 und Abbildung 15).

3.3.2 Darstellung von fluoreszierenden Zellen *in vivo*

Die Darstellung der fluoreszierenden Zellen erfolgte in Nacktmäusen mit Balb/c Hintergrund. Balb/c nu/nu Mäuse sind immunsupprimiert, was die Etablierung von humanen Tumorzelllinien begünstigt (97). Der Einsatz von Nacktmäusen ist für die fluoreszenzbasierte Bildgebung insofern sinnig, als dass normales Mausfell, hauptsächlich bei der Messung im Bereich des grünen Spektrums, ebenfalls ein Fluoreszenzsignal erzeugen würde. Für die Etablierung der optischen Tumordarstellung und der anschließenden Behandlung wurde ein subkutanes Tumormodell gewählt. Subkutane Tumoren der in dieser Arbeit verwendeten Zelllinien wachsen lokal begrenzt und können Ausmaße erreichen, die es ermöglichen, den Tumor bereits nach kurzer Zeit auch von außen zu beurteilen.

Eine erste Visualisierung von fluoreszierenden Zellen erfolgte mit L3.6pl-GFP und L3.6pl-Kat2 Zellen parallel in einer Maus (2.7.2). Die Darstellung von L3.6pl-GFP Zellen konnte bereits gezeigt werden (98), und diente hier als Kontrolle. Des Weiteren wurden einer zweiten

Maus A431scM3-Kat2 Zellen injiziert, welche ebenfalls über die Fluoreszenz dargestellt werden konnten (Abbildung 16).

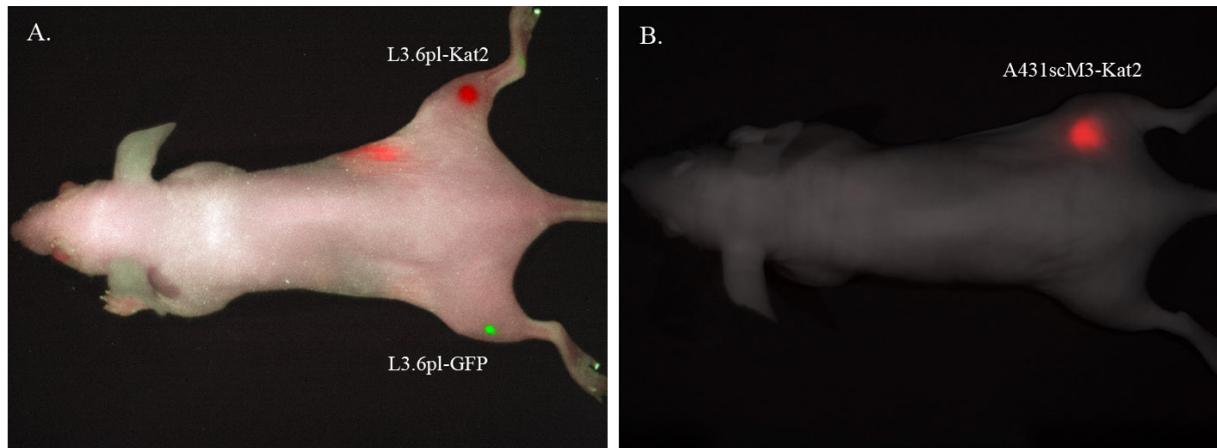


Abbildung 16: Darstellung fluoreszierender Tumorzelllinien *in vivo*.

In vitro transfizierte L3.6pl und A431scM3 Zellen (2.5.1) wurden s.c. in den linken und rechten Oberschenkel von Balb/c nu/nu Mäusen (2.7) appliziert und die nach einigen Tagen angewachsenen Tumoren mit der CRi Maestro™ „Software“ visualisiert (2.7.2). A. „Composite“ Bild: Darstellung von L3.6pl-GFP (grünes Signal), L3.6pl-Kat2 Zellen (rotes Signal) und Hintergrund (weißes Signal), B. Überlagertes Weisslicht-Bild mit der Aufnahme des Fluoreszenzsignals von A431scM3-Kat2 Zellen (rotes Signal).

Sowohl L3.6pl-Kat2 als auch A431scM3-Kat2 Zellen konnten mit der Spektralanalyse „Software“ des Maestro™ Systems (1.3.3; 2.8.1) erfolgreich dargestellt werden. Jedoch zeigte die Aufnahme der Maus mit den L3.6pl-GFP und L3.6pl-Kat2 Zellen ein starkes Hintergrundsignal. Dies erkennt man daran, dass sich ein grünes Signal nicht nur im Tumor wiederfindet, sondern auch an den Ohren sowie an den Zehen. Des Weiteren gibt es ein unspezifisches, rotes Signal an der rechten Hüfte (Abbildung 16 A). Dies ist in der Aufnahme des A431scM3-Kat2 spezifischen Signals nicht vorhanden (Abbildung 16 B). Tatsächlich resultierte das Hintergrundsignal hauptsächlich aus der Messung des Spektrums im grünen Bereich (500 – 600 nm). Das zum Teil im roten Bereich des Spektrums gemessene Hintergrundsignal beruht auf der Nutzung von den zu Beginn der Arbeiten verfügbaren, aber nicht optimalen Filtern zur Messung des Kat2 Signals. Für die Aufnahme der A431scM3-Kat2 Zellen wurde ein Filter verwendet, der für die Darstellung des Kat2 Signals im optimalen Bereich des Spektrums misst. Erwartungsgemäss war hier kein Hintergrundsignal zu erkennen (Abbildung 16 B). Dies war eine ideale Voraussetzung für die Visualisierung von Behandlungseffekten *in vivo*, da sich dadurch eine mögliche Fehlerquelle von vornherein ausschließen ließ.

3.4 *In vivo* Experimente zur Visualisierung und Evaluierung von Behandlungseffekten im subkutanen Mausmodell

Nach erfolgreicher Bereitstellung von funktionalem 425(scFv)-ETA' und Etablierung der optischen Darstellung fluoreszierender Tumorzellen *in vivo*, konnten erste *in vivo* Experimente zur Visualisierung von Behandlungseffekten durchgeführt werden. Aufgrund der hohen Sensitivität der A431scM3-Kat2 Zellen gegenüber dem IT, und der Intensität in der Fluoreszenz wurden dafür diese Zellen verwendet. Wie auch bei der optischen Darstellung der Tumorzellen *in vivo* wurde hier ein subkutanes Modell für die Behandlung gewählt. Dies liegt darin begründet, dass sich die Tumoren nach einiger Zeit auch von außen beurteilen lassen und somit eine zweite Evaluierung unabhängig von der molekularen Bildgebung erfolgen kann.

Die Mäuse wurden in drei Gruppen eingeteilt. Da die Tumoren der einzelnen Tiere zu Beginn der Therapie unterschiedlich groß waren, wurde bei der Verteilung der Tiere auf die einzelnen Gruppen darauf geachtet, dass in jeder Gruppe Tiere mit größeren als auch mit kleineren Tumoren vorhanden waren. Die erste Gruppe war für die Behandlung mit 425(scFv)-ETA' vorgesehen. Die zweite Gruppe diente als Negativkontrolle und erhielt PBS. Die dritte Gruppe wurde mit Doxorubicin behandelt, einem Chemotherapeutikum, welches bereits in der Klinik Anwendung findet. Durch seine DNA-interkalierende Wirkung wird Doxorubicin als eines der effizientesten Zytostatika z.B. gegen Leukämien und eine Reihe solider Tumoren eingesetzt (99; 100). Da für 425(scFv)-ETA' bisher keine Daten zur Darstellung von Behandlungseffekten während der Behandlung vorliegen, fungierte die mit Doxorubicin behandelte Gruppe hier als Positivkontrolle.

Den Tieren wurden $5 \cdot 10^6$ A431scM3-Kat2 Zellen in den rechten Oberschenkel s.c. appliziert (101). Elf Tage nach der Zellinokulation wurde mit der Behandlung begonnen (2.7.3). Das Verlaufsschema mit den entsprechenden Zeitfenstern ist in Abbildung 17 dargestellt.

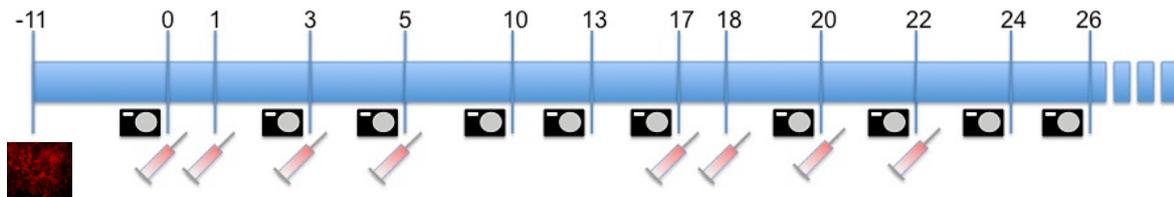


Abbildung 17: Verlaufsschema für die Behandlung und gleichzeitige Messung der Tumorgrößen.

Das dargestellte Verlaufsschema zeigt den zeitlichen Ablauf der Tierversuche. Elf Tage nach der Tumorinokulation wurde die halbmaximal tolerable Dosis von 425(scFv)-ETA' i.v. verabreicht (2.7.3). Die Kontrollmäuse erhielten i.v. PBS bzw. weniger als die mittlere letale Dosis (LD_{50}) von Doxorubicin (102). Der erste Behandlungszyklus erfolgte an Tag 0, 1, 3 und 5. Ein zweiter Zyklus folgte zwölf Tage später an Tag 17, 18, 20 und 22. An Tag 0, 3, 5, 10, 13, 17, 20, 22, 24 und 26 wurden Aufnahmen mit dem CRi Maestro™ System (1.3.3) gemacht.

3.4.1 Optische Darstellung und Bestimmung des Tumorwachstums während der Behandlung mit 425(scFv)-ETA' und Doxorubicin

Einer der zu erwartenden Effekte bei Behandlungserfolg war die Verlangsamung des Tumorwachstums bis hin zur völligen Stagnation oder im Idealfall die Tumorregression. Dies konnte über die fluoreszenzbasierte molekulare Bildgebung optisch dargestellt und evaluiert werden. Das CRi Maestro™ System (1.3.3) ermöglichte nicht nur die Aufnahme des Tumors über die Fluoreszenz der A431scM3-Kat2 Zellen, sondern auch die Bestimmung der dargestellten fluoreszierenden Fläche. Dazu wurde die zu bestimmende Fläche definiert und die jeweilige Größe in mm^2 durch die „Software“ errechnet. Abbildung 18 zeigt Aufnahmen von je einer Maus aus den drei Gruppen an drei unterschiedlichen Tagen während der Behandlungszyklen.

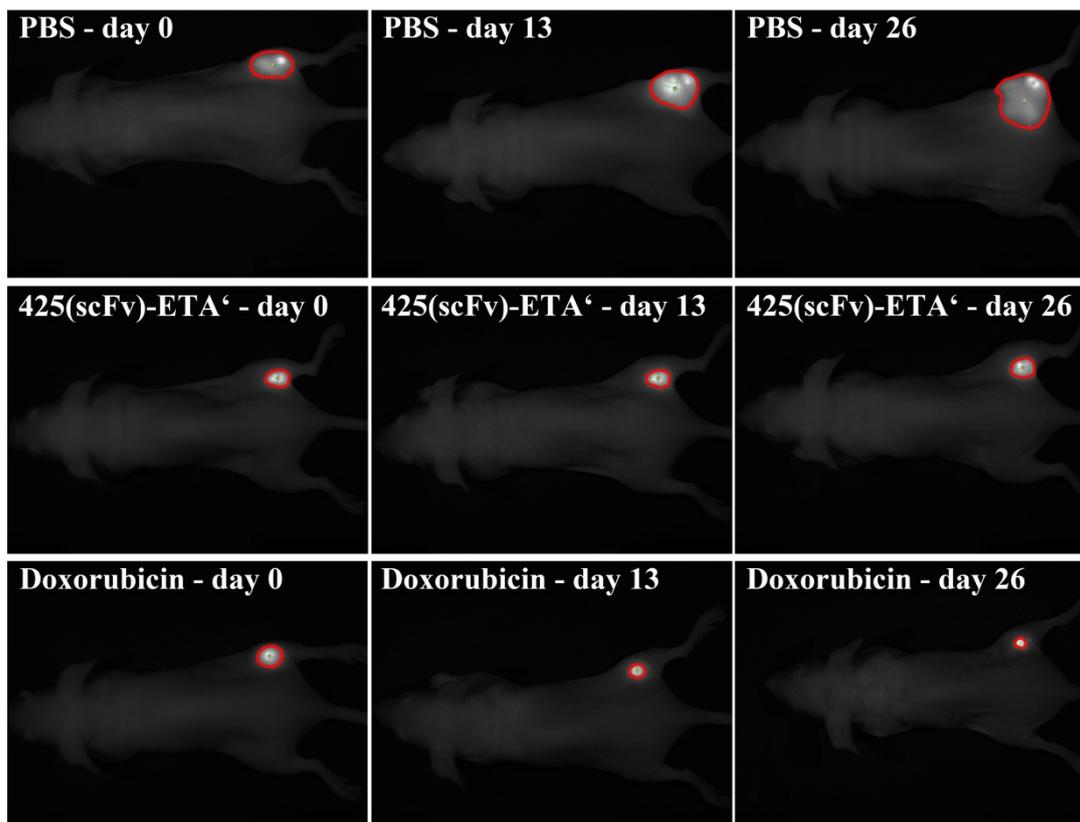


Abbildung 18: Darstellung der A431scM3-Kat2 Tumoren je einer exemplarischen Maus aus den drei Gruppen während der Behandlung mit PBS, 425(scFv)-ETA' und Doxorubicin.

Die Aufnahmen zeigen die Tumoren am Anfang (Tag 0), während (Tag 13) und nach (Tag 26) der Behandlung (2.7.3). Die Fläche der Tumoren ist anhand des Fluoreszenzsignals eingegrenzt und bestimmt worden (7.4). Bei den hier dargestellten Bildern sind die Fluoreszenzmessungen (2.8.1) mit den Weisslicht-Bildern überlagert.

Wie in Abbildung 18 gezeigt, ist der Behandlungseffekt schon am Tag der Messung rein optisch zu erkennen. Um einen Vergleich der Tumorgößen zwischen den einzelnen Tieren ziehen zu können, wurden die vom Maestro™ System errechneten jeweils ersten Werte auf 100% gesetzt und die folgenden Werte angeglichen.

Abbildung 19 veranschaulicht den Verlauf des mittleren Tumorwachstums in den verschiedenen Mausgruppen.

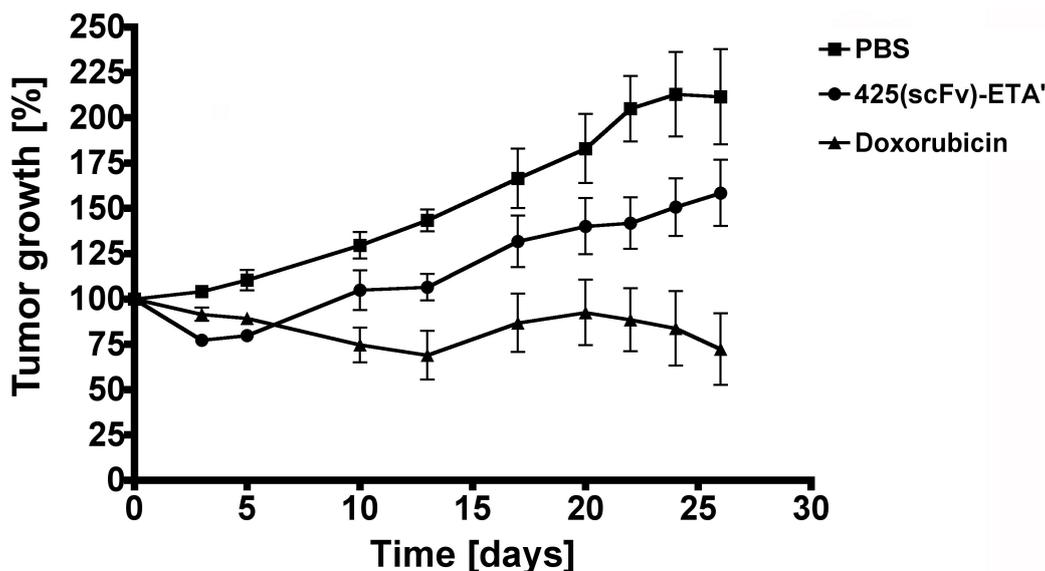


Abbildung 19: Darstellung der Tumorgrößen während der Behandlungszyklen.

Dargestellt sind die prozentualen Veränderungen in den mit dem Maestro™ System (1.3.3) errechneten Tumorgrößen während der Behandlungszyklen (2.7.3) in allen drei Mausgruppen. Die Werte an den verschiedenen Zeitpunkten repräsentieren hier jeweils den Mittelwert von sechs Mäusen einer Gruppe.

Die graphische Darstellung der prozentualen Veränderung in den Tumorgrößen der einzelnen Mausgruppen verdeutlicht den Behandlungserfolg. Hierbei kann bereits an Tag 3 der Behandlung eine Tumorregression in beiden Behandlungsgruppen (425(scFv)-ETA' und Doxorubicin) verzeichnet werden. Während die mit Doxorubicin behandelten Tumoren im weiteren Verlauf weiter in ihrer Größe abnahmen und erst ab Tag 17 kurzzeitig wieder größer wurden ehe mit dem zweiten Behandlungszyklus wieder eine Regression einsetzte, wuchsen die mit 425(scFv)-ETA' behandelten Tumoren ohne eine weitere Regression bis zum Ende der Behandlung. Im Vergleich zu den Tumoren in der mit PBS behandelten Gruppe zeigten die Tumoren in der 425(scFv)-ETA' Mausgruppe jedoch ein weitaus langsames Wachstumsverhalten. Letzteres konnte durch einen „One-tailed t-test“ statistisch bestätigt werden, so dass das langsamere Wachstum der Tumoren durch die Behandlung mit 425(scFv)-ETA' im Vergleich zur PBS Kontrollgruppe als signifikant bezeichnet werden konnte ($p < 0,001$).

3.4.2 Bestimmung des Tumorwachstums mit Hilfe der Schieblehre während der Behandlung mit 425(scFv)-ETA' und Doxorubicin

Zusätzlich zur Bestimmung der Tumorgröße mit dem Maestro™ System (1.3.3) wurden die Tumoren mit Hilfe der Schieblehre ausgemessen. Die Berechnung der jeweiligen Größen erfolgte hierbei mit der Formel zur Berechnung der Fläche einer Ellipse: $r_1 \cdot r_2 \cdot \pi$, wobei r_1

und r_2 die jeweiligen Radien der Fläche wiedergeben. Analog zur oben beschriebenen Berechnung und Darstellung der Tumorgrößen wurden für jeden Messzeitpunkt die Mittelwerte jeder Behandlungsgruppe berechnet und die jeweils ersten Werte auf 100% gesetzt. Der Verlauf des mittleren Tumorwachstums in den einzelnen Mausgruppen ist in Abbildung 20 veranschaulicht.

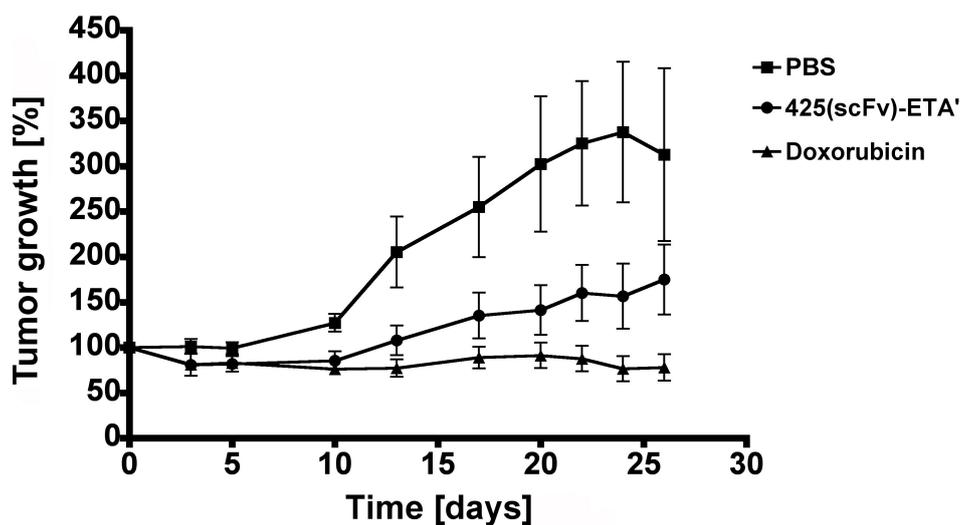


Abbildung 20: Darstellung der Tumorgrößen während der Behandlungszyklen.

Dargestellt sind die prozentualen Veränderungen in den mit der Schieblehre bestimmten Tumorgrößen während der Behandlungszyklen (2.7.3) in allen drei Mausgruppen. Die Werte an den verschiedenen Zeitpunkten repräsentieren hier jeweils den Mittelwert von sechs Mäusen einer Gruppe.

Im Vergleich zu den mit dem Maestro™ System errechneten Tumorgrößen scheinen die mit der Schieblehre ausgemessenen Tumoren größer zu sein. Der in den einzelnen Behandlungsgruppen dargestellte Verlauf im Tumorwachstum ist bei beiden Methoden zur Bestimmung der Tumorgröße ähnlich.

3.4.3 Optische Darstellung und Bestimmung der Fluoreszenzintensität während der Behandlung mit 425(scFv)-ETA' und Doxorubicin

Neben der Bestimmung der Tumorgröße sollte die Darstellung des Behandlungseffekts über die Messung der Fluoreszenzintensität erfolgen. Diese konnte zu unterschiedlichen Behandlungszeitpunkten durch das System bestimmt und die gemessenen Signale hinterher miteinander verglichen werden. In Abbildung 21 ist die an unterschiedlichen Tagen der Behandlung gemessene Fluoreszenzintensität beispielhaft für je eine Maus aus den drei Versuchsgruppen vergleichsweise gezeigt.

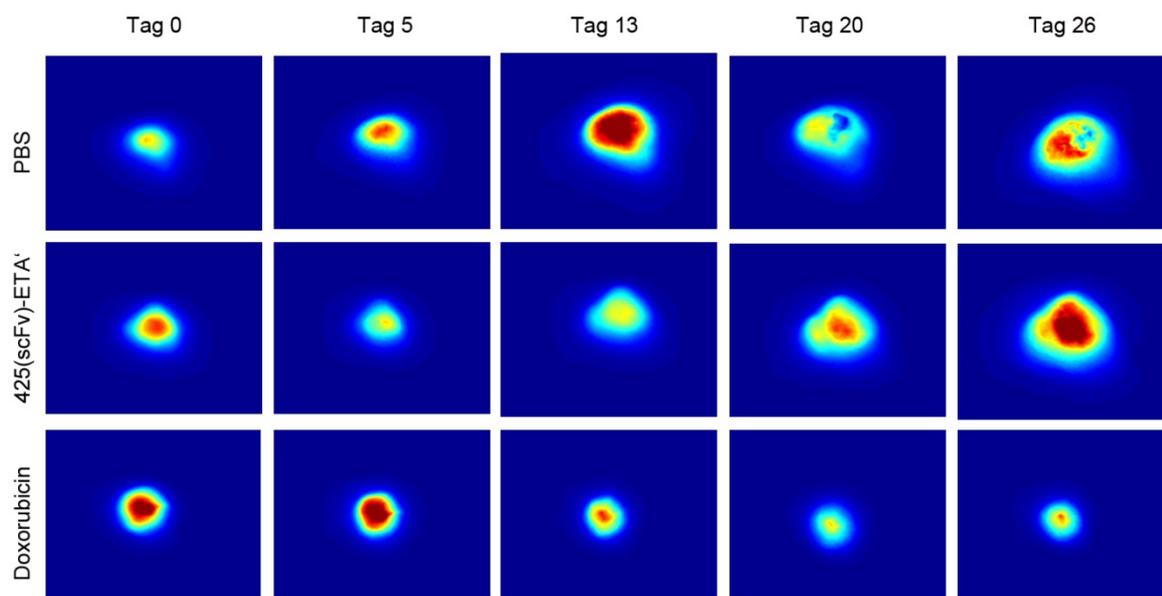


Abbildung 21: Darstellung der Fluoreszenzintensitäten des Tumors von je einer Maus aus den drei Versuchsgruppen.

Gezeigt sind die mit dem Maestro™ System (1.3.3) dargestellten Fluoreszenzintensitäten der Tumoren je einer Maus aus den Versuchsgruppen PBS, 425(scFv)-ETA' und Doxorubicin. Dabei nimmt die Intensität von dunkelrot über hellrot, gelb, türkis nach blau hin ab. Die dargestellten Intensitäten sind nur innerhalb einer Mausgruppe zu den verschiedenen Behandlungszeitpunkten (2.7.3) und nicht untereinander vergleichbar.

Wie in Abbildung 21 zu sehen, korrelierte die gemessene Fluoreszenzintensität nicht mit der Größe der Tumoren, was eine Beurteilung des Behandlungserfolgs allein über die Signalstärke erschwerte. Aus diesem Grund wurde das gemessene Fluoreszenzsignal in Beziehung zur gemessenen Größe der Tumoren gesetzt.

Die prozentualen Veränderungen der Fluoreszenzstärken in Korrelation zur Tumorgroße während der Behandlungszyklen sind in Abbildung 22 veranschaulicht.

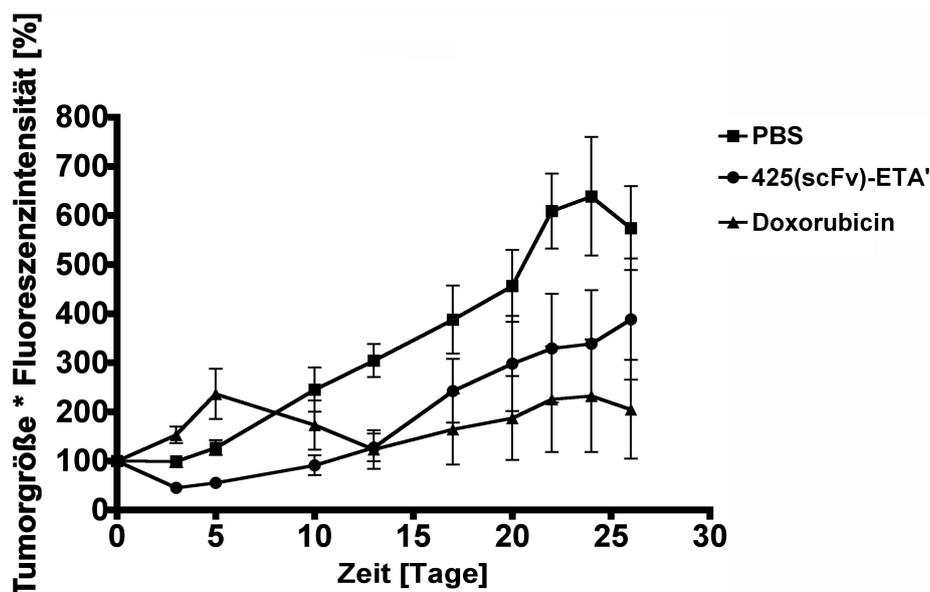


Abbildung 22: Darstellung der Fluoreszenzintensitäten in Korrelation zur Tumorgroße.

Dargestellt sind die prozentualen Veränderungen in den mit dem Maestro™ System (1.3.3) errechneten Fluoreszenzintensitäten (2.8.1) multipliziert mit den Tumorgroßen während der Behandlungszyklen (2.7.3) in allen drei Mausgruppen. Die Werte an den verschiedenen Zeitpunkten repräsentieren hier jeweils den Mittelwert von sechs Mäusen einer Gruppe.

3.4.4 Makroskopische Evaluierung der Tumoren während der Behandlung mit 425(scFv)-ETA' und Doxorubicin

Die Behandlung mit 425(scFv)-ETA' und Doxorubicin (2.7.3) zeigte nicht nur eine Reduktion in der Tumorgroße und der Fluoreszenzintensität, sondern auch eine von außen sichtbare Veränderung in der Entwicklung des Tumors (Abbildung 23).



Abbildung 23: Darstellung der äußeren Erscheinung der Tumoren.

Gezeigt sind Fotografien der Tumoren zur Darstellung der unterschiedlichen Entwicklung in den drei Behandlungsgruppen (2.7.3). Die Fotografien wurden 31 Tage nach der ersten Behandlung gemacht. Abgebildet sind jeweils die Tumoren aller Mäuse einer Gruppe. Zwei Mäuse aus der Doxorubicin Gruppe mussten an Tag 27 aufgrund eines zu starken Gewichtsverlusts geopfert werden.

Die von außen sichtbare Tumorentwicklung war in allen drei Mausgruppen unterschiedlich. Hierbei entwickelte sich nur in den mit PBS behandelten Mäusen zunächst eine Rötung und anschließend eine zum Teil starke Verkrustung der Tumoren, die sich durch gegenseitiges Aufkratzen verschlimmerte. Die Tumoren der mit 425(scFv)-ETA' behandelten Mäuse zeigten erst lange nach der letzten Behandlung eine Rötung, jedoch bis zum Tag der Opfierung keine Verkrustung. Bis auf eine der mit Doxorubicin behandelten Mäuse zeigten alle Tiere dieser Gruppe bis zum Tag der jeweiligen Opfierung weder eine Rötung noch eine Verkrustung der Tumoren. Bis auf ein Tier wiesen jedoch alle mit Doxorubicin behandelten Mäuse einen starken Gewichtsverlust und eine dadurch bedingte generelle Schwäche auf. Dies ging einher mit einer Lähmung der Hinterbeine (Abbildung 24).

A.



B.



Abbildung 24: Darstellung der Paralyse der Hinterbeine einer mit Doxorubicin behandelten Maus.

A. Das Foto zeigt eine Maus aus der Doxorubicin Gruppe zwischen zwei mit PBS behandelten Mäusen (2.7.3). Nur die mit Doxorubicin behandelten Mäuse litten unter einer behandlungsbedingten Paralyse der Hinterbeine. B. Kurz nach dem Aufwachen aus der Betäubung fiel es den Mäusen aus dieser Gruppe schwer, die Hinterbeine auf dem Boden zu behalten.

Die Opferung der Tiere erfolgte aufgrund der jeweiligen äußeren Erscheinung. Zunächst mussten sowohl die mit PBS behandelten Mäuse (aufgrund der Größe beziehungsweise der Verkrustung der Tumoren) als auch die mit Doxorubicin behandelten Mäuse (aufgrund ihrer Schwäche infolge der Behandlung) an Tag 33 geopfert werden. Die mit 425(scFv)-ETA' behandelten Mäuse wurden an Tag 52 zuletzt geopfert.

Nach der Opferung wurden alle Tumoren und einzelne Organe präpariert. Schon allein durch die makroskopische Beurteilung während der Präparation fiel auf, dass die Organe aller Mäuse intakt waren und gesund aussahen. Weiterhin konnte eine sehr gute Vaskularisierung in allen Tumoren verzeichnet werden (Abbildung 25).

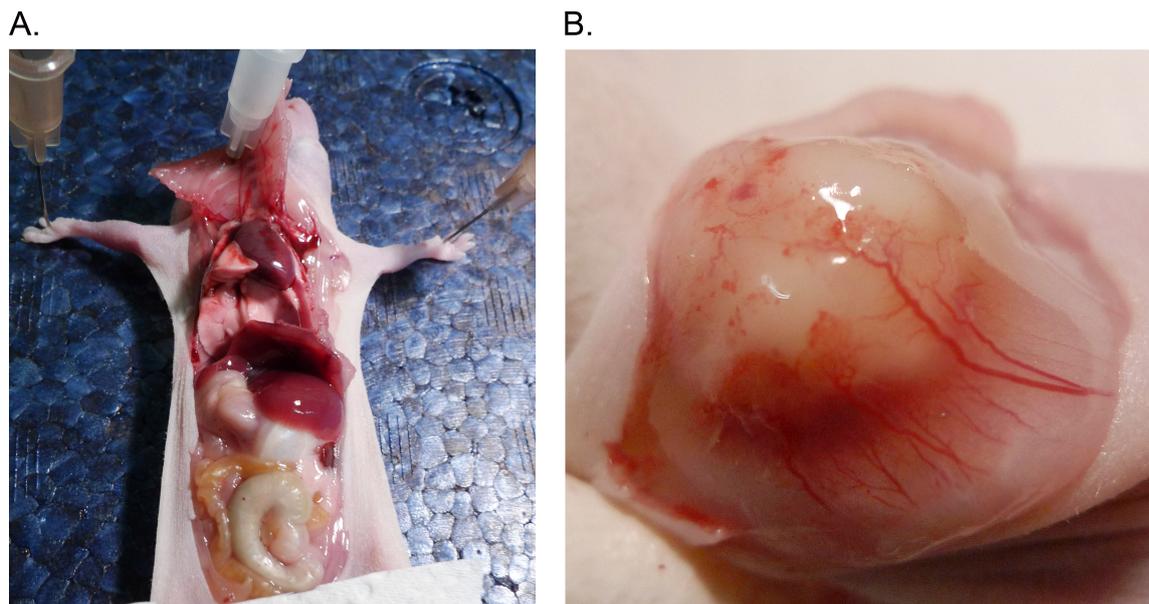


Abbildung 25: Darstellung der Organe und des Tumors während der Präparation aus einer Maus. Nach Opferung der behandelten Mäuse (2.7.3) wurden sowohl die Tumoren als auch einzelne Organe präpariert. A. Präparation der Organe einer Maus aus der Doxorubicin Gruppe. Trotz der starken Gewichtsabnahme und der enormen Schwäche der mit Doxorubicin behandelten Mäuse erschienen alle Organe gesund. B. Die Tumoren aller Mäuse wiesen eine deutlich sichtbare Vaskularisierung auf.

Es wurden sowohl die Tumoren als auch Leber, Milz, Pankreas und eine Niere präpariert und für spätere histologische Untersuchungen eingefroren.

3.4.5 Evaluierung der Tumoren über die optische Darstellung von apoptotischen Zellen während der Behandlung mit 425(scFv)-ETA' und Doxorubicin

Analog zur Darstellung apoptotischer A431scM3-Kat2 Zellen *in vitro* sollte die Apoptose nach Behandlung mit 425(scFv)-ETA' und Doxorubicin auch *in vivo* gezeigt werden. Das hierfür eingesetzte Konstrukt AV-AF750 wurde von Kooperationspartnern (CARIM, Maastricht) zur Verfügung gestellt. Es wurde den Mäusen i.v. appliziert und konnte über die Fluoreszenz im dunkelroten Bereich des Lichtspektrums detektiert werden. Für die Darstellung der apoptotischen Zellen wurden zunächst L3.6pl-Kat2- und L3.6pl-GFP-tragende Mäuse verwendet, die mit einer einmaligen Dosis von 425(scFv)-ETA' behandelt wurden (2.7.4). Hierbei ist die maximal tolerable Dosis des IT gewählt worden (45). Für die Negativkontrolle wurden Mäuse verwendet, denen PBS injiziert wurde. 24 Stunden später erfolgte die Applikation von AV-AF750. Die Messzeitpunkte betragen 10 Stunden, 24 Stunden und 48 Stunden nach AV-AF750 Injektion (Abbildung 26).

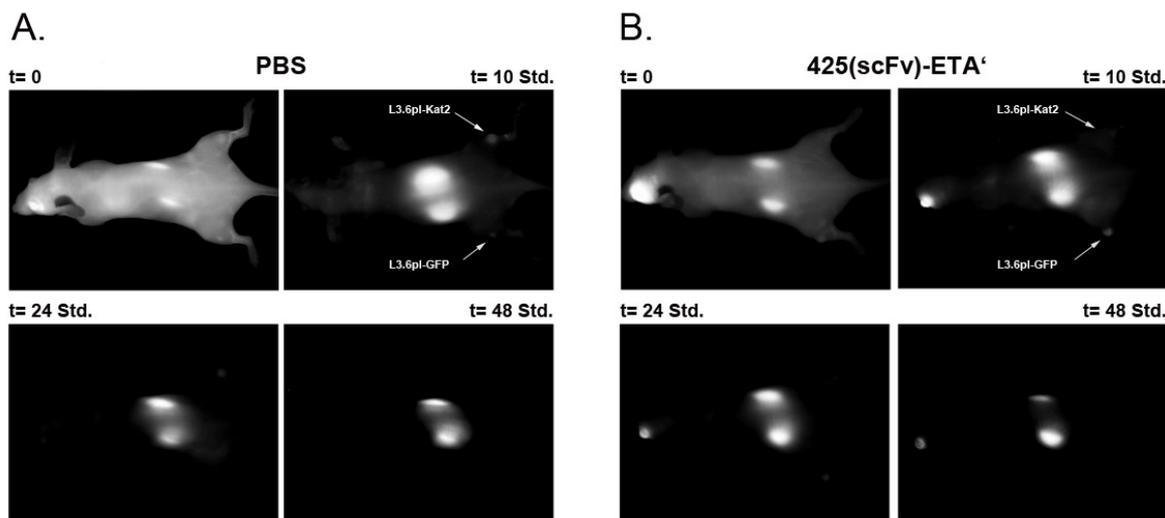


Abbildung 26: Darstellung des AV-AF750-Signals in einer mit PBS als auch mit 425(scFv)-ETA' behandelten Maus.

Gezeigt sind die reinen AV-AF750-Signale nach Abzug der jeweiligen Tumorfluoreszenz sowie des Hintergrundsignals (7.4) direkt nach AV-AF750-Applikation sowie 10 Stunden, 24 Stunden und 48 Stunden danach (2.7.4). Gemessen wurde im dunkelroten Bereich des Lichtspektrums bei 820 - 880 nm.

Wie in der Abbildung zu erkennen, kommt es zu einer relativ schnellen Verteilung sowie einer effizienten renalen Ausscheidung des AV-AF750. Die Akkumulation des Proteins im Tumor ist bereits 10 Stunden nach Applikation zu erkennen und zu diesem Zeitpunkt auch am deutlichsten. 24 Stunden danach nahmen sowohl das Tumorsignal als auch das Signal in den Nieren stetig ab. Nach 72 Stunden war das Signal in den Nieren kaum noch darzustellen. Ein Unterschied in der Signalstärke des AV-AF750 im Tumor in mit 425(scFv)-ETA' behandelten Mäusen und den mit PBS behandelten Tieren war jedoch nicht festzustellen.

Ein zweiter Versuch diente dem Nachweis apoptotischer Zellen in A431scM3-Kat2-tragenden Mäusen, welche mit der wiederholten Dosis des 425(scFv)-ETA' IT oder Doxorubicin behandelt wurden (3.4). Eine modifizierte Variante des AV-AF750 wurde hierbei nach der zweiten Behandlung (Tag 2) appliziert und das Signal nach 10 Stunden, 24 Stunden, 48 Stunden, 72 Stunden und 8 Tagen gemessen (Abbildung 27). Die modifizierte Form des Proteins wies bei seiner Evaluierung im Mausmodell eine höhere Stabilität und bessere Verteilung im Körper auf. Zudem zeigte es ein stärkeres, spezifisches Signal im Vergleich zum Hintergrundsignal (103).

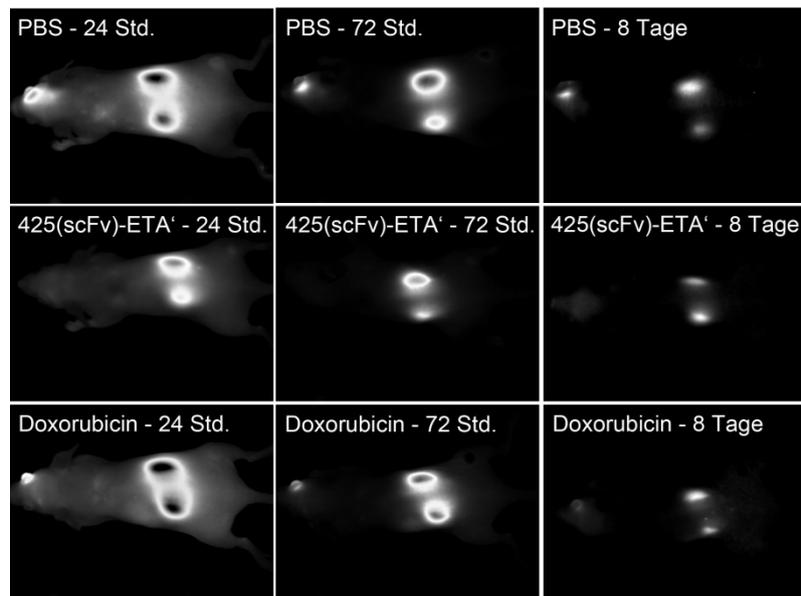


Abbildung 27: Darstellung des AV-AF750-Signals in allen Mausgruppen.

Gezeigt sind die reinen AV-AF750-Signale nach Abzug der Tumorfluoreszenz sowie des Hintergrundsignals (7.4) 24 Stunden, 48 Stunden, 72 Stunden und 8 Tage nach AV-AF750-Applikation (2.7.4). Gemessen wurde im dunkelroten Bereich des Lichtspektrums bei 730 - 950 nm.

Wie bei der Applikation von AV-AF750 in L3.6pl-tragenden Mäusen verteilte sich das Protein sehr schnell im ganzen Körper. Im Gegensatz zum ersten Versuch blieb das Signal jedoch bis zu 8 Tagen nach Applikation des Proteins bestehen. Ein Signal im Tumor konnte bis 72 Stunden nach Applikation beobachtet werden. Jedoch war die Signalstärke im Tumor der mit 425(scFv)-ETA' und Doxorubicin behandelten Mäuse nicht signifikant stärker als im Tumor der mit PBS behandelten Tiere.

3.5 Darstellung der EGF-Rezeptor-Expression von A431scM3-Kat2 Zellen *in vivo* über die spezifische Bindung von 425(scFv)SNAP-747

Die spezifische Bindung von 425(scFv)-ETA' an s.c. applizierte A431scM3-Kat2 Zellen war eine Voraussetzung für die erfolgreiche Behandlung. Mit Hilfe der „SNAP-tag“ Technologie (83) ließ sich die Bindung des 425(scFv) mit dem Maestro™ System darstellen. Hierbei ist der Farbstoff BG-747 über eine Benzylgruppenbindung kovalent an das Fusionsprotein 425(scFv)SNAP gekoppelt worden (2.6.12). Die Bindung von 425(scFv)SNAP-747 konnte anschließend über die emittierte Fluoreszenz im roten Bereich des Farbspektrums detektiert werden (Abbildung 28).

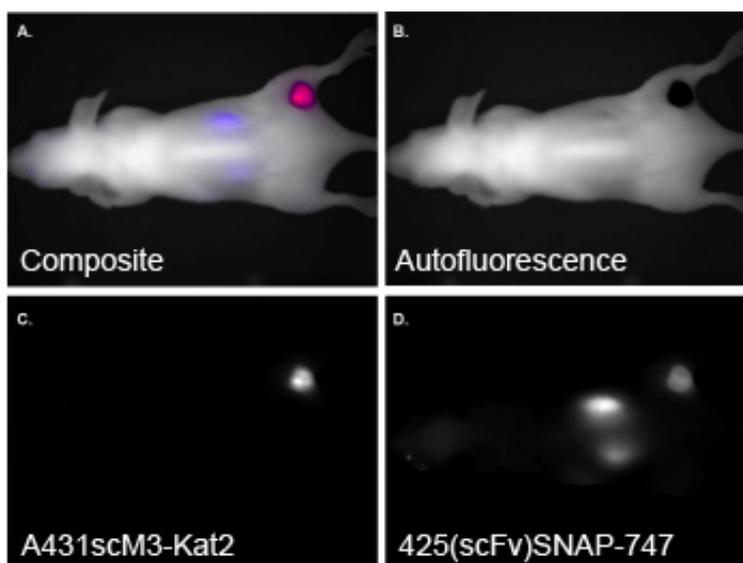


Abbildung 28: Darstellung der Bindung von 425(scFv)SNAP-747 an A431scM3-Kat2 Zellen *in vivo*. Gezeigt ist die Bindung von 425(scFv)SNAP-747 (2.6.12) an s.c. applizierte A431scM3-Kat2 Zellen (2.5.1) *in vivo* in einer Balb/c nu/nu Maus. Die Aufnahmen entstanden durch die Messung im gelben sowie im dunkelroten Bereich des Lichtspektrums mit dem CRi Maestro™ System (1.3.3; 7.4) 10 Stunden nach i.v. Applikation von 425(scFv)SNAP-747 (2.7.5). In Bild A. sind die Signale der Autofluoreszenz, der A431scM3-Kat2 Zellen und von 425(scFv)SNAP-747 in einem Bild dargestellt. Die Bilder B.-D. zeigen die Signale jeweils einzeln, A. „Composite“ Bild: Darstellung von A431scM3-Kat2 Zellen (rotes Signal), 425(scFv)SNAP-747 (blaues Signal) und Autofluoreszenz (weißes Signal), B. Darstellung der Autofluoreszenz im Wellenlängenbereich von 630 – 950 nm, C. Darstellung des A431scM3-Kat2 Signals, D. Darstellung des 425(scFv)SNAP-747 Signals.

Der Nachweis der Bindung von 425(scFv)SNAP-747 an A431scM3-Kat2 Zellen *in vivo* wurde elf Tage nach der Therapie an den sechs mit 425(scFv)-ETA' behandelten Mäusen durchgeführt (2.7.5). Zehn Stunden nach Applikation von 425(scFv)SNAP-747 konnte ein starkes Signal im Tumor verzeichnet werden. Die jeweilige Fluoreszenzintensität im Tumor wurde hierbei in Relation zum Hintergrundsignal berechnet. Hierbei ergab sich ein mittleres Tumor- zu Hintergrundsignal von 17,5. Das Signal in den Nieren resultiert aus der relativ schnellen und effizienten Ausscheidung des 425(scFv)SNAP-747 Konstruktes.

4 Diskussion

Heutzutage stellt Krebs eine der häufigsten Todesursachen dar. Dabei kann generell jedes Organ im menschlichen Körper betroffen sein. Oftmals ist eine Therapie nur bei einer frühen Diagnose erfolgreich. Neben der operativen Entfernung der Tumoren werden Chemo- und Radiotherapien eingesetzt, welche jedoch durch ihre unspezifische Wirkweise schwerwiegende Nebenwirkungen hervorrufen können. Aus diesem Grund besteht ein hoher Bedarf an Therapeutika, welche die Tumorzellen gezielt vernichten, ohne das gesunde Gewebe zu schädigen. *In vitro* erfolgreich getestete Therapeutika müssen vor ihrem Einsatz in der Klinik *in vivo* auf ihre Verträglichkeit hin getestet werden. Bisherige Untersuchungen zur Pharmakologie, sowie zu bestimmten Behandlungseffekten, wurden dabei zu verschiedenen Zeitpunkten *ex vivo* durchgeführt. Dies implizierte einen hohen Aufwand an Versuchstieren. Ein weiterer Nachteil dieser Methodik bestand in der hohen Varianz der Versuchsergebnisse, da die verwendeten Einzeltiere trotz der gemeinsamen genetischen Herkunft nicht immer vollkommen identisch reagieren (104; 105). Dies kann bei Messungen zu verschiedenen Zeitpunkten problematisch sein, weil die Ergebnisse unterschiedlicher Mäuse zu verschiedenen Zeitpunkten nicht unbedingt in unmittelbarem Zusammenhang gebracht werden können. Es erfordert daher noch mehr Tiere pro gemessenem Zeitpunkt, um die Varianz auszugleichen.

Mit dem Einsatz der molekularen Bildgebung im Bereich der klinischen Forschung konnten verschiedene Therapeutika in ein und demselben Tier evaluiert werden, was einerseits die Anzahl an Versuchstieren herabsetzte und andererseits die statistische Signifikanz der Ergebnisse erhöhte, da jedes einzelne Tier selbst auch als Kontrolle fungierte. Mit der fluoreszenzbasierten molekularen Bildgebung war es weiterhin möglich, gänzlich auf schädliche, radioaktiv markierte Substanzen zu verzichten, um Therapieeffekte zu visualisieren. Dabei ist die Nutzung von rot fluoreszierenden Proteinen von Vorteil, da in diesem längerwelligen Bereich des sichtbaren Spektrums keine Absorption endogener Moleküle auftritt (106-108). In dieser Arbeit wurde die fluoreszenzbasierte molekulare Bildgebung dazu genutzt, Behandlungseffekte *in vivo* zu visualisieren. Hierbei wurde mit rot fluoreszierenden Tumorzellen epidermoiden sowie pankreaskarzinogenen Ursprungs gearbeitet, die sich aufgrund der Nutzung des stabilen und außerordentlich stark fluoreszierenden Proteins Kat2 sehr gut in der Maus darstellen ließen. Die Behandlung wurde mit dem IT 425(scFv)-ETA' durchgeführt, welches bereits in einem präventiven Ansatz viel versprechende Ergebnisse zur Therapie des Pankreaskarzinoms gezeigt hat. Des Weiteren

wurde das klinisch zugelassene Chemotherapeutikum Doxorubicin eingesetzt. Aufgrund seiner unspezifischen Wirkweise zeigte Doxorubicin trotz der verwendeten klinisch relevanten Dosis deutliche Nebenwirkungen. Die Tiere erlitten einen starken Gewichtsverlust, welcher zu einer allgemeinen körperlichen Schwäche führte. Des Weiteren kam es teilweise zu Paralysen der Hinterbeine. Im Gegensatz dazu traten bei den mit dem IT behandelten Mäusen keine äußerlich sichtbaren Nebenwirkungen auf. Für beide Therapeutika konnte der Therapieerfolg anhand der Beurteilung der Tumorgöße über die Messung der Tumorfluoreszenz optisch dargestellt werden. Hierbei wurde deutlich, dass die Berechnung der Tumorgößen auf Basis der durch die molekulare Bildgebung erhaltenen Daten exakter war als die manuelle Berechnung über die makroskopische Messung mit der Schieblehre. Eine Analyse der Daten bestätigte die makroskopischen Beobachtungen, nach denen eine Therapie mit dem Chemotherapeutikum zu einer Reduzierung der Tumorgöße führte. Die Behandlung mit 425(scFv)-ETA' konnte die bestehende Tumorgöße nicht verringern, sie führte jedoch im Vergleich zur Negativkontrollgruppe zu einem verlangsamten Tumorwachstum.

4.1 Systemische/Technische Voraussetzungen für die erfolgreiche Visualisierung von Behandlungseffekten

Eine erfolgreiche Visualisierung von Therapieeffekten *in vivo* ist abhängig von mehreren Faktoren, wie z.B. der Wahl des geeigneten Tumormodells sowie des Systems zur Detektion der Behandlungseffekte. Daher waren Vorüberlegungen zu den Grundvoraussetzungen wichtig, die schließlich zu einer erfolgreichen Darstellung der Tumoren führten, so dass der Behandlungsfortschritt allein durch die molekulare Bildgebung beobachtet und kontrolliert werden konnte.

4.1.1 Wahl des Tumormodells

Die Wahl des Tumormodells richtete sich nach dem verwendeten Therapeutikum. In früheren Studien konnte die Wirksamkeit des IT 425(scFv)-ETA' in einem präklinischen, präventiven Ansatz *in vivo* dokumentiert werden (45). Die Effektivität des IT ist in der vorgenannten Arbeit durch histochemische Analysen *ex vivo* nachgewiesen worden. Dies war eine ideale Voraussetzung für die Nutzung von 425(scFv)-ETA' zur Etablierung der Visualisierung von Behandlungseffekten *in vivo*. *In vitro* Experimente zur Überprüfung der spezifischen Toxizität des IT zeigten jedoch mit einer IC_{50} von ca. 70 ng/ml eine ca. zehnfach geringere Toxizität

auf die seinerzeit in den *in vivo* Versuchen verwendete Pankreaskarzinomzelllinie L3.6pl. Dies ist vermutlich auf eine vorausgegangene Mykoplasmeninfektion zurückzuführen. Es ist bekannt, dass Infektionen dieser Art zu Veränderungen in der Genexpression führen können, welche die Sensitivität von Zelllinien beeinflussen kann (109; 110). Die epidermoide Karzinomzelllinie A-431 ist im Vergleich zu L3.6pl durch eine höhere EGFR-Dichte sowie Sensitivität gegenüber 425(scFv)-ETA' gekennzeichnet. In der vorliegenden Arbeit wurden deshalb diese Zellen *in vivo* eingesetzt. Die Verwendung von A-431-basierten Tumormodellen ist auch durch andere Arbeitsgruppen bereits beschrieben worden (46; 101; 111; 112). Unabhängig davon wurden im Rahmen dieser Arbeit in der Maus passagierte Zellen verwendet, um eine möglichst hohe Anwachsrate zu gewährleisten. Die Verbesserung der Anwachsrate durch die Injektion von bereits in der Maus passagierten Zellen, wurde in unserem Labor bereits für eine andere Zelllinie gezeigt (21).

Weitere wichtige Kriterien zur Auswahl des Tumormodells bestanden in der Transfizierbarkeit der Zelllinie sowie in der Fluoreszenzintensität nach Transfektion mit dem fluoreszierenden Protein, da die Analysen der Behandlungseffekte vornehmlich aufgrund der Fluoreszenz der verwendeten Zellen stattfinden sollten. Unspezifisches Fluoreszenzsignal kann einerseits durch die Nutzung von Fluoreszenzfarbstoffen (wie z.B. GFP) erzeugt werden, die im selben Bereich des Lichtspektrums absorbieren wie endogene Moleküle (69; 72). Andererseits bedingen schwach fluoreszierende Stoffe eine Zunahme der Belichtungszeit, was ebenfalls zu einer Erhöhung des Hintergrundsignals führen kann. Aus diesem Grund wurde für die Transfektion ein Protein ausgewählt, welches ein hohes Emissionsmaximum im dunkelroten Bereich des Lichtspektrums aufweist. Kat2 zeigt zudem eine 7 - 10fach stärkere Fluoreszenzintensität als andere rot fluoreszierende Proteine, wie z.B. HcRed oder mPlum. Diese Eigenschaften bedingen eine sehr gute Voraussetzung für die Analyse von Echtzeit-Aufnahmen *in vivo* (113; 114), da die Generierung eines möglichen Störsignals damit auf ein Minimum reduziert wird.

Für die Etablierung der Visualisierung von Behandlungseffekten wurde ein subkutanes Tumormodell gewählt (115). Zwar eignen sich orthotope Modelle besser für die Übertragung des Krankheitsbildes und der Therapie auf den Menschen (116; 117). Jedoch kann man mit subkutan implantierten Zellen viel größere Tumoren erzeugen, die auch von außen zumindest in ihrer Größe beurteilt werden können. Weiterhin wurde angenommen, dass durch die höhere Zelldichte ein stärkeres Fluoreszenzsignal erzeugt wird, was die Erfassung durch die molekulare Bildgebung für den hier angestrebten Nachweis des Wirkprinzips vereinfacht.

Die Visualisierung fluoreszierender Tumorzellen spielt bei der Grundlagenforschung eine große Rolle. So werden beispielsweise transgene, fluoreszierende Tiere eingesetzt, welche nach Einbringung von andersfarbig fluoreszierenden Tumorzellen zur Untersuchung von Tumor-Wirt Interaktionen, wie z.B. die Visualisierung von Tumor-Stromazelldynamiken oder die Tumorzellwanderung und damit die Entstehung von Metastasen, genutzt werden (118). Jedoch ist der Einsatz intrinsisch leuchtender Tumorzellen nicht nur für die Tumor-Lokalisation, sondern auch für die *in vivo* Evaluierung neuer Therapeutika ein Ansatz, welcher bereits Erfolg gezeigt hat. Hierbei wurden sowohl biolumineszente Zellen als auch grün oder rot fluoreszierende Zellen verwendet, um orthotop eingebrachte Tumoren zu visualisieren (119-121). Die Fluoreszenz der Zellen wurde hierbei genutzt, um die Tumorgöße an verschiedenen Zeitpunkten zu bestimmen, ohne auf invasive Methoden zurückgreifen zu müssen. Dabei wurden die Effekte verschiedener Therapeutika evaluiert. In allen Studien konnten die Primärtumoren eindeutig dargestellt und anhand des Lumineszenz- bzw. Fluoreszenzsignals in ihrer Größe beurteilt werden. Limitierend ist der Ansatz jedoch bei der Detektion von Mikrometastasen. Die Fluoreszenz einzelner Zellen ist je nach ihrer Tiefe im Gewebe nicht stark genug, um durch die Haut visualisiert zu werden. Rot fluoreszierende Zellen besitzen aufgrund ihres höheren Energieniveaus eine stärkere Durchdringungstiefe als Zellen mit einer Emission im kürzerwelligen Bereich, die bis zu mehreren Zentimetern reichen kann (122; 123). Außerdem interferiert die Fluoreszenz rot leuchtender Zellen aufgrund ihres Spektrums im längerwelligen Bereich des Lichtes bei der Messung nicht mit der Autofluoreszenz im grünen, kürzerwelligen Bereich des Lichtes. Dennoch konnte die rote Fluoreszenz einzelner Zellen in den angeführten Studien bisher nicht durch die Haut detektiert werden. Beschränkungen zur Detektion von Fluoreszenzsignalen können auch durch Ablagerungen von Blut, Zellen und Zellschrott zwischen Tumor und Haut entstehen (121).

4.1.2 Das Maestro™ System

Die im Rahmen dieser Arbeit generierten *in vivo* Daten wurden hauptsächlich mit dem Maestro™ System der Firma CRi erstellt und ausgewertet. Durch die enorme Breite des messbaren Wellenlängenbereichs sowie die individuell anwendbaren Mittel zur Auswertung der gemessenen Daten bietet das System die Möglichkeit zur gleichzeitigen Untersuchung verschiedener Fragestellungen im lebenden Tier. Das Maestro™ System ist ebenfalls dazu genutzt worden, die Tumorgöße optisch zu bestimmen. Anders als bei der Vermessung der

Tumoren mit der Schieblehre wird die Tumorgroße hier durch das Programm über die gemessene Fläche des Fluoreszenzsignals bestimmt. Die gemessene Fläche entspricht daher also der tatsächlichen Tumorfläche. Somit sollte die Messung genauer sein als die Messung mit der Schieblehre, bei welcher mindestens noch die Haut in die Messung mit einbezogen wird.

4.2 Die Therapie mit 425(scFv)-ETA' im Vergleich zur Therapie mit Doxorubicin

Die Therapie mit Chemotherapeutika ist neben der operativen Entfernung des Tumors und der Radiotherapie eine der gängigsten Methoden zur Behandlung von Krebserkrankungen. Dabei sind bisher viele Chemotherapeutika für die Behandlung unterschiedlichster Krebsarten zugelassen. Trotz der allgemein hohen Erfolgsquote sind die Nebenwirkungen aufgrund der unspezifischen Wirkweise jedoch sehr hoch (124-127), was zu einer starken Beeinträchtigung der Lebensqualität führt. Daher ist die Forderung nach anderen, spezifischeren Therapiemöglichkeiten hoch. Die Kopplung von Antikörpern und später auch Antikörperfragmenten an verschiedene Toxine versprach ein Mittel, Krebszellen spezifisch zu erkennen und zu zerstören. Diese Entdeckung intensivierte die Forschung auf diesem Gebiet.

Bis heute sind viele dieser IT bis zur präklinischen Phase erfolgreich getestet worden (128-131). Eines dieser Konstrukte ist 425(scFv)-ETA', welches aus diesem Grund im Rahmen der vorliegenden Arbeit zur Etablierung eines Behandlungsmodells mit anschließender Beobachtung der Therapieeffekte durch fluoreszenzbasierte molekulare Bildgebung eingesetzt wurde. Weiterhin wurde Doxorubicin als ein in der Klinik standardmäßig angewandtes Chemotherapeutikum verwendet. Die mit Doxorubicin behandelten Tiere wiesen nach der Behandlung eine im Durchschnitt deutlich geringere Tumorgroße auf als die mit PBS und 425(scFv)-ETA' behandelten Mäuse. Doxorubicin wird zur Behandlung von einer Reihe von Krebserkrankungen wie z.B. Karzinomen, Sarkomen und hämatologischen Krebserkrankungen eingesetzt. Bekannte Nebenwirkungen von Doxorubicin sind toxische Effekte auf verschiedene Organe wie Leber, Nieren, Herz und Gehirn (132). Trotz der verwendeten, klinisch relevanten Dosis waren auch in den für diese Studie durchgeführten Versuchen Nebeneffekte zu erkennen und an den Verhaltensweisen der Tiere auszumachen. Die Mäuse, welche mit Doxorubicin behandelt wurden, zeigten im Laufe des Versuches eine starke Gewichtsreduzierung. Die zunehmende allgemeine Schwäche hinderte die Tiere teilweise an der Futteraufnahme. Dies wurde daran deutlich, dass die Tiere ihr Gewicht

hielten oder sogar wieder zunahmen, nach dem das Futter in den Käfig gelegt wurde. Weiterhin ließen die mit Doxorubicin behandelten Mäuse im weiteren Versuchsverlauf Lähmungserscheinungen erkennen, welche es ihnen erschwerten, die Hinterbeine zu bewegen. Die Behandlung mit dem Chemotherapeutikum ließ auch akute toxische Effekte erkennen. Die retrobulbäre Verabreichung der Therapeutika führte bei den mit Doxorubicin behandelten Tieren oft zu einer unmittelbaren Blutung aus dem Auge, die bei den mit PBS sowie mit 425(scFv)-ETA' behandelten Mäusen ausblieb. Dies ist vermutlich auf akute toxische Wirkungen des Chemotherapeutikums auf innerhalb der Augenhöhle liegendes Gewebe zurückzuführen. Nach Opferrung der Mäuse wurden die Organe präpariert. Anders als erwartet zeigten die Organe nach makroskopischer Untersuchung keine Anzeichen von toxischen Effekten. Das Gewebe sowie die Organe wirkten optisch gesund.

Im Gegensatz zu den mit Doxorubicin behandelten Mäusen zeigten die mit 425(scFv)-ETA' behandelten Tiere keine durch das IT bedingten, physischen Einschränkungen. Es wurde keine Gewichtsreduzierung beobachtet und die Tiere blieben während des gesamten Behandlungszeitraums aktiv und zeigten ein normales Sozialverhalten. Dies kann hauptsächlich durch die spezifische Wirkweise des IT erklärt werden. Im Gegensatz zur generellen Induktion des Zelltods proliferierender Zellen wirkt das IT durch seine spezifische und hochaffine Bindung an den EGFR nur auf Zellen, die diesen Rezeptor exprimieren (133). Dabei ist die Wirkung auf Zellen mit einer hohen Expressionsrate des Rezeptors besonders hoch. Die verwendeten A-431-Zellen zeigten eine sehr hohe Sensitivität gegenüber 425(scFv)-ETA', wohingegen der Effekt auf Zellen mit geringerer EGFR-Dichte nicht so stark ausgeprägt war. Jedoch korrelierte die unterschiedlich starke, jedoch insgesamt geringere EGFR-Dichte im Vergleich zur Rezeptordichte auf den A-431-Zellen, bei der Untersuchung verschiedener, EGFR-positiver Pankreaskarzinomzelllinien nicht mit der gemessenen Zytotoxizität des IT. Dies liegt daran, dass die Funktionalität eines IT nicht nur mit der Internalisierungskapazität zusammenhängt. Tumorzellen exprimieren Proteine, welche der Apoptose entgegen wirken und die jeweilige Zelle in einem Zustand der Zellproliferation hält (134; 135). Dabei ist die Genexpression verschiedener anti-apoptotischer Proteine in jedem Zelltyp unterschiedlich, so dass es zu unterschiedlich ausgeprägten Resistenzen gegenüber Therapeutika kommen kann. Es ist z.B. bekannt, dass das IT 425.3PE, bestehend aus einem kovalent an *Pseudomonas aeruginosa* Exotoxin A gekoppelten Antikörper gegen den EGFR, eine signifikante Reduktion des anti-apoptotischen Proteins Mcl-I in der Brustkrebszelllinie MA-II herbeiführt, jedoch nicht auf die anti-apoptotischen Proteine Bcl-2 und Bcl-X_L wirkt (136). Kombinationstherapien mit Agenzien, welche zusätzlich auf anti-

apoptotische Proteine wirken, könnten die spezifische Wirkung von IT auf einigen Tumorzelllinien verbessern. ABT-737 ist ein Bcl-2, Bcl-xl und Bcl-w neutralisierendes Agens, welches bereits in Kombination mit *Pseudomonas aeruginosa* Exotoxin A basierten IT *in vitro* eingesetzt wurde (137). Es konnte gezeigt werden, dass die spezifische Wirkung des IT um das 20fache gesteigert werden konnte. Dies lag hierbei nicht nur an der Neutralisierung anti-apoptotischer Proteine, vielmehr verbessert ABT-737 zusätzlich die Freisetzung von Konstrukten, welche über das ER geleitet werden, vom ER ins Zytosol und erhöht somit dort die Anzahl an reaktiven Molekülen. Erst im Zytosol der Zelle kommt es zur Entfaltung der toxischen Wirkung von ETA', was das Risiko einer unspezifischen Toxizität in der Blutzirkulation und umgebendem Gewebe deutlich herabsetzt. Die Rezeptorspezifität des IT in Kombination mit der Aktivierung der Wirkung im Zytosol limitieren stark die Nebeneffekte, welche mit unspezifischen Chemotherapeutika wie Doxorubicin auftreten. Das macht die Therapie mit IT erstrebenswert.

Vergleicht man die verabreichte Dosis von Doxorubicin (579,98 g/mol) und 425(scFv)-ETA' (70000 g/mol) auf einer molaren Basis (Doxorubicin: 0,17 µmol; 425(scFv)-ETA': 0,14 nmol) miteinander, wird deutlich, dass zudem eine 1214fach geringere Molekülmenge des IT für die Therapie eingesetzt wurde. Diese hat schon zu signifikanten Effekten im Vergleich zur Kontrollgruppe geführt. In den durchgeführten Versuchen wurden pro Injektion 10 µg des IT verabreicht. Die maximal tolerable Dosis, d.h. die höchste verabreichbare Dosis in Balb/c nu/nu Mäusen, welche nicht zu inakzeptablen toxischen Effekten führt, ist 20 µg (45). Obwohl die Therapie schon zu einer verlängerten Lebensdauer im Vergleich zur Kontrollgruppe und zu einer weitaus besseren Lebensqualität im Vergleich zur Gruppe, welche das Chemotherapeutikum erhalten hat, geführt hat, kann das Therapieziel durch die Verabreichung einer etwas erhöhten IT-Dosis oder die Variation des Behandlungsschemas womöglich noch verbessert werden. Unter diesen Umständen gewährt das IT potentiell eine spezifisch gerichtete Therapie von EGFR-positiven Tumorerkrankungen, wie z.B. Epithelkarzinom, Pankreaskarzinom oder Mammakarzinom. Weiterhin kann die Therapie durch eine Kombination von Chemotherapeutikum und IT verbessert werden. Hierbei würde das Chemotherapeutikum zunächst dazu genutzt, die bestehende Tumormasse zu verringern, während das IT anschließend zur spezifischen Bekämpfung einzelner, überdauernder Zellen eingesetzt wird.

4.3 Vergleich der Methoden zur Messung der Tumorgröße

Im Rahmen dieser Arbeit wurden zwei verschiedene Messmethoden zur Bestimmung der Tumorgröße eingesetzt. Zum einen wurden die Tumoren mit der Schieblehre vermessen und zum anderen über das emittierte Fluoreszenzsignal mit dem Maestro™ System. Die Messung mit der Schieblehre wird heute noch häufig eingesetzt, sie hat jedoch einige Nachteile. Die Tumoren können erst ab einer bestimmten Größe mit dem Gerät erfasst werden. Bedingt durch die Messung „von außen“, ist die Dicke der Haut sowie der subkutan liegenden Fettschichten im Messwert mit inbegriffen. Messungengenauigkeiten sind daher erwiesen. Weiterhin können Tumoren, welche nach innen gerichtet wachsen, nicht akkurat vermessen werden. Daher kann es zu teilweise starken Messabweichungen kommen. Diese Fehlerquellen sind in der Literatur bereits diskutiert worden, wobei die Messung mit der Schieblehre mit anderen Messmethoden, wie z.B. Mikro-CT, verglichen worden ist (138; 139). In diesen Experimenten stellte sich heraus, dass die Messung subkutan liegender Tumoren mit der Schieblehre aufgrund der bereits genannten Faktoren inakkurater ist als die beschriebenen Alternativmethoden. Dies ließ sich auch für die in dieser Arbeit beschriebenen Versuche bestätigen. Während die Tumorfläche einerseits durch das Programm des Maestro™ Systems errechnet wurde, wurde andererseits der Durchmesser des Tumors mit der Schieblehre gemessen und die Fläche mit der Formel zur Berechnung der Fläche einer Ellipse berechnet: $d_1/2 \cdot d_2/2 \cdot \pi$, wobei d_1 und d_2 die jeweiligen gemessenen Durchmesser eines Tumors wiedergeben. Die unterschiedlichen Ergebnisse beider Messmethoden lagen hierbei in den errechneten Werten für die Tumorfläche sowie in der Standardabweichung der Werte innerhalb einer Gruppe zu den unterschiedlichen Zeitpunkten. Wie auch in der Literatur beschrieben, waren die errechneten Tumorflächen aufgrund der Messergebnisse mit der Schieblehre deutlich größer als die vom Maestro™ System errechneten Flächen. Die Standardabweichung stieg dabei mit der Tumorgröße an, was auch JENSEN *et al.* bereits zeigen konnte (138). Die mit dem IT behandelte Gruppe zeigte ähnliche Standardabweichungen mit beiden Messmethoden. In der mit Doxorubicin behandelten Gruppe war die Abweichung bei der Messung mit der Schieblehre sogar geringer. Dies zeigt, dass die mit der Schieblehre gemessenen Daten nicht nur in eine Richtung unterschiedlich sein können. Zum einen können die gemessenen Werte dadurch größer sein, dass Haut und Fettgewebe mit vermessen werden. Zum anderen kann der Tumor in seiner Form so weit nach innen reichen, dass die gemessene Größe weit unter der tatsächlichen liegt. Die Bestimmung der Tumorfläche durch die „Software“ des Maestro™ Systems wäre wesentlich akkurater, da

sie über die Pixelintensität der fluoreszierenden Fläche erfolgt. Zur Bestimmung der exakten Tumorgröße ist eine Messung des Tumorumfanges zu bevorzugen. Dies ist mit der Schieblehre kaum möglich, da die Berechnungen der Tumorgröße nur auf zwei Messwerten basieren können.

Um die Abweichungen bei der Messung mit der Schieblehre als auch mit dem Maestro™ System genau bestimmen zu können, müssen beide Methoden anhand eines genauen Standards gemessen werden. Dies kann die Messung der exakten Tumorgröße nach Entnahme der Tumoren sein. Dazu hätten die Tiere zu unterschiedlichen Zeitpunkten geopfert werden müssen, um die Messmethoden bei Tumoren unterschiedlicher Größe vergleichen zu können. Dies war jedoch innerhalb dieser Studie nicht möglich, da das Experiment primär der Therapie und des optischen Nachweises von Behandlungseffekten *in vivo* über einen längeren Zeitraum diene. Ein statistisch genauer Vergleich der Messung der Tumorgröße mit dem Maestro™ System und mittels Schieblehre ist hier daher nicht möglich.

Das Maestro™ System erfasst nicht nur das Fluoreszenzsignal, es misst auch seine Intensität. Basierend auf der Annahme, dass stärker nach innen gewachsene Tumoren auch ein stärkeres Fluoreszenzsignal erzeugen, wurde im Rahmen dieser Arbeit versucht, mögliche Behandlungseffekte über die Veränderung in der Fluoreszenzintensität darzustellen. Hierbei wurde in einigen Tieren der mit PBS behandelten Kontrollgruppe eine anfängliche Zunahme der Fluoreszenzintensität beobachtet, die dann plötzlich abnahm (Abbildung 21). Es ist unklar, womit dies zusammenhängt. Es wurde angenommen, dass die Fluoreszenzintensität aufgrund einer Tumornekrose abnimmt, die oft im Zentrum von Tumoren aufgrund mangelnder Blutversorgung auftritt (140) und mit weiterem Wachstum des Tumors wieder zunimmt. Aus diesem Grund wurde die Fluoreszenzintensität mit der gemessenen Tumorfläche korreliert. Ob dies ein genaueres Maß der tatsächlichen Tumorgröße darstellt, kann jedoch noch nicht abschließend geklärt werden.

Wie bereits beschrieben, ist die Fluoreszenz im roten Bereich des Lichtspektrums durch ein höheres Energieniveau gekennzeichnet, was zu einer stärkeren Durchdringungstiefe des Gewebes führt als z.B. die Fluoreszenz im grünen Bereich des Lichtes. Das hat dazu geführt, dass die Nutzung roter Fluoreszenzfarbstoffe in der optischen, molekularen Bildgebung neben dem zu erwartenden geringeren Autofluoreszenzsignal einen Vorteil bei der Messung tiefergelegener Gewebe bietet. Dem Nachweis einzelner, rot fluoreszierender Zellen mit Hilfe der optischen Bildgebung sind jedoch Grenzen gesetzt. In vorangegangenen Versuchen mit rot fluoreszierenden Zellen konnten wir feststellen, dass zuweilen auch größere, subkutan liegende Tumoren nicht unbedingt von allen Seiten der Maus zu sehen waren.

Möglicherweise ist bei stark nach innen gerichteten Tumoren die Detektion der roten Fluoreszenz nur bis zu einer bestimmten Tiefe möglich, so dass nur ein Teil des Tumors optisch sichtbar ist. Zusammen mit einer möglichen Fluoreszenzabnahme durch die eintretende Tumornekrose könnte dies der Grund für die gemessene Unabhängigkeit von Tumorgöße und Fluoreszenzintensität sein.

Eine weitere Ursache der Inkonsistenz in der Fluoreszenzintensität könnte in einem Verlust der Fluoreszenzaktivität des Kat2 Proteins liegen. Die verwendeten A431scM3 Zellen sind transient mit dem Protein transfiziert worden. Bei der transienten Transfektion besteht die Gefahr, dass die eingebrachte Fremd-DNA enzymatisch abgebaut wird. Wird die DNA jedoch stabil in das Wirtsgenom eingebaut, kann sie bei der Zellteilung an die Tochterzelle weitergegeben werden. Durch Aufrechterhaltung eines Selektionsdruckes können diese Zellen selektiert werden. So ein ungerichteter Einbau der Fremd-DNA ins Genom kann jedoch dazu führen, dass es zur Gen-Stillegung oder -Repression kommt (141). Möglicherweise ist das der Grund für den beobachteten Rückgang in der Fluoreszenzintensität. Ein Fluoreszenzverlust nach Implantation rot fluoreszierender Zellen *in vivo* konnte in unserem Labor bereits in Versuchen mit einer Zelllinie des Pankreaskarzinoms beobachtet werden. In zukünftigen Versuchen werden Zellen eingesetzt, in denen Kat2 durch eine gerichtete Transfektion in die Zelle eingebracht worden ist. Damit kann ein plötzlicher Fluoreszenzverlust *in vivo* ausgeschlossen und von einer kontinuierlichen Expression des Kat2-Proteins ausgegangen werden.

4.4 Die Messung apoptotischer Zellen *in vivo* über die Bindung von Annexin A5

Eine weitere Möglichkeit, Behandlungseffekte *in vivo* darzustellen, bot sich durch die apoptoseinduzierende Wirkung von ETA'. Diese ist in der Literatur bereits beschrieben worden (93) und wurde auch im Rahmen dieser Arbeit *in vitro* durch die Bindung von Annexin A5 gezeigt. Annexin A5 ist ursprünglich als ein Protein zur Hemmung der Blutgerinnung entdeckt worden. Erst später erkannte man seinen diagnostischen Nutzen zur Darstellung apoptotischer Zellen und markierte das Protein zu deren Nachweis mit Biotin oder radioaktiven Stoffen (56). In dieser Arbeit wurde ein Annexin A5-EGFP Fusionsprotein für die Darstellung der apoptoseinduzierenden Wirkung von 425(scFv)-ETA' *in vitro* verwendet. Dieses wird in 293T Zellen in hohen Mengen exprimiert, so dass für den Einsatz *in vitro* der proteinhaltige, ungereinigte Zellkulturüberstand eingesetzt werden kann (84).

Abhängig von der Konzentration an eingesetztem 425(scFv)-ETA' konnte eine bestimmte Apoptoserate nach 24 Stunden ermittelt werden.

Für den Einsatz *in vivo* wurde das von Kooperationspartnern (CARIM, Maastricht) zur Verfügung gestellte AV-AF750 verwendet. Dieses fluoresziert im dunkelroten Bereich des Lichtspektrums und ist somit aufgrund der verminderten Hintergrundfluoreszenz besser für die Darstellung von Apoptose *in vivo* geeignet als EGFP markiertes Annexin A5. Die Darstellung der apoptoseinduzierenden Wirkung von 425(scFv)-ETA' *in vivo* ist eine Herausforderung, da mehr Faktoren in Betracht gezogen werden müssen als bei der Darstellung von Apoptose *in vitro*. Einerseits ist bekannt, dass Tumorzellen auch ohne äußere Einwirkung PS exprimieren (142; 143). Man würde bei der Darstellung apoptotischer Zellen *in vivo* demnach schon ein gewisses Hintergrundsignal durch gebundenes Annexin A5 erwarten. Dies macht es schwierig, therapiebedingte, mögliche geringe Zunahmen des Signals zu erfassen. Des Weiteren sind im Körper auch andere apoptotische Zellen vorhanden, die ebenfalls mit AV-AF750 detektierbar wären. So könnten weitere Signale unabhängig vom Tumorsignal gemessen werden. Abgesehen von den zu erwartenden Hintergrundsignalen muss die Pharmakokinetik von AV-AF750 bekannt sein, um den bestmöglichen Zeitpunkt zur optischen Bildgebung nach Verabreichung des Proteins bestimmen zu können.

In den durchgeführten Experimenten konnte während der Behandlung keine Zunahme des Signals im Tumor der mit 425(scFv)-ETA' oder Doxorubicin behandelten Mäuse im Vergleich zu den Tumoren in der mit PBS behandelten Kontrollgruppe beobachtet werden. Dabei sind zunächst L3.6pl Zellen eingesetzt worden, deren Apoptoserate nach einmaliger Behandlung mit 425(scFv)-ETA' im Vergleich zur Kontrollgruppe bestimmt werden sollte. Um den Zeitpunkt des bestmöglichen Signals ermitteln zu können, wurden die Mäuse zu verschiedenen Zeitpunkten mit der molekularen Bildgebung untersucht. Hierbei stellte sich heraus, dass das intensivste Signal zehn Stunden nach Verabreichung von AV-AF750 erscheint, jedoch ist dies nicht nur im Tumor, sondern durch die relativ effiziente renale Ausscheidung viel stärker auch in den Nieren vertreten.

Die L3.6pl-Zellen sind gegenüber 425(scFv)-ETA' um ca. ein zehnfaches unempfindlicher als ursprünglich beschrieben (44). Nachdem mit diesen Zellen keine apoptoseinduzierende Wirkung des ITs *in vivo* gezeigt werden konnte, wurde eine ca. 700fach sensitivere Zelllinie für die *in vivo* Versuche gewählt. Für die Epithelkarzinomzelllinie A-431 konnte *in vitro* eine IC₅₀ von 0,1 ng/ml dargestellt werden. Um eine höhere Anwachsrate der Zellen in der Maus von vornherein zu begünstigen, wurden A-431 Zellen zunächst im Tier passagiert, bevor sie für den eigentlichen Versuch eingesetzt wurden. Des Weiteren wurde die Behandlung mit

einer mehrmaligen Dosis von 425(scFv)-ETA' durchgeführt. Parallel dazu wurde eine Gruppe mitgeführt, welche mit einer mehrmaligen Dosis des klinisch relevanten Chemotherapeutikums Doxorubicin behandelt wurde. In diesem Versuch wurden die Behandlungseffekte über die kontinuierliche Messung der Tumorgrößen dargestellt. Anhand dieser Ergebnisse konnte die Wirksamkeit der Therapie zu jedem Messzeitpunkt begutachtet werden, was es ermöglichte, AV-AF750 zu einem Zeitpunkt zu verabreichen, an dem die Wirkung der Therapie sichtbar war. Demnach mussten zu diesem Zeitpunkt apoptotische Zellen vorhanden sein. Die Tatsache, dass in diesem Versuch keine gesteigerte Bindung von AV-AF750 in den mit 425(scFv)-ETA' und Doxorubicin behandelten Mäusen im Vergleich zur Kontrollgruppe nachgewiesen werden konnte, liegt demnach nicht in einer unzureichenden Therapie begründet.

In diesem zweiten *in vivo* Versuch zur Therapie mit 425(scFv)-ETA' bzw. Doxorubicin ist eine andere AV-AF750 Präparation verwendet worden. Diese ist im Vergleich zur im ersten Versuch verwendeten Präparation durch ein in seiner Aminosäuresequenz verändertes Annexin A5 Protein gekennzeichnet, welches eine Cystein-spezifische Konjugation von Liganden erlaubt (103). Der Ligand ist somit an einer definierten Position lokalisiert, die außerhalb der Binderegion von Annexin A5 liegt. Das optimierte Protein weist eine höhere Stabilität und bessere Verteilung im Körper auf. Des Weiteren zeigte es im Vergleich zum ersten Annexin A5 Konstrukt ein stärkeres, spezifisches Signal im Vergleich zum Hintergrundsignal. Der Einsatz einer gegenüber dem IT sensitiveren Zelllinie und die Nutzung eines Konstruktes, welches sich durch ein besseres Verhältnis von spezifischem Signal zum Hintergrundsignal auszeichnet, diente einer besseren Voraussetzung zur Detektion apoptotischer Zellen *in vivo*.

In den Experimenten zur Evaluierung des optimierten Annexin A5 Proteins wurde in der Leber von NMRI-Mäusen Apoptose mittels i.v. Applikation eines Anti-Fas-Antikörpers induziert. Den Tieren wurde 90 Minuten später das radioaktiv markierte, optimierte Annexin A5 Konstrukt appliziert. Eine Stunde später erfolgte die Untersuchung mittels molekularer Bildgebung (μ SPECT) bzw. die Opferung der Tiere mit anschließender histologischer Untersuchung des Gewebes. Das beschriebene Anti-Fas Modell führt bei mehr als der Hälfte der Hepatozyten zu einer Apoptoseinduktion innerhalb 150 Minuten. Die Tiere sterben ca. vier Stunden nach Injektion des Anti-Fas-Antikörpers. Die Sensitivität von SPECT und Fluoreszenz-basierten Messungen liegt in einem ähnlichen Bereich (SPECT: 10^{-10} - 10^{-11} molar, Fluoreszenz: 10^{-9} - 10^{-12} molar; (69)). Eventuell ist die Apoptoserate nach 425(scFv)-ETA' und Doxorubicin Behandlung womöglich geringer und somit nicht nachweisbar.

Weiterhin wird in den Studien zur Evaluierung des optimierten Annexin A5 Konstruktes das Protein bereits 90 Minuten nach Apoptoseinduktion appliziert. Basierend auf unseren *in vitro*-Versuchen, in denen wir 24 Stunden nach Inkubation mit 425(scFv)-ETA' früh apoptotische Zellen nachgewiesen haben, wurde AV-AF750 *in vivo* erst 24 Stunden nach der Verabreichung von 425(scFv)-ETA' appliziert. Eventuell ist dies für die Detektion apoptotischer Zellen *in vivo* zu spät. Apoptotische Zellen könnten *in vivo* möglicherweise schneller durch Makrophagen abgebaut werden und sind daher nicht so lange nachweisbar wie in *in vitro* Versuchen.

Anders als die erste AV-AF750 Präparation zeigte die zweite ein weitaus länger anhaltendes Signal in den Nieren, was auf eine Bindung des Proteins an dieses Gewebe deutet. Die erhöhte Aufnahme dieses Konstruktes in die Nieren wurde bereits bei der Evaluierung festgestellt. In diesen Experimenten fand eine Beobachtung jedoch nur bis zu maximal vier Stunden nach Apoptoseinduktion statt. Das anhaltende Signal in den Nieren spielt bei der Detektion von Apoptose *in vivo* eine große Rolle. So könnte der nicht nachweisbare Unterschied in der Signalstärke im Tumor in den Therapiegruppen und der Kontrollgruppe darauf basieren, dass die Signalstärken im Tumor aufgrund der viel geringeren Darstellung optisch nicht unterschieden werden können.

Ein Nachteil bei der Verwendung von AV-AF750 besteht darin, dass die spezifische Bindung von Annexin A5 nach der Konjugation mit AF750 aufgrund der Fluoreszenz im dunkelroten Bereich des Lichtspektrums nicht im Durchflusszytometer bestätigt werden kann. Die Funktionalität des Konstruktes wurde vor der Konjugation mit dem Farbstoff durch CARIM gezeigt. Der Einsatz von möglicherweise in seiner spezifischen Bindung beeinträchtigtem AV-AF750 kann demnach nicht ganz ausgeschlossen werden. Dies würde erklären, weshalb kein spezifisches Signal beobachtet werden konnte.

4.5 Der Nachweis des EGF-Rezeptors nach der Therapie

Es ist bekannt, dass Krebszellen verschiedene regulatorische Zellprozesse beeinflussen können. Dies kann zur Metastasierung, Aufrechterhaltung der Angiogenese oder unkontrollierter Proliferation führen (144; 145).

Anders als die bereits zugelassenen, an den EGFR bindenden, Therapeutika wirkt 425(scFv)-ETA' nicht über die Blockierung von Bindungsstellen bzw. der Inhibierung der durch Aktivierung der Tyrosinkinase in Gang gesetzten Signalkaskade. Durch Bindung an den EGFR wird eine rezeptorvermittelte Endozytose ausgelöst, die das IT in die Zelle

aufnimmt. Die Zerstörung der Zelle erfolgt über die durch das Toxin induzierte Apoptose. Die Abtötung der Zelle nach Aufnahme des IT und Transport in das Zytosol verhindert die Aktivierung der Zellproliferation über andere Signalwege. Nichtsdestotrotz ist der Nachweis des EGFR nach der Therapie nötig, um eine mögliche, durch das IT induzierte, Herunterregulierung Membran-gebundener Rezeptoren auszuschließen. Dies wurde in der vorliegenden Arbeit durch die Nutzung desgleichen 425(scFv) erreicht, welcher auch im IT eingesetzt wurde. Nach Kopplung des 425(scFv) an den Fluoreszenzfarbstoff BG-747 über das „SNAP-tag“ und intravenöser Applikation in die zuvor mit 425(scFv)-ETA' behandelten Tiere, konnte ein deutliches Fluoreszenzsignal im Tumor detektiert werden. Dabei ist zwischen der Verabreichung des IT und der Applikation von 425(scFv)SNAP-747 ein Zeitintervall von elf Tagen berücksichtigt worden, um eine Blockierung der Bindung durch möglicherweise noch gebundenes 425(scFv)-ETA' zu verhindern. Die Bindung von 425(scFv)SNAP-747 an die Tumorzellen lässt darauf schließen, dass der EGFR auch nach Verabreichung des IT exprimiert wird und sich im Behandlungszeitraum keine Resistenz entwickelt hat, was eine wichtige Voraussetzung für die weitere Nutzung des IT in der präklinischen Phase ist. Hierbei wurde nicht untersucht, ob die EGFR-Expression während des gesamten Behandlungszeitraums konstant geblieben ist. Eine durch die Behandlung etwas, womöglich nur zeitweise verringerte Expression ist denkbar und soll in weiterführenden Experimenten untersucht werden.

4.6 Ausblick

Im Rahmen dieser Arbeit wurden mit Kat2 transfizierte Zellen *in vivo* eingesetzt, um anschließend den Verlauf der Behandlung mit Hilfe der molekularen Bildgebung zu verfolgen. Dies ist einerseits für die Reduzierung der Anzahl an Tieren für *in vivo* Experimente wichtig, andererseits wird so die Varianz der Ergebnisse deutlich herabgesetzt, da die Messung zu verschiedenen Zeitpunkten an demselben Tier stattfinden kann. Dies steigert die Signifikanz eines Ergebnisses. Mit Kat2 transfizierte A431scM3 Zellen konnten über ihre starke Fluoreszenz im dunkelroten Bereich des Lichtspektrums ohne störendes Hintergrundsignal in der Maus dargestellt werden. Für die Etablierung des Systems zur Beobachtung von Behandlungserfolgen auf Basis der molekularen Bildgebung sind die Zellen zunächst transient transfiziert und anschließend selektiert worden. Selektierte, stark rot fluoreszierende Zellen konnten über mehrere Wochen ohne Selektionsdruck in Kultur gehalten werden, wobei keine Reduktion in der Fluoreszenz zu beobachten war. Auch

während der *in vivo* Versuche ließ sich keine Reduktion in der Fluoreszenz erkennen. Längerfristig sollten jedoch stabil transfizierte Zellen in der Maus eingesetzt werden, um einen möglichen Fluoreszenzverlust zu vermeiden.

Die Behandlung mit 425(scFv)-ETA' war im Vergleich zur Behandlung mit Doxorubicin verträglicher. Doxorubicin führte zwar zu einer Tumorreduktion, zeigte jedoch aufgrund der unspezifischen Toxizität starke Nebenwirkungen, sodass die Mäuse früher geopfert werden mussten als die mit 425(scFv)-ETA' behandelten Tiere. Die mit 425(scFv)-ETA' behandelten Mäuse zeigten ein verlangsamtes Tumorstadium im Vergleich zu den mit PBS behandelten Tieren. Im Gegensatz zu den mit dem Chemotherapeutikum behandelten Tieren wiesen sie keine äußerlich sichtbaren Nebenwirkungen auf. Eine Optimierung des Behandlungsschemas könnte den Therapieeffekt verstärken und im besten Fall zu einer vollständigen Tumorregression führen. Dies konnte im zeitlichen Rahmen der Arbeit leider nicht verwirklicht werden und steht daher noch aus.

Für die Etablierung der Therapie mit dem IT wurde die Epithelkarzinomzelllinie A-431 ausgewählt, da diese Zelllinie sich am sensitivsten gegenüber 425(scFv)-ETA' zeigte. Weiterhin ist die Sensitivität verschiedener Pankreaskarzinomzelllinien (wie z.B. SU.86.86) sowie deren Potential, *in vivo* Tumoren auszubilden, getestet worden. Diese Zellen sollten daher ebenfalls im Mausmodell eingesetzt werden.

Nach vollständiger Evaluierung von Therapieeffekten im subkutanen Mausmodell sollten sowohl disseminierte als auch orthotope Modelle eingesetzt werden. Orthotop implantierte Krebszellen wachsen in ihrem ursprünglichen Gewebe und können spontane Metastasierung auslösen (121). Die Effektivität neuer Therapeutika kann so in einem natürlicheren Umfeld getestet werden als bei der Evaluierung im subkutanen Mausmodell. Daher sind diese Modelle besser auf den Menschen übertragbar. Aufgrund der sowohl in disseminierten als auch orthotopen Modellen von außen nicht sichtbaren Tumorentwicklung ist die molekulare Bildgebung als nicht-invasive Methode geeignet, um diese Gewebe zu untersuchen. Die optische Darstellung tieferliegender Metastasen ist jedoch zum jetzigen Zeitpunkt noch eine Herausforderung. Daher muss zunächst die Reichweite der Kat2 Fluoreszenz sowie die Darstellung tieferliegender Gewebe in Abhängigkeit von ihrer Größe *in vivo* getestet werden. Versuche zur Etablierung der Evaluation von Therapeutika in diesen Modellen sind zur Zeit Gegenstand bestehender Projekte und bilden die Voraussetzung zur Durchführung klinischer Versuche.

5 Zusammenfassung

Präklinische *in vivo* Analysen von Behandlungseffekten sind eine wichtige Voraussetzung für die Evaluation neuer Therapeutika. Die optische molekulare Bildgebung im dunkelroten bzw. NIR Bereich stellt dabei eine aussichtsreiche Methodik dar, da sie Messungen an verschiedenen Zeitpunkten in einem einzigen Tier ermöglicht. Dies reduziert nicht nur die Anzahl der benötigten Tiere, sondern erhöht ebenfalls die statistische Signifikanz der Ergebnisse.

A-431 Zellen verfügen über eine enorm hohe Expression des epidermalen Wachstumsfaktor Rezeptors (EGFR), einem Antigen, welcher auf mehreren Krebszelllinien überexprimiert ist und daher ein therapeutisch interessantes Ziel darstellt. Ein bekanntes Problem in der EGFR-spezifischen Therapie ist jedoch die Herunterregulierung des Rezeptors.

Die Zielsetzung des Projektvorhabens bestand in der Darstellung von Therapieeffekten durch Nutzung der optischen molekularen Bildgebung. Hierbei wurden hauptsächlich drei verschiedene Ansätze getestet. Einerseits sollten Tumorzellen zum Einsatz kommen, deren Wachstum während der Therapie über eine zellinherente Fluoreszenz direkt *in vivo* verfolgt werden kann. Weiterhin sollte die induzierte Apoptose über ein fluoreszenz-markiertes Annexin A5-basiertes Molekül nachgewiesen werden. Im Anschluss an die durchgeführte Behandlung sollte die Rezeptorexpression mittels eines Rezeptor-spezifischen Konstruktes nachgewiesen werden, um eine mögliche Resistenzentwicklung über die Herunterregulierung des Rezeptors auszuschließen.

Für die *in vivo* Versuche wurden zuvor in der Maus passagierte A-431 Tumorzellen mit dem dunkelrot fluoreszierenden Protein Katushka (Kat2) transfiziert. Mit einem von uns generierten IT, bestehend aus einem gegen den EGFR gerichteten scFv fusioniert an eine Deletionsmutante von *Pseudomonas aeruginosa* Exotoxin A (425(scFv)-ETA'), konnte eine spezifische Bindung sowie hohe Toxizität auf den A-431 Zellen dargestellt werden. Die fluoreszierenden A431scM3-Kat2 Zellen wurden *in vivo* s.c. appliziert. Nach Anwachsen der Tumoren wurde eine Behandlung mit dem IT oder mit dem Chemotherapeutikum Doxorubicin durchgeführt. Die Tumorgrößen wurden anhand der zellinherenten Fluoreszenz an verschiedenen Zeitpunkten gemessen.

Darüber hinaus wurde die EGFR-Expression am Tumor durch Bindung des gleichen 425(scFv) gekoppelt an einen NIR-Farbstoff überprüft.

Die Behandlung mit dem IT 425(scFv)-ETA' führte zu einem verlangsamten Tumorwachstum, ohne jedoch den allgemeinen Gesundheitszustand der Tiere zu beeinflussen, wie es bei der Behandlung mit dem Chemotherapeutikum Doxorubicin der Fall war.

Die hier dargestellte Methodik ermöglicht es, mehrere Parameter gleichzeitig in einem Tier zu kontrollieren, wie z.B. das Tumorwachstum und die Rezeptorexpression. Dies ist insbesondere bei der *in vivo* Evaluation neuer Therapeutika wichtig und kann zur Kontrolle der Behandlung von unterschiedlichen Tumorentitäten angewendet werden.

6 Literaturverzeichnis

1. Trancas B, Cardoso G, Luengo A, Vieira C, Reis D. [Depression in cancer patients: diagnostic and therapeutic considerations]. *Acta Med Port* 2010;**23**(6):1101–1112.
2. Ghetie V, Vitetta E. Immunotoxins in the therapy of cancer: from bench to clinic. *Pharmacol Ther* 1994;**63**(3):209–234.
3. Pastan I, Hassan R, Fitzgerald DJ, Kreitman RJ. Immunotoxin therapy of cancer. *Nat Rev Cancer* 2006;**6**(7):559–565.
4. Pastan I, Hassan R, Fitzgerald DJ, Kreitman RJ. Immunotoxin Treatment of Cancer*. *Annu Rev Med* 2007;**58**(1):221–237.
5. Thrush GR, Lark LR, Clinchy BC, Vitetta ES. Immunotoxins: an update. *Annu Rev Immunol* 1996;**14**:49–71.
6. Foss F. Clinical experience with denileukin diftitox (ONTAK). *Semin Oncol* 2006;**33**(1 Suppl 3):S11–6.
7. Pappenheimer AM. Diphtheria toxin. *Annu Rev Biochem* 1977;**46**:69–94.
8. Kreitman RJ, Wilson WH, Bergeron K, Raggio M, Stetler-Stevenson M, FitzGerald DJ, Pastan I. Efficacy of the anti-CD22 recombinant immunotoxin BL22 in chemotherapy-resistant hairy-cell leukemia. *N Engl J Med* 2001;**345**(4):241–247.
9. Wayne AS, Kreitman RJ, Findley HW, Lew G, Delbrook C, Steinberg SM, Stetler-Stevenson M, FitzGerald DJ, Pastan I. Anti-CD22 Immunotoxin RFB4(dsFv)-PE38 (BL22) for CD22-Positive Hematologic Malignancies of Childhood: Preclinical Studies and Phase I Clinical Trial. *Clin Cancer Res* 2010;**16**(6):1894–1903.
10. Dosio F, Brusa P, Cattel L. Immunotoxins and Anticancer Drug Conjugate Assemblies: The Role of the Linkage between Components. *Toxins* 2011;**3**(7):848–883.
11. Allured VS, Collier RJ, Carroll SF, McKay DB. Structure of exotoxin A of *Pseudomonas aeruginosa* at 3.0-Angstrom resolution. *Proc Natl Acad Sci USA* 1986;**83**(5):1320–1324.
12. Hwang J, FitzGerald DJ, Adhya S, Pastan I. Functional domains of *Pseudomonas* exotoxin identified by deletion analysis of the gene expressed in *E. coli*. *Cell* 1987;**48**(1):129–136.
13. Kreitman RJ, Batra JK, Seetharam S, Chaudhary VK, FitzGerald DJ, Pastan I. Single-chain immunotoxin fusions between anti-Tac and *Pseudomonas* exotoxin: relative importance of the two toxin disulfide bonds. *Bioconjug Chem* 1993;**4**(2):112–120.
14. Ogata M, Fryling CM, Pastan I, FitzGerald DJ. Cell-mediated cleavage of *Pseudomonas* exotoxin between Arg279 and Gly280 generates the enzymatically active fragment which translocates to the cytosol. *J Biol Chem* 1992;**267**(35):25396–25401.

15. Chiron MF, Fryling CM, FitzGerald DJ. Cleavage of pseudomonas exotoxin and diphtheria toxin by a furin-like enzyme prepared from beef liver. *J Biol Chem* 1994;**269**(27):18167–18176.
16. Theuer C, Kasturi S, Pastan I. Domain II of Pseudomonas exotoxin A arrests the transfer of translocating nascent chains into mammalian microsomes. *Biochemistry* 1994;**33**(19):5894–5900.
17. Weldon JE, Pastan I. A guide to taming a toxin - recombinant immunotoxins constructed from Pseudomonas exotoxin A for the treatment of cancer. *FEBS J.* 2011;**278**(23):4683–4700.
18. Kreitman RJ, Hansen HJ, Jones AL, FitzGerald DJ, Goldenberg DM, Pastan I. Pseudomonas exotoxin-based immunotoxins containing the antibody LL2 or LL2-Fab' induce regression of subcutaneous human B-cell lymphoma in mice. *Cancer Res* 1993;**53**(4):819–825.
19. Kreitman RJ, Bailon P, Chaudhary VK, FitzGerald DJ, Pastan I. Recombinant immunotoxins containing anti-Tac(Fv) and derivatives of Pseudomonas exotoxin produce complete regression in mice of an interleukin-2 receptor-expressing human carcinoma. *Blood* 1994;**83**(2):426–434.
20. Barth S, Huhn M, Matthey B, Tawadros S, Schnell R, Schinköthe T, Diehl V, Engert A. Ki-4(scFv)-ETA', a new recombinant anti-CD30 immunotoxin with highly specific cytotoxic activity against disseminated Hodgkin tumors in SCID mice. *Blood* 2000;**95**(12):3909–3914.
21. Barth S, Huhn M, Matthey B, Schnell R, Tawadros S, Schinköthe T, Lorenzen J, Diehl V, Engert A. Recombinant anti-CD25 immunotoxin RFT5(SCFV)-ETA' demonstrates successful elimination of disseminated human Hodgkin lymphoma in SCID mice. *Int J Cancer* 2000;**86**(5):718–724.
22. Ribbert T, Thepen T, Tur MK, Fischer R, Huhn M, Barth S. Recombinant, ETA'-based CD64 immunotoxins: improved efficacy by increased valency, both in vitro and in vivo in a chronic cutaneous inflammation model in human CD64 transgenic mice. *Br. J. Dermatol.* 2010;**163**(2):279–286.
23. Haisma HJ, Grill J, Curiel DT, Hoogeland S, van Beusechem VW, Pinedo HM, Gerritsen WR. Targeting of adenoviral vectors through a bispecific single-chain antibody. *Cancer Gene Ther* 2000;**7**(6):901–904.
24. Takahashi H, Herlyn D, Atkinson B, Powe J, Rodeck U, Alavi A, Bruce DA, Koprowski H. Radioimmunodetection of human glioma xenografts by monoclonal antibody to epidermal growth factor receptor. *Cancer Res* 1987;**47**(14):3847–3850.
25. Salomon DS, Brandt R, Ciardiello F, Normanno N. Epidermal growth factor-related peptides and their receptors in human malignancies. *Crit Rev Oncol Hematol* 1995;**19**(3):183–232.
26. Libermann TA, Razon N, Bartal AD, Yarden Y, Schlessinger J, Soreq H. Expression of epidermal growth factor receptors in human brain tumors. *Cancer Res* 1984;**44**(2):753–760.

27. Tolmachev V, Rosik D, Wällberg H, Sjöberg A, Sandström M, Hansson M, Wennborg A, Orlova A. Imaging of EGFR expression in murine xenografts using site-specifically labelled anti-EGFR 111In-DOTA-Z EGFR:2377 Affibody molecule: aspect of the injected tracer amount. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* 2010;**37**(3):613–622.
28. Hendler FJ, Ozanne BW. Human squamous cell lung cancers express increased epidermal growth factor receptors. *J Clin Invest* 1984;**74**(2):647–651.
29. Haigler H, Ash JF, Singer SJ, Cohen S. Visualization by fluorescence of the binding and internalization of epidermal growth factor in human carcinoma cells A-431. *Proc Natl Acad Sci USA* 1978;**75**(7):3317–3321.
30. Lurje G, Lenz H-J. EGFR signaling and drug discovery. *Oncology* 2009;**77**(6):400–410.
31. Smith JJ, Derynck R, Korc M. Production of transforming growth factor alpha in human pancreatic cancer cells: evidence for a superagonist autocrine cycle. *Proc Natl Acad Sci USA* 1987;**84**(21):7567–7570.
32. Kobrin MS, Funatomi H, Friess H, Buchler MW, Stathis P, Korc M. Induction and expression of heparin-binding EGF-like growth factor in human pancreatic cancer. *Biochem Biophys Res Commun* 1994;**202**(3):1705–1709.
33. Ebert M, Yokoyama M, Kobrin MS, Friess H, Lopez ME, Buchler MW, Johnson GR, Korc M. Induction and expression of amphiregulin in human pancreatic cancer. *Cancer Res* 1994;**54**(15):3959–3962.
34. Yamanaka Y, Friess H, Kobrin MS, Buchler M, Beger HG, Korc M. Coexpression of epidermal growth factor receptor and ligands in human pancreatic cancer is associated with enhanced tumor aggressiveness. *Anticancer Res* 1993;**13**(3):565–569.
35. Lorimer IA, Keppler-Hafkemeyer A, Beers RA, Pegram CN, Bigner DD, Pastan I. Recombinant immunotoxins specific for a mutant epidermal growth factor receptor: targeting with a single chain antibody variable domain isolated by phage display. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996;**93**(25):14815–14820.
36. Cohen MH, Williams GA, Sridhara R, Chen G, Pazdur R. FDA drug approval summary: gefitinib (ZD1839) (Iressa) tablets. *Oncologist* 2003;**8**(4):303–306.
37. Penne K, Bohlin C, Schneider S, Allen D. Gefitinib (Iressa, ZD1839) and tyrosine kinase inhibitors: the wave of the future in cancer therapy. *Cancer Nurs* 2005;**28**(6):481–486.
38. Cohen MH, Johnson JR, Chen Y-F, Sridhara R, Pazdur R. FDA drug approval summary: erlotinib (Tarceva) tablets. *Oncologist* 2005;**10**(7):461–466.
39. Vincenzi B, Zoccoli A, Pantano F, Venditti O, Galluzzo S. Cetuximab: from bench to bedside. *Curr Cancer Drug Targets* 2010;**10**(1):80–95.
40. Giusti RM, Shastri KA, Cohen MH, Keegan P, Pazdur R. FDA drug approval summary: panitumumab (Vectibix). *Oncologist* 2007;**12**(5):577–583.

41. Camp ER, Summy J, Bauer TW, Liu W, Gallick GE, Ellis LM. Molecular mechanisms of resistance to therapies targeting the epidermal growth factor receptor. *Clin Cancer Res* 2005;**11**(1):397–405.
42. Li C, Iida M, Dunn EF, Ghia AJ, Wheeler DL. Nuclear EGFR contributes to acquired resistance to cetuximab. *Oncogene* 2009;**28**(43):3801–3813.
43. Arteaga CL. EGF receptor as a therapeutic target: patient selection and mechanisms of resistance to receptor-targeted drugs. *J Clin Oncol* 2003;**21**(23 Suppl):289s–291s.
44. Bruell D, Stöcker M, Huhn M, Redding N, Küpper M, Schumacher P, Paetz A, Bruns CJ, Haisma HJ, Fischer R, Finnern R, Barth S. The recombinant anti-EGF receptor immunotoxin 425(scFv)-ETA' suppresses growth of a highly metastatic pancreatic carcinoma cell line. *Int J Oncol* 2003;**23**(4):1179–1186.
45. Bruell D, Bruns CJ, Yezhelyev M, Huhn M, Müller J, Ischenko I, Fischer R, Finnern R, Jauch K-W, Barth S. Recombinant anti-EGFR immunotoxin 425(scFv)-ETA' demonstrates anti-tumor activity against disseminated human pancreatic cancer in nude mice. *Int J Mol Med* 2005;**15**(2):305–313.
46. Shao W, Zhao S, Liu Z, Zhang J, Ma S, Sato JD, Zhang P, Tong M, Han J, Wang Y, Bai D, Wang F, Sun L. Inhibition of human tumor xenograft growth in nude mice by a conjugate of monoclonal antibody LA22 to epidermal growth factor receptor with anti-tumor antibiotics mitomycin C. *Biochem Biophys Res Commun* 2006;**349**(2):816–824.
47. Li M, Wang X, Li W, Li F, Yang H, Wang H, Brunicardi FC, Chen C, Yao Q, Fisher WE. Somatostatin receptor-1 induces cell cycle arrest and inhibits tumor growth in pancreatic cancer. *Cancer Sci* 2008;**99**(11):2218–2223.
48. Chen H, Sun B, Pan S, Jiang H, Sun X. Dihydroartemisinin inhibits growth of pancreatic cancer cells in vitro and in vivo. *Anticancer Drugs* 2009;**20**(2):131–140.
49. Yoshizawa J, Takizawa A, Takeuchi O, Hiraku O, Sasaki K, Morimoto Y, Atsuda K, Inoue G, Suzuki Y, Asanuma F, Yamada Y. Experimental study of combination therapy with S-1 against pancreatic cancer. *Cancer Chemother Pharmacol* 2009;**64**(6):1211–1219.
50. Gavrieli Y, Sherman Y, Ben-Sasson SA. Identification of programmed cell death in situ via specific labeling of nuclear DNA fragmentation. *J Cell Biol* 1992;**119**(3):493–501.
51. Chaudhuri P, Soni S, Sengupta S. Single-walled carbon nanotube-conjugated chemotherapy exhibits increased therapeutic index in melanoma. *Nanotechnology* 2010;**21**(2):025102.
52. Wolf BB, Schuler M, Echeverri F, Green DR. Caspase-3 is the primary activator of apoptotic DNA fragmentation via DNA fragmentation factor-45/inhibitor of caspase-activated DNase inactivation. *J Biol Chem* 1999;**274**(43):30651–30656.

53. Matters GL, Harms JF, McGovern CO, Jayakumar C, Crepin K, Smith ZP, Nelson MC, Stock H, Fenn CW, Kaiser J, Kester M, Smith JP. Growth of human pancreatic cancer is inhibited by down-regulation of gastrin gene expression. *Pancreas* 2009;**38**(5):e151–61.
54. Jennewein M, Lewis MA, Zhao D, Tsyganov E, Slavine N, He J, Watkins L, Kodibagkar VD, O'Kelly S, Kulkarni P, Antich PP, Hermanne A, Rösch F, Mason RP, Thorpe PE. Vascular imaging of solid tumors in rats with a radioactive arsenic-labeled antibody that binds exposed phosphatidylserine. *Clin Cancer Res* 2008;**14**(5):1377–1385.
55. Blankenberg FG, Katsikis PD, Tait JF, Davis RE, Naumovski L, Ohtsuki K, Kopywoda S, Abrams MJ, Darkes M, Robbins RC, Maecker HT, Strauss HW. In vivo detection and imaging of phosphatidylserine expression during programmed cell death. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998;**95**(11):6349–6354.
56. Boersma HH, Kietselaer BLJH, Stolk LML, Bennaghmouch A, Hofstra L, Narula J, Heidendal GAK, Reutelingsperger CPM. Past, present, and future of annexin A5: from protein discovery to clinical applications. *J Nucl Med* 2005;**46**(12):2035–2050.
57. Blankenberg FG. In vivo detection of apoptosis. *J Nucl Med* 2008;**49** Suppl 2:81S–95S.
58. Narula J, Acio ER, Narula N, Samuels LE, Fyfe B, Wood D, Fitzpatrick JM, Raghunath PN, Tomaszewski JE, Kelly C, Steinmetz N, Green A, Tait JF, Leppo J, Blankenberg FG, Jain D, Strauss HW. Annexin-V imaging for noninvasive detection of cardiac allograft rejection. *Nat Med* 2001;**7**(12):1347–1352.
59. Belhocine T, Steinmetz N, Hustinx R, Bartsch P, Jerusalem G, Seidel L, Rigo P, Green A. Increased uptake of the apoptosis-imaging agent (99m)Tc recombinant human Annexin V in human tumors after one course of chemotherapy as a predictor of tumor response and patient prognosis. *Clin Cancer Res* 2002;**8**(9):2766–2774.
60. Weissleder R, Mahmood U. Molecular imaging. *Radiology* 2001;**219**(2):316–333.
61. Massoud TF, Gambhir SS. Molecular imaging in living subjects: seeing fundamental biological processes in a new light. *Genes Dev* 2003;**17**(5):545–580.
62. Contag PR. Whole-animal cellular and molecular imaging to accelerate drug development. *Drug Discov Today* 2002;**7**(10):555–562.
63. Weissleder R. Molecular imaging in cancer. *Science* 2006;**312**(5777):1168–1171.
64. Shah K, Jacobs A, Breakefield XO, Weissleder R. Molecular imaging of gene therapy for cancer. *Gene Ther* 2004;**11**(15):1175–1187.
65. Jiang S, Gnanasammandhan MK, Zhang Y. Optical imaging-guided cancer therapy with fluorescent nanoparticles. *J R Soc Interface* 2010;**7**(42):3–18.
66. Tjuvajev JG, Stockhammer G, Desai R, Uehara H, Watanabe K, Gansbacher B, Blasberg RG. Imaging the expression of transfected genes in vivo. *Cancer Res* 1995;**55**(24):6126–6132.

67. Gambhir SS, Barrio JR, Phelps ME, Iyer M, Namavari M, Satyamurthy N, Wu L, Green LA, Bauer E, MacLaren DC, Nguyen K, Berk AJ, Cherry SR, Herschman HR. Imaging adenoviral-directed reporter gene expression in living animals with positron emission tomography. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999;**96**(5):2333–2338.
68. Bui T, Thompson CB. Cancer's sweet tooth. *Cancer Cell* 2006;**9**(6):419–420.
69. Alford R, Ogawa M, Choyke PL, Kobayashi H. Molecular probes for the in vivo imaging of cancer. *Mol Biosyst* 2009;**5**(11):1279–1291.
70. Weissleder R. A clearer vision for in vivo imaging. *Nat Biotechnol* 2001;**19**(4):316–317.
71. Gong H, Kovar J, Little G, Chen H, Olive DM. In vivo imaging of xenograft tumors using an epidermal growth factor receptor-specific affibody molecule labeled with a near-infrared fluorophore. *Neoplasia* 2010;**12**(2):139–149.
72. Gurskaya NG, Fradkov AF, Terskikh A, Matz MV, Labas YA, Martynov VI, Yanushevich YG, Lukyanov KA, Lukyanov SA. GFP-like chromoproteins as a source of far-red fluorescent proteins. *FEBS Lett* 2001;**507**(1):16–20.
73. Wang L, Jackson WC, Steinbach PA, Tsien RY. Evolution of new nonantibody proteins via iterative somatic hypermutation. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004;**101**(48):16745–16749.
74. Shkrob MA, Yanushevich YG, Chudakov DM, Gurskaya NG, Labas YA, Poponov SY, Mudrik NN, Lukyanov S, Lukyanov KA. Far-red fluorescent proteins evolved from a blue chromoprotein from *Actinia equina*. *Biochem J* 2005;**392**(Pt 3):649–654.
75. Chalfie M, Tu Y, Euskirchen G, Ward WW, Prasher DC. Green fluorescent protein as a marker for gene expression. *Science* 1994;**263**(5148):802–805.
76. Shcherbo D, Merzlyak EM, Chepurnykh TV, Fradkov AF, Ermakova GV, Solovieva EA, Lukyanov KA, Bogdanova EA, Zarausky AG, Lukyanov S, Chudakov DM. Bright far-red fluorescent protein for whole-body imaging. *Nat Methods* 2007;**4**(9):741–746.
77. Hoffman RM. Visualization of GFP-expressing tumors and metastasis in vivo. *BioTechniques* 2001;**30**(5):1016–22, 1024–6.
78. Yang M, Baranov E, Jiang P, Sun FX, Li XM, Li L, Hasegawa S, Bouvet M, Al-Tuwaijri M, Chishima T, Shimada H, Moossa AR, Penman S, Hoffman RM. Whole-body optical imaging of green fluorescent protein-expressing tumors and metastases. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000;**97**(3):1206–1211.
79. Moore A, Sergeev N, Bredow S, Weissleder R. A model system to quantitate tumor burden in locoregional lymph nodes during cancer spread. *Invasion Metastasis* 1998;**18**(4):192–197.
80. Wunderbaldinger P, Josephson L, Bremer C, Moore A, Weissleder R. Detection of lymph node metastases by contrast-enhanced MRI in an experimental model. *Magn Reson Med* 2002;**47**(2):292–297.

81. Yang M, Baranov E, Moossa AR, Penman S, Hoffman RM. Visualizing gene expression by whole-body fluorescence imaging. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000;**97**(22):12278–12282.
82. Matthey B, Engert A, Klimka A, Diehl V, Barth S. A new series of pET-derived vectors for high efficiency expression of *Pseudomonas* exotoxin-based fusion proteins. *Gene* 1999;**229**(1-2):145–153.
83. Kampmeier F, Ribbert M, Nachreiner T, Dembski S, Beaufils F, Brecht A, Barth S. Site-Specific, Covalent Labeling of Recombinant Antibody Fragments via Fusion to an Engineered Version of 6- O-Alkylguanine DNA Alkyltransferase. *Bioconjug Chem* 2009;**20**(5):1010–1015.
84. Stöcker M, Pardo A, Hetzel C, Reutelingsperger C, Fischer R, Barth S. Eukaryotic expression and secretion of EGFP-labeled annexin A5. *Protein Expr Purif* 2008;**58**(2):325–331.
85. Sambrook J, Russell DW. *Molecular cloning*. CSHL Press; 2001.
86. Lindl T. *Zell-und Gewebekultur*. Springer; 2002.
87. Bruns CJ, Harbison MT, Kuniyasu H, Eue I, Fidler IJ. In vivo selection and characterization of metastatic variants from human pancreatic adenocarcinoma by using orthotopic implantation in nude mice. *Neoplasia* 1999;**1**(1):50–62.
88. Kapp U, Wolf J, Kalle von C, Tawadros S, Röttgen A, Engert A, Fonatsch C, Stein H, Diehl V. Preliminary report: growth of Hodgkin's lymphoma derived cells in immune compromised mice. *Ann Oncol* 1992;**3** Suppl 4:21–23.
89. Sulkowski E. The saga of IMAC and MIT. *Bioessays* 1989;**10**(5):170–175.
90. Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 1970;**227**(5259):680–685.
91. Towbin H, Staehelin T, Gordon J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. 1979. 1992.
92. BRADFORD M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* 1976;**72**(1-2):248–254.
93. Du X, Youle RJ, Fitzgerald DJ, Pastan I. *Pseudomonas* Exotoxin A-mediated Apoptosis is Bak-dependent and Preceded by the Degradation of Mcl-1. *Mol Cell Biol* 2010;**30**(14):3444-3452.
94. Sharma AK, FitzGerald D. *Pseudomonas* exotoxin kills *Drosophila* S2 cells via apoptosis. *Toxicon* 2010;**56**(6):1025–1034.
95. Decker T, Oelsner M, Kreitman RJ, Salvatore G, Wang Q-C, Pastan I, Peschel C, Licht T. Induction of caspase-dependent programmed cell death in B-cell chronic lymphocytic leukemia by anti-CD22 immunotoxins. *Blood* 2004;**103**(7):2718–2726.

96. Stöcker M, Tur MK, Sasse S, Krüssmann A, Barth S, Engert A. Secretion of functional anti-CD30-angiogenin immunotoxins into the supernatant of transfected 293T-cells. *Protein Expr Purif* 2003;**28**(2):211–219.
97. Shultz LD, Ishikawa F, Greiner DL. Humanized mice in translational biomedical research. *Nat Rev Immunol* 2007;**7**(2):118–130.
98. Kampmeier F, Niesen J, Koers A, Ribbert M, Brecht A, Fischer R, Kießling F, Barth S, Thepen T. Rapid optical imaging of EGF receptor expression with a single-chain antibody SNAP-tag fusion protein. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* 2010;**37**(10):1926–1934.
99. Mizutani H, Tada-Oikawa S, Hiraku Y, Kojima M, Kawanishi S. Mechanism of apoptosis induced by doxorubicin through the generation of hydrogen peroxide. *Life Sci* 2005;**76**(13):1439–1453.
100. Abu Ajaj K, Graeser R, Fichtner I, Kratz F. In vitro and in vivo study of an albumin-binding prodrug of doxorubicin that is cleaved by cathepsin B. *Cancer Chemother Pharmacol* 2009;**64**(2):413–418.
101. Abdollahi A, Griggs DW, Zieher H, Roth A, Lipson KE, Saffrich R, Gröne H-J, Hallahan DE, Reisfeld RA, Debus J, Niethammer AG, Huber PE. Inhibition of alpha(v)beta3 integrin survival signaling enhances antiangiogenic and antitumor effects of radiotherapy. *Clin Cancer Res* 2005;**11**(17):6270–6279.
102. Johansen PB. Doxorubicin pharmacokinetics after intravenous and intraperitoneal administration in the nude mouse. *Cancer Chemother Pharmacol* 1981;**5**(4):267–270.
103. De Saint-Hubert M, Mottaghy FM, Vunckx K, Nuyts J, Fonge H, Prinsen K, Stroobants S, Mortelmans L, Deckers N, Hofstra L, Reutelingsperger CPM, Verbruggen A, Rattat D. Site-specific labeling of “second generation” annexin V with $^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3$ for improved imaging of apoptosis in vivo. *Bioorg Med Chem* 2010;**18**(3):1356–1363.
104. Lathe R. The individuality of mice. *Genes Brain Behav.* 2004;**3**(6):317–327.
105. Crabbe JC, Wahlsten D, Dudek BC. Genetics of mouse behavior: interactions with laboratory environment. *Science* 1999;**284**(5420):1670–1672.
106. Shcherbo D, Shemiakina II, Ryabova AV, Luker KE, Schmidt BT, Souslova EA, Gorodnicheva TV, Strukova L, Shidlovskiy KM, Britanova OV, Zaraisky AG, Lukyanov KA, Loschenov VB, Luker GD, Chudakov DM. Near-infrared fluorescent proteins. *Nat Methods* 2010;**7**(10):827–829.
107. Lin MZ. Beyond the rainbow: new fluorescent proteins brighten the infrared scene. *Nat Methods* 2011;**8**(9):726–728.
108. Subach FV, Piatkevich KD, Verkhusha VV. Directed molecular evolution to design advanced red fluorescent proteins. *Nat Methods* 2011;**8**(12):1019–1026.
109. McGarrity GJ, Vanaman V, Sarama J. Cytogenetic effects of mycoplasma infection of cell cultures: a review. *In Vitro* 1984;**20**(1):1–18.

110. Schmitz S. *Der Experimentator: Zellkultur*. Spektrum Akademischer Verlag GmbH; 2011.
111. Batra JK, Jinno Y, Chaudhary VK, Kondo T, Willingham MC, FitzGerald DJ, Pastan I. Antitumor activity in mice of an immunotoxin made with anti-transferrin receptor and a recombinant form of *Pseudomonas* exotoxin. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989;**86**(21):8545–8549.
112. Amagase H, Tamura K, Hashimoto K, Fuwa T, Murakami T, Yata N. Response of A431 experimental human solid xenograft to mitomycin C in combination with human epidermal growth factor in mice. *J Pharmacobio-dyn* 1990;**13**(4):263–268.
113. Deliolanis NC, Kasmieh R, Wurdinger T, Tannous BA, Shah K, Ntziachristos V. Performance of the red-shifted fluorescent proteins in deep-tissue molecular imaging applications. *J Biomed Opt* 2008;**13**(4):044008.
114. Hoffman RM. A better fluorescent protein for whole-body imaging. *Trends Biotechnol* 2008;**26**(1):1–4.
115. Vrignaud P. [Preclinical models in oncology]. *Bull Cancer* 2011;**98**(11):1355–1361.
116. Gelbard A, Kupferman ME, Jasser SA, Chen W, El-Naggar AK, Myers JN, Hanna EY. An orthotopic murine model of sinonasal malignancy. *Clin Cancer Res* 2008;**14**(22):7348–7357.
117. Killion JJ, Radinsky R, Fidler IJ. Orthotopic models are necessary to predict therapy of transplantable tumors in mice. *Cancer Metastasis Rev* 1998;**17**(3):279–284.
118. Hoffman RM. Imaging cancer dynamics in vivo at the tumor and cellular level with fluorescent proteins. *Clin Exp Metastasis* 2008;**26**(4):345–355.
119. Elsadek B, Graeser R, Esser N, Schäfer-Obodozie C, Tsurumi C, Abu Ajaj K, Warnecke A, Unger C, Saleem T, Kratz F. In vivo evaluation of a novel albumin-binding prodrug of doxorubicin in an orthotopic mouse model of prostate cancer (LNCaP). *Prostate Cancer Prostatic Dis.* 2011;**14**(1):14–21.
120. Shimamura T, Royal RE, Kioi M, Nakajima A, Husain SR, Puri RK. Interleukin-4 cytotoxin therapy synergizes with gemcitabine in a mouse model of pancreatic ductal adenocarcinoma. *Cancer Res* 2007;**67**(20):9903–9912.
121. Katz M. A novel red fluorescent protein orthotopic pancreatic cancer model for the preclinical evaluation of chemotherapeutics. *J Surg Res* 2003;**113**(1):151–160.
122. Krause W. *Contrast agents II*. Springer Verlag; 2002.
123. Leevy WM, Gammon ST, Jiang H, Johnson JR, Maxwell DJ, Jackson EN, Marquez M, Piwnica-Worms D, Smith BD. Optical Imaging of Bacterial Infection in Living Mice Using a Fluorescent Near-Infrared Molecular Probe. *J Am Chem Soc* 2006;**128**(51):16476–16477.

124. Kältsch H, Wieneke H, Erbel R. Acute myocardial infarction in a patient with chronic myelocytic leukemia during chemotherapy with hydroxyurea. *Herz* 2010;**35**(6):420–422.
125. O'Flaherty C, Hales BF, Chan P, Robaire B. Impact of chemotherapeutics and advanced testicular cancer or Hodgkin lymphoma on sperm deoxyribonucleic acid integrity. *Fertil Steril* 2010;**94**(4):1374–1379.
126. Staedler D, Idrizi E, Kenzaoui BH, Juillerat-Jeanneret L. Drug combinations with quercetin: doxorubicin plus quercetin in human breast cancer cells. *Cancer Chemother Pharmacol* 2011;**68**(5):1161–1172.
127. Curigliano G, Mayer EL, Burstein HJ, Winer EP, Goldhirsch A. Cardiac toxicity from systemic cancer therapy: a comprehensive review. *Prog Cardiovasc Dis* 2010;**53**(2):94–104.
128. Tur MK, Huhn M, Thepen T, Stöcker M, Krohn R, Vogel S, Jost E, Osieka R, van de Winkel JG, Fischer R, Finnern R, Barth S. Recombinant CD64-specific single chain immunotoxin exhibits specific cytotoxicity against acute myeloid leukemia cells. *Cancer Res* 2003;**63**(23):8414–8419.
129. Stahnke B, Thepen T, Stöcker M, Rosinke R, Jost E, Fischer R, Tur MK, Barth S. Granzyme B-H22(scFv), a human immunotoxin targeting CD64 in acute myeloid leukemia of monocytic subtypes. *Mol Cancer Ther* 2008;**7**(9):2924–2932.
130. Huhn M, Sasse S, Tur MK, Matthey B, Schinköthe T, Rybak SM, Barth S, Engert A. Human angiogenin fused to human CD30 ligand (Ang-CD30L) exhibits specific cytotoxicity against CD30-positive lymphoma. *Cancer Res* 2001;**61**(24):8737–8742.
131. Tur MK, Neef I, Jost E, Galm O, Jäger G, Stöcker M, Ribbert M, Osieka R, Klinge U, Barth S. Targeted restoration of down-regulated DAPK2 tumor suppressor activity induces apoptosis in Hodgkin lymphoma cells. *J Immunother* 2009;**32**(5):431–441.
132. Carvalho C, Santos RX, Cardoso S, Correia S, Oliveira PJ, Santos MS, Moreira PI. Doxorubicin: the good, the bad and the ugly effect. *Curr Med Chem* 2009;**16**(25):3267–3285.
133. Murthy U, Basu A, Rodeck U, Herlyn M, Ross AH, Das M. Binding of an antagonistic monoclonal antibody to an intact and fragmented EGF-receptor polypeptide. *Arch Biochem Biophys* 1987;**252**(2):549–560.
134. Bogner C, Dechow T, Ringshausen I, Wagner M, Oelsner M, Lutzny G, Licht T, Peschel C, Pastan I, Kreitman RJ, Decker T. Immunotoxin BL22 induces apoptosis in mantle cell lymphoma (MCL) cells dependent on Bcl-2 expression. *Br J Haematol* 2010;**148**(1):99–109.
135. Amundson SA, Myers TG, Scudiero D, Kitada S, Reed JC, Fornace AJ. An informatics approach identifying markers of chemosensitivity in human cancer cell lines. *Cancer Res* 2000;**60**(21):6101–6110.

136. Andersson Y, Juell S, Fodstad Ø. Downregulation of the antiapoptotic MCL-1 protein and apoptosis in MA-11 breast cancer cells induced by an anti-epidermal growth factor receptor-Pseudomonas exotoxin a immunotoxin. *Int J Cancer* 2004;**112**(3):475–483.
137. Traini R, Ben-Josef G, Pastrana DV, Moskatel E, Sharma AK, Antignani A, Fitzgerald DJ. ABT-737 overcomes resistance to immunotoxin-mediated apoptosis and enhances the delivery of pseudomonas exotoxin-based proteins to the cell cytosol. *Mol Cancer Ther* 2010;**9**(7):2007–2015.
138. Jensen MM, Jørgensen JT, Binderup T, Kjaer A. Tumor volume in subcutaneous mouse xenografts measured by microCT is more accurate and reproducible than determined by 18F-FDG-microPET or external caliper. *BMC Med Imaging* 2008;**8**:16.
139. Monsky WL, Heddens DK, Clark GM, Hoff Von DD, Coltman CA, Dorr RT, Alberts DS. Comparison of young clinical investigators' accuracy and reproducibility when measuring pulmonary and skin surface nodules using a circumferential measurement versus a standard caliper measurement: American Association for Cancer Research/American Society of Clinical Oncology Clinical Trials Workshop. *J Clin Oncol* 2000;**18**(2):437–444.
140. Trédan O, Galmarini CM, Patel K, Tannock IF. Drug resistance and the solid tumor microenvironment. *J Natl Cancer Inst* 2007;**99**(19):1441–1454.
141. Kwaks THJ, Otte AP. Employing epigenetics to augment the expression of therapeutic proteins in mammalian cells. *Trends Biotechnol* 2006;**24**(3):137–142.
142. Kenis H, Reutelingsperger C. Targeting phosphatidylserine in anti-cancer therapy. *Curr Pharm Des* 2009;**15**(23):2719–2723.
143. Utsugi T, Schroit AJ, Connor J, Bucana CD, Fidler IJ. Elevated expression of phosphatidylserine in the outer membrane leaflet of human tumor cells and recognition by activated human blood monocytes. *Cancer Res* 1991;**51**(11):3062–3066.
144. Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. *Cell* 2000;**100**(1):57–70.
145. Luo J, Solimini NL, Elledge SJ. Principles of cancer therapy: oncogene and non-oncogene addiction. *Cell* 2009;**136**(5):823–837.

7 Anhang

7.1 425(scFv)-ETA' Sequenzinformationen

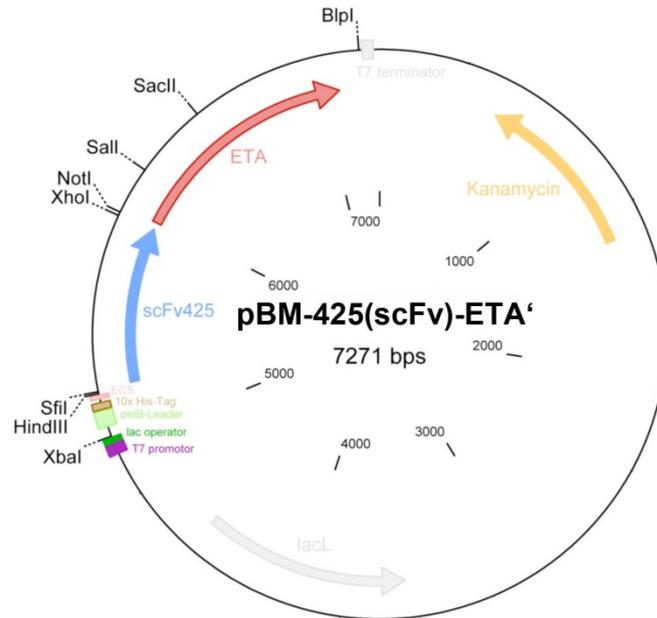


Abbildung 29: Vektorkarte von pBM-425(scFv)-ETA'.

pBM-425(scFv)-ETA' enthält N-terminal das 425(scFv) und C-terminal ETA' als Toxin. Die Transkriptionsrichtungen der offenen Leseraster sind durch Pfeile angegeben. Das IT besitzt N-terminal einen „His-Tag“ zur Reinigung. Der pelB-Leader vor dem „His-Tag“ ermöglicht die Sekretion des Proteins in den periplasmatischen Raum (ECS: Enterokinase-Erkennungssequenz, Kanamycin: Kanamycinresistenzgen).

4996 cta tag ggg aat tgt gag cgg ata aca att ccc ctc tag aaa taa ttt tgt tta act tta aga agg aga tat aca tat gaa ata cct gct gcc gac cgc tgc tgc tgg tct
gat atc ccc tta aca ctc gcc tat tgt taa tag ggg gat ttt att aaa aca aat gaa - l - t - e - g - d - i - h - m - k - y - a - a - g - a
h y r g l v s g - q f p s r n n f v - l - t - e - g - d - i - h - m - k - y - a - a - g - a

5107 gct gct cct cgc tgc cca gcc ggc gat ggc cat ggg cca tca tca tca tca tca tca tca tca cag cag cgc cca tat cga cga cga cga cca gca tat gaa gct tat
cga oga gga gog aog ggt ogg cgg cta ccc ggt agt agt agt agt agt agt agt agt gtc gtc gcc ggt ata gct
l l l l l a a a q p a m a m a m g h h h h h h h h h h s s g h i d d d d d k h m k l
>>.....HisTag.....>>
>>.....ECS.....>>

5218 ggc oca gcc gcc cat ggc cga ggt gca act gca gca gtc tgg ggc tga act ggt gaa gcc tgg ggc ttc agt gaa gtt gtc ctg caa gcc ttc cgg cta cac ctt cac cag
ccg ggt cgg cgg gta cgg gct cca cgt tga cgt cgt cag acc cgg act tga cca ctt cgg acc cgg aag tca ctt caa cag gac gtt ccg aag gcc gat gtg gaa gtg gtc
m a q p a m a e v q l q q s g a e l v k p g a s v k l s c k a s g y t f t
>>.....425 (scFv).....>>

5329 cca ctg gat gca ctg ggt gaa gca gag ggc tgg aca agg cct tga tgg gat cgg aga gtt taa tcc cag caa cgg ccg tac taa cta caa tga gaa att caa gac caa ggc
ggg gao cta cgt gac cca ctt cgt ctc ccg acc tgt tcc gga act cao cta gcc tot caa att agg gtc gtt gcc ggc atg att gat gtt act ctt taa gtt ctc gtt ccg
s h w m h w v k q r a g q g l e w i g e f n p s n g r t n y n e k f k s k
>.....425 (scFv).....>

5440 cac act gac tgt aga caa atc ctc cag cac agc cta cat gca act cag cag cct gac atc tga gga ctc tgc ggt cta tta ctg tgc cag tog gga cta tga tta cga cgg
gtg tga ctg aca tct gtt tag gag tct tgg tag gta cgt tga gtc gtc gga ctg tag act cct gag acc cca gat aat gac acc gct gac act aat gct gcc
a t l t v d k s s s t a y m q l s a l t s e d s a v y y c a s r d y d y d
>.....425 (scFv).....>

5551 acg gta ctt tga cta ctg ggg cca agg gac cac ggt cac cgt ctc ctc agg tgg cgg tgg ctc ggg cgg tgg tgg tgg ggc tgg tgg cgg atc tga cat cga gct cac cca
tgc cat gaa act gat gac ccc ggt tcc ctg tgc cca tgg gca gag gag acc gcc gcc acc cag ccc acc acc acc gcc tag act gta gct cta cta cta cta ggt ggt
g r y f d y v g q g t t v t v s s g g g s g g g g a g g g g a d i e l t
>.....425 (scFv).....>

5662 gtc tcc agc aat cat gtc tgc atc tcc agg gaa gaa ggt cac tat gac ctg cag tgc cag ctc aag tgt aac tta cat gta ttg gta cca oca gaa gcc agg atc ctc ccc
cag agg tog tta gta cag acc tag agg tcc cct cct cca tgg ata ctg gat gcc acc gcc
q s p a l m s a s p g e k v t m t c s a s s v t y m y w y q q k p g s s
>.....425 (scFv).....>

5773 cag act cct gat tta tga cac atc caa cct ggc ttc tgg agt ccc tgt tog ttt cag tgg cag tgg gtc tgg gac ctc tta ctc tct cac aat cag cgg aat gga ggc tga
gtc tga gga cta aat act gtg tag gtt gga ccc aag acc tca ggg aca agc aaa gtc acc gtc acc cag acc ctg gag aat gag aga gtg tta gct gta cta cta cta cta
p r l l i y d t s n l a a s g v p v r f s g s g s g t s a y s l t i s r m e a
>.....425 (scFv).....>

5884 aga tgc tgc cac tta tta ctg cca gca gtc gag tag tca cat att cac gtt cgg ctc ggg gac aga act cga gat caa acc ggc ggc cgc aga gct cgc ttc cgg agg tcc
tct acc agc gtg aat aat gac ggt cgt cac ctc atc agt gta taa gtg caa gcc gac ccc ctg tct tga gct cta gtt tgc ccg cgg cgg tct cga ggc agg gcc tcc agg
e d a a t y y c q q w s h i f t f g g s g t e l e i k r a a a e l a s g
>.....425 (scFv).....>>
>>.....Linker.....>>
ETA' >>

5995 cga ggg cgg cag cct ggc cgc gct gac cgc gca gca ggc ctg cca cct gcc got gca gac ttt cac cgg tea tog cca gcc ggc cgg ctg gca act gga gca gtc cgg
gct ccc gcc tgc gga cgg ggc cga ctg ggc ggt cgg gac ggt gga cgg cga cct ctg aaa gtc ggc agt agc ggt cgg cgc gcc gac cct gtt tga ctt cta cta cta
p e g g s l a a l t a h q a c h l p l e t f t r h r q p r g w e q l e q c
>.....ETA'.....>

6106 cta tcc ggt gca cgc ggt gct ggc ctc cta cct ggc ggc ggc act gtc atg gaa cca ggt gta cca ggt gat cgg caa cgc cct ggc cag ccc cgg cag cgg cgc cta cct
gat agc gca cgt gcc cga cca ctc ggc gga gat gga cgg cgc cgc tga bag tac ctt gtt cca cta ggc gtt cgg gga cgg gtc ggc gcc gtc gcc gct gga
g y p v q r l v a l y l a a r l s w n q v d q v i r n a l a s p g s g g d
>.....ETA'.....>

6217 ggg cga agc gat cgg cga gca gcc gga gca ggc ggc tct cgc gct gac cct gcc cgc cgc cgc gca gag cga ggc cct gct cgg gca ggc cca cga cga cga ggc ggc
ccg gtt ggc gct gcc gct cgt ggc cct cgt cgg ggc aga ggc cga cct tac ggc ccc ggg cgg cct gtc ggc gct cgg gga cca cct ggc gct gga cca cgc ggc cgc
l g e a i r e q p e q a r l a l t l a a a e s e r f v r q g t g n d e a g
>.....ETA'.....>

6328 ggc caa cgc cga cgt ggt gag cct gac ctg ccc ggt cgc cgc cgg tga atg cgc ggg ccc gcc gga cag cgg cga cgc cct gct gga ggc caa cta tcc cac tgg cgc gca
caa gcc gat ggt gcc gtc gaa gga gct tog cgg cgt ttc gta gca gaa gcc gcc cca cgc cgc cgc gtc ggt cct gga gct ggc cta gac cgc gcc aaa gat ata ggc gcc
a a n a d v v s l t c p v a a g e c a g p a d s g d a l l e r n y p t g a
>.....ETA'.....>

6439 gtt cct cgg cga cgg cgg cga cgt cag ctt cag cac ccc cgg cac gca gaa ctg gac ggt gga ggc gct gct cca ggc gca cgc cca act gga gga ggc cta tgt gtt
caa ggc gcc got gcc gca gtc gtc ggc gcc gtc ggt cct ggc gca cca cta agg gag ccc cta ggg gtc gct ggg cgc gtt gca gcc gcc gct gca cca cca
e f l g d g g d v s f s t r g t q n w t v e r l l q a h r q l e e r g y v
>.....ETA'.....>

6550 cgt cgg cta cca cgg cac ctt cct cga agc gcc gca aag cat cgt ctt cgg cgg ggt ggc cgc ggc cag cca cca cct cga cgc gat ctg ggc cgg ttt cta tat cgc cgg
f v g y h g t f l e a a q s l v f g g v r a r s q d l d a i w r g f y l a
>.....ETA'.....>

6661 cga tcc ggc gct ggc cta cgc cta cgc cca gca gca gga acc cga cgc acc cgg cgg gat cgg cca cgg tgc cct gct ggc ggt cta tgt gcc cgc cta cta cta cta
g d p a l a y a y a q d q e p d a r g r i r n g a l l r v y v p r s s l p
>.....ETA'.....>

6772 ctt cta cgg cac cag cct gac cct ggc cgc gcc gga ggc ggc ggc cga ggt cga acc gct gat cgg cca tcc gct gcc gct ggc cct gga cgc cat cac cgg ccc cga gga
gaa gat ggc gtc gtc gta ctg gga cgg ggc cgg cct ccc cgc ccc cca cca gct tgc cga cta gcc ggt agg cga cgg cga cgc gca cct ggt gta gtc gcc ggc gct cct
g f y r t s l t l a a p e a a g e v e r l i g h p l p l r l d a i t g p e
>.....ETA'.....>

6883 gga agg cgg ggc cct gga gac cat tct cgg ctg gcc gct ggc cga ggc cac cgt ggt gat tcc ctc ggc gat ccc cac cga ccc ggc caa cgt cgg cgg cga cct cga ccc
cct tcc gcc cgc gga cct ctg gta aga gcc gac cgg cga ccc gct cgc gtc gca cca cta agg gag ccc cta ggg gtc gct ggg cgc gtt gca gcc gcc gct gca ccc cgg
e e g g r l e t i l g w p l a e r t v v i p s a i p t d p r n v g g d l d
>.....ETA'.....>

6994 gtc cag cat ccc cga caa gga aca gcc gat cag cgc cct gcc gga cta cgc cag cca gcc cgg caa acc gcc ggc cga gga cct gaa gta act gcc ggc acc gcc cgg ctc
p s s l p d k e a l p d y a s g q p g k p p r e d l k - l p r p a g
>.....ETA'.....>>

7105 cct tog cag gag cgc gcc ttc tog ggc cct ggc cat aca tca ggt ttt cct gat gcc agc cca atc gaa tat gaa ttt cga cgc tga gca ata act agc ata acc cct tgg
gca agc gtc ctc ggc cgg aag agc ccc gca cgg gta tgt agt cca aaa gga cta cgg tog ggt tag ctt ata ctt aaa gct ggc act gct tat tga tog tat tgg gga acc
s l r r s r p s r g l a i h q v f l m p a q s n m n f d a e q - l a - p l
>.....BspI.....>

7216 ggc ctc taa acc ggt ctt gag ggg ttt ttt gct gaa agg agc aac tat atc cgg at
cgg gat att tgc cca gaa ctc ccc aaa aca cta ctt tcc tcc tgg ata tag gcc ta
g a s k r v l r g f l l k g g t i s g

Abbildung 30: cDNA-Sequenz von pBM-425(scFv)-ETA'.

Dargestellt ist die cDNA- sowie Proteinsequenz (dargestellt in grün) des offenen Leserasters von 425(scFv)-ETA'. Das 425(scFv) liegt c-terminal des vektorständigen His-Tags und anschließender Enterokinase-Erkennungssequenz zwischen den Schnittstellen *SfiI* und *NotI* im pBM-Vektor vor. Stromabwärts des 425(scFv) liegt die Sequenz von ETA'. Restriktionsschnittstellen sind in blau dargestellt.

7.2 Ein- und Dreibuchstaben-Code der AminosäurenAminosäuren mit polaren Seitenketten:

Serin	Ser	S
Threonin	Thr	T
Cystein	Cys	C
Tyrosin	Tyr	Y
Asparagin	Asn	N
Glutamin	Gln	Q

Aminosäuren mit apolaren Seitenketten:

Glycin	Gly	G
Alanin	Ala	A
Valin	Val	V
Leucin	Leu	L
Isoleucin	Ile	I
Prolin	Pro	P
Phenylalanin	Phe	F
Tryptophan	Trp	W
Methionin	Met	M

Aminosäuren mit geladenen Seitenketten:

Aspartat	Asp	D
Glutamat	Glu	E
Lysin	Lys	K
Arginin	Arg	R
Histidin	His	H

7.3 Spektren der verwendeten fluoreszierenden Proteine

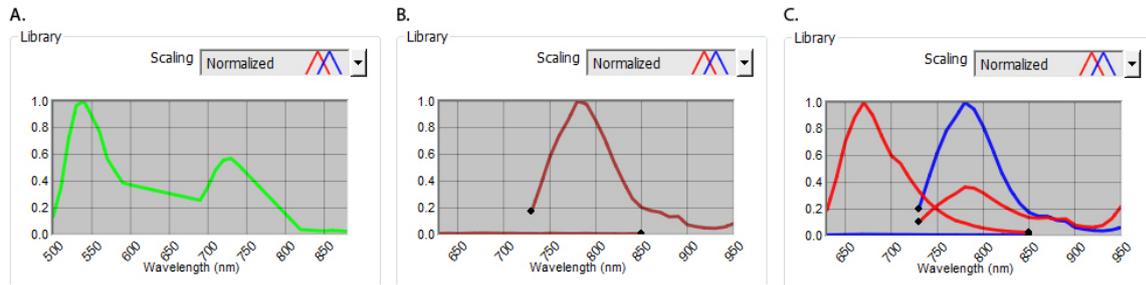


Abbildung 31: Darstellung der unterschiedlichen Spektren verwendeter, fluoreszierender Proteine.

Für die Mausversuche wurden unterschiedliche, fluoreszierende Proteine eingesetzt. Jedes Protein ist durch ein spezifisches Spektrum definiert, welches mit dem Maestro™ System detektiert wurde. A. GFP (grün), B. AV-AF750 (braun), C. Kat2 (rot) und 425(scFv)SNAP-747 (blau).

7.4 Auswertungen mit dem Maestro™ System

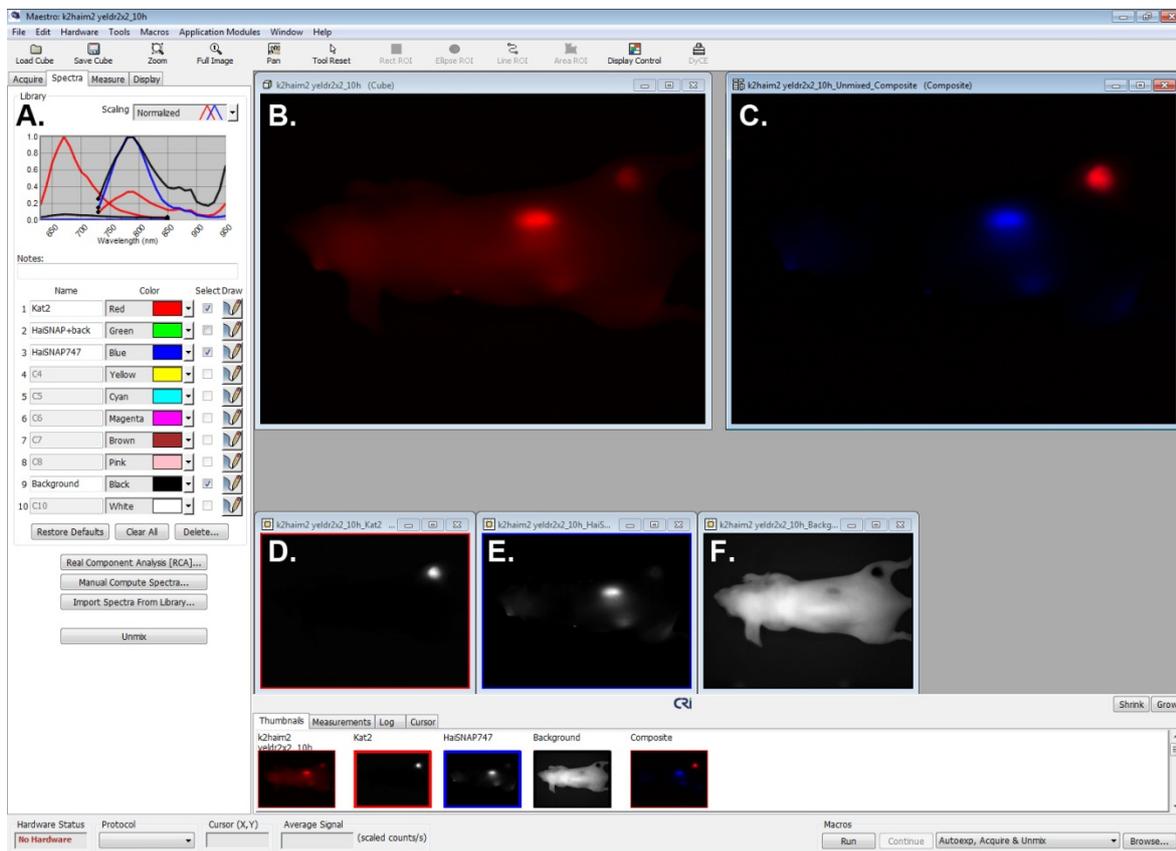


Abbildung 32: Beispiel-Auswertung zur Differenzierung unterschiedlicher Spektren.

Dargestellt ist eine beispielhafte Auswertung zur Differenzierung der unterschiedlichen Spektren gleichzeitig in der Maus vorherrschender fluoreszierender Proteine. Das Tier wird in anästhesiertem Zustand in das Maestro™ Gerät gelegt und die Fluoreszenz mit adäquaten Filtern angeregt. Nach der Messung werden alle gemessenen Signale in einem Bild dargestellt (B.). Durch das Berühren einzelner Pixel in diesem Bild werden die dort gemessenen Signale in Spektren dargestellt (A.). Das Spektrum der Autofluoreszenz ergibt sich durch die Markierung des Mausexbildes, welches vor Applikation des Fluoreszenzfarbstoffes aufgenommen wurde. Dieses kann danach vom gemessenen Signal subtrahiert werden. Es werden sowohl alle gemessenen spezifischen Signale einzeln dargestellt (D.-F.) als auch in unterschiedlichen Farben in einem Bild (C.).

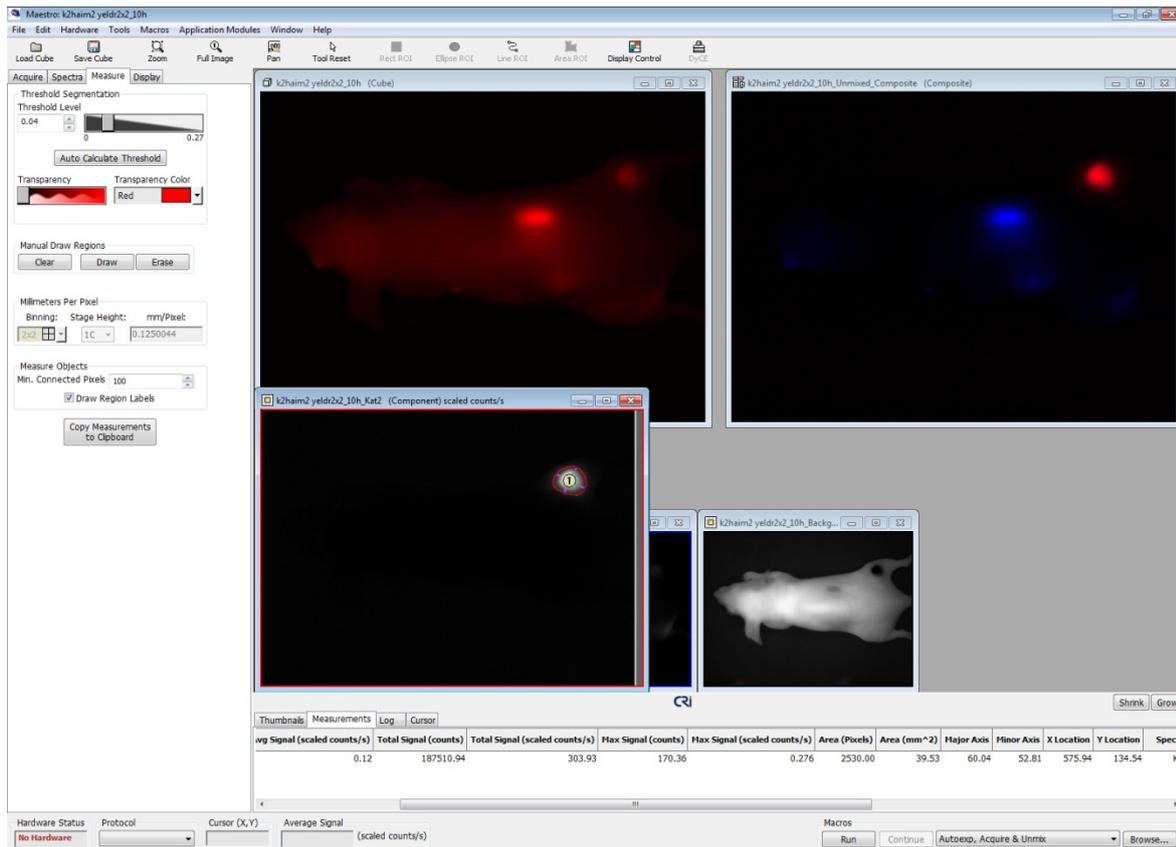


Abbildung 33: Beispiel-Auswertung zur Bestimmung der Tumorgröße.

Dargestellt ist eine beispielhafte Auswertung zur Bestimmung der Tumorgröße nach Applikation fluoreszierender Tumorzellen. Zunächst wird nach der Messung des Fluoreszenzsignals mit adäquaten Filtern das reine Tumorsignal wie in Abb. 33 beschrieben, bestimmt. In diesem Bild kann der Tumor anhand des emittierten Fluoreszenzsignals manuell eingegrenzt werden. Das Maestro™ System berechnet dann nach Äquilibration der „Software“ automatisch die Größe des eingegrenzten Bereiches. Eingegrenzte Bereiche können gespeichert, auf andere Bilder übertragen und dort angepasst werden.

7.5 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Beschreibung wichtiger Vektoren.....	19
Tabelle 2: Verwendete Bakterienstämme unter Angabe ihres Genotypen.	20
Tabelle 3: Verwendete Zelllinien und deren Ursprung.	21
Tabelle 4: Getestete Zelllinien und ihre Sensitivität gegenüber 425(scFv)-ETA'	39

7.6 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Schematische Darstellung der Wirkung eines ETA'-basierten IT.....	2
Abbildung 2: Detektion apoptotischer Zellen über die Bindung von Annexin A5.....	6
Abbildung 3: Darstellung der Autofluoreszenz von endogenen Molekülen.....	9
Abbildung 4: Darstellung der Bildanalyse des Maestro™ Systems.....	11
Abbildung 5: Flussdiagramm zur Veranschaulichung der Vorgehensweise in dieser Arbeit..	13
Abbildung 6: Reinigung von 425(scFv)-ETA' mittels Ni-NTA-Affinitätschromatographie..	34
Abbildung 7: Darstellung der erhaltenen Fraktionen nach Durchführung einer Anionenaustauschchromatographie.....	35
Abbildung 8: Darstellung der Fraktionierung des Eluats aus der Gelfiltrationschromatographie.....	36
Abbildung 9: Darstellung des gereinigten 425(scFv)-ETA'.....	37
Abbildung 10: Darstellung der Bindung und Toxizität von 425(scFv)-ETA' auf A-431- und L3.6pl-Zellen.....	38
Abbildung 11: EGFR-Expression auf verschiedenen Pankreaskarzinomzelllinien im Vergleich zu A-431.....	39
Abbildung 12: Darstellung von Annexin A5-EGFP im Zellkulturüberstand.....	40
Abbildung 13: Darstellung der Induktion von Apoptose nach Inkubation mit 425(scFv)- ETA'.....	41
Abbildung 14: Darstellung von L3.6pl-Kat2 und A431scM3-Kat2 Zellen unter dem Mikroskop und im Durchflusszytometer.....	43
Abbildung 15: Darstellung der Sensitivität von A431scM3 und A431scM3-Kat2 Zellen gegenüber 425(scFv)-ETA'.....	44
Abbildung 16: Darstellung fluoreszierender Tumorzelllinien <i>in vivo</i>	45
Abbildung 17: Verlaufsschema für die Behandlung und gleichzeitige Messung der Tumorgößen.....	47
Abbildung 18: Darstellung der A431scM3-Kat2 Tumoren je einer exemplarischen Maus aus den drei Gruppen während der Behandlung mit PBS, 425(scFv)-ETA' und Doxorubicin.....	48
Abbildung 19: Darstellung der Tumorgößen während der Behandlungszyklen.....	49
Abbildung 20: Darstellung der Tumorgößen während der Behandlungszyklen.....	50
Abbildung 21: Darstellung der Fluoreszenzintensitäten des Tumors von je einer Maus aus den drei Versuchsgruppen.....	51
Abbildung 22: Darstellung der Fluoreszenzintensitäten in Korrelation zur Tumorgöße.....	52
Abbildung 23: Darstellung der äußeren Erscheinung der Tumoren.....	53
Abbildung 24: Darstellung der Paralyse der Hinterbeine einer mit Doxorubicin behandelten Maus.....	54
Abbildung 25: Darstellung der Organe und des Tumors während der Präparation aus einer Maus.....	55
Abbildung 26: Darstellung des AV-AF750-Signals in einer mit PBS als auch mit 425(scFv)-ETA' behandelten Maus.....	56
Abbildung 27: Darstellung des AV-AF750-Signals in allen Mausgruppen.....	57
Abbildung 28: Darstellung der Bindung von 425(scFv)SNAP-747 an A431scM3-Kat2 Zellen <i>in vivo</i>	58
Abbildung 29: Vektorkarte von pBM-425(scFv)-ETA'.....	I
Abbildung 30: cDNA-Sequenz von pBM-425(scFv)-ETA'.....	III
Abbildung 31: Darstellung der unterschiedlichen Spektren verwendeter, fluoreszierender Proteine.....	IV
Abbildung 32: Beispiel-Auswertung zur Differenzierung unterschiedlicher Spektren.....	IV

Abbildung 33: Beispiel-Auswertung zur Bestimmung der Tumorgröße V

Veröffentlichungen

Publikationen

Stöcker M., Pardo A., Hetzel C., Reutelingsperger C., Fischer R., Barth S. (2008): "Eukaryotic expression and secretion of EGFP-labeled annexin A5." *Protein Expr Purif.* **58** (2), S. 325-331

Pardo A., Stöcker M., Kampmeier F., Melmer G., Fischer R., Thepen T. and Barth S. (2012): "In vivo imaging of immunotoxin treatment using Katushka ransfected A-431 cells in a murine xenograft tumour model", *Cancer Immunol Immunother.* 2012 Feb 19. [Epub ahead of print]

Posterpräsentationen

Pardo A., Hetzel C., Barth S., Stöcker M., „Design and evaluation of apoptosis inducing immunotoxins”, *Biomedica 2007*, Aachen

Pardo A., Hetzel C., Reutelingsperger C., Fischer R., Barth S., Stöcker M., „Eucaryotic expression and characterization of Annexin A5-EGFP”, *Biomedica 2008*, Maastricht (NL)

Hetzel C., Pardo A., Stöcker M., Barth S., „Continuous secretion of red fluorescent scFv fusion proteins directed against CD30 positive lymphoma by established transfected 293T cells“, *Biomedica 2008*, Maastricht (NL)

Nachreiner T., Kolberg K., Pardo A., Barth S., „ForSaTum: An animal research platform for the development and implementation of novel concepts for cancer therapy”, *Fabisch-Symposium 2012*, Berlin

Pardo A., Stöcker M., Kampmeier F., Melmer G., Fischer R., Thepen T. and Barth S., „Optical imaging of treatment responses by the use of fluorescent tumor cells in mice“, *Biomedica 2012*, Lüttich (B)

Brehm H., Pardo A., Jörißen H., Fischer R., Gattenlöhner S. and Barth S., „Enhancing the efficiency of an immunotoxin targeting the fetal Acetylcholine receptor on rhabdomyosarcoma cells“, Biomedica 2012, Lüttich (B)

Kessler C., Pardo A., Kolberg K., Fischer R. and Barth S., „Selection and characterization of specific antibodies for diagnosis and immunotherapy of prostate cancer“, Biomedica 2012, Lüttich (B)

Choudhary S., Pardo A., Verma Rama S., Batra J. K. and Barth S., „Construction and evaluation of c-kit targeting immunotoxins in c-kit overexpressing pancreatic cancer“, Biomedica 2012, Lüttich (B)

Auszeichnungen



Biomedica 2012
The European Life Sciences Summit



Where Science
& Business meet

April 18-19, 2012
Liège, BE

Poster Award Certificate

presented to
Alessa PARDO

For the best poster presentation at the 6th Biomedica Summit, held in Liège (Belgium), on April 18-19 2012. Prize: € 500,00.

Topic: *Biopharmaceuticals & nutraceuticals*

Title: *Optical imaging of treatment responses by the use of fluorescent tumor cells in mice*


Dr. Moreno Galleni
University of Liège ULg
Chair, Poster Jury


Prof. Bernard Rentier
University of Liège ULg
Chair, Biomedica Foundation

Danksagung

Hiermit möchte ich mich bei allen Personen bedanken, die mich in der ganzen Zeit während der Doktorarbeit unterstützt und damit zur Fertigstellung dieser Arbeit beigetragen haben.

Herrn Prof. Dr. Fischer danke ich für die Möglichkeit, diese Arbeit am Fraunhofer Institut für Molekularbiologie und angewandte Ökologie (IME) durchführen zu können sowie für die freundliche Übernahme des Referats und die Korrektur der Arbeit.

Herrn Prof. Dr. Dr. Barth danke ich für die Möglichkeit, Teil der PPD-Gruppe zu sein und für die Übernahme des Korreferats. Des Weiteren möchte ich mich für die jederzeit möglichen fachlichen Diskussionen und Anregungen bedanken.

Auch Prof. Dr. Bohrmann danke ich für die freundliche Übernahme des Korreferats.

Diese Arbeit wurde mit Drittmitteln durch das BMBF finanziert.

Vielen Dank an unseren Kooperationspartner CARIM (Maastricht) für die Bereitstellung von AV-AF750, ohne welches die *in vivo* Annexin-Versuche nicht möglich gewesen wären.

Ganz besonderer Dank gilt meinen Betreuern Dr. Michael Stöcker und Dr. Theo Thepen, mit denen jederzeit fachliche Diskussionen möglich waren und die mich in jeglicher Hinsicht unterstützt haben. Theo, vielen vielen Dank für die Hilfe bei den Mausexperimenten, auch an Wochenenden, Feiertagen und schon mal zu nächtlicher Zeit!

Vielen Dank an Dirk Scheffler, Reinhard Rosinke, Peggy Jirak und Simon Vogel für die technische Unterstützung bei der Reinigung von 425(scFv)-ETA', der Hilfe in der Zellkultur und das Sortieren der Kat2-transfizierten Zellen.

Bei der gesamten PPD-, EMI- und PharmedArtis-Gruppe möchte ich mich für die gute Arbeitsatmosphäre und die Hilfsbereitschaft im Labor bedanken.

Zu guter Letzt möchte ich mich noch ganz herzlich bei meiner Familie und meinen Freunden für die mentale Unterstützung während der Doktorarbeit bedanken. Ganz lieber Dank geht an

meine Mädels Christiane Püttmann, Katharina Kolberg und Hannah Jörißen für die hervorragende Zusammenarbeit im Labor und die sehr gute Freundschaft außerhalb. Vielen Dank auch an Christiane Koppe für den regelmäßigen Besuch in der Pontstraße und den Austausch über das geteilte Leid.